

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE SUPLEMENTOS DIETARIOS A LARGO PLAZO EN EL MODELO

Caenorhabditis elegans

Castelo, Micaela Nathalíe – LU1026655

Péndola, Gabriela Natalia – LU1040121

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Cardozo, Julián, UADE

Octubre 16, 2021



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

CONTENIDOS

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 MODELO BIOLÓGICO <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
1.1.1 Características generales	6
1.1.2 Ciclo de vida	7
1.1.3 Anatomía	8
1.1.4 Ventajas de <i>C. elegans</i> como modelo biológico	9
1.2 SUPLEMENTOS DIETARIOS	10
1.2.1 Marco normativo de Suplementos Dietarios y antecedentes.....	10
1.2.2 Estadísticas de consumos generales de suplementos dietarios.....	13
1.2.3 Contaminaciones y efectos adversos.....	14
1.2.4 Creatina	16
1.2.5 Glutamina.....	17
1.2.6 Caseína (como caseinato de calcio o calcaseína)	18
1.2.7 Quemadores de grasa	19
1.2.8 Ovoalbúmina (comercializado como Omelette).....	21
1.3 IMPORTANCIA DEL PROYECTO	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Material biológico	24
4.2 Cultivo y mantenimiento de <i>C. elegans</i>	24
4.3 Sincronización de gusanos	25
4.4 Preparación de los nematodos para los diferentes ensayos	27
4.5 Elección y administración de los suplementos.....	28
4.6 Ensayo de longevidad.....	28
4.7 Ensayo de resistencia al estrés oxidativo	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Análisis estadístico general del ensayo de longevidad.....	31

5.1.1 Análisis estadístico del ensayo de longevidad con 0,05gr/ml de los distintos tratamientos:.....	35
5.2 Análisis estadístico general del ensayo de resistencia al estrés oxidativo.....	41
5.2.1 Análisis estadístico del ensayo de resistencia al estrés oxidativo con 0,05gr/ml de los distintos tratamientos	45
6. DISCUSIÓN	52
7. IMPLICANCIAS A FUTURO.....	54
ANEXOS.....	55
Anexo 1. Composición de los medios de cultivo	55
Anexo 2. Información nutricional detallada de cada suplemento dietario descripta en el rótulo del producto (www.pulver.com.ar).	57
Anexo 3. Ensayo de supervivencia para la administración de los suplementos dietarios	59
Anexo 4. Porcentajes de mortalidad de nematodos en el ensayo de longevidad según cada suplemento	60
Anexo 5. Análisis estadístico del ensayo de longevidad.....	63
Con 0,01 gr/ml de los distintos tratamientos.....	63
Con 0,025gr/ml de los distintos tratamientos.....	69
Anexo 6. Porcentajes de mortalidad de nematodos en el ensayo de resistencia al estrés oxidativo según cada suplemento.....	75
Anexo 7. Análisis estadístico del ensayo de resistencia al estrés oxidativo.....	77
Con 0,01gr/ml de los distintos tratamientos.....	77
Con 0,025gr/ml de los distintos tratamientos.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	90

RESUMEN

Para este proyecto se utilizó el modelo biológico de nematodos *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) por su homología genética con la especie humana y sus cualidades para el cultivo, mantenimiento de bajo costo y manipulación sencilla, que permite llevar a cabo este análisis a nivel orgánico.

Los suplementos dietarios son productos utilizados por personas sanas, generalmente deportistas con el fin de incorporar nutrientes adicionales a su dieta. En la actualidad existe cierta controversia respecto a su consumo y el daño que puedan llegar a ocasionar a la salud, dado que no hay suficiente evidencia científica que lo respalde. Por este motivo, en este trabajo se evaluaron los efectos a largo plazo de distintas dosis de suplementos dietarios a base de proteínas sobre la longevidad y resistencia al estrés oxidativo de *C. elegans*. Los resultados obtenidos demuestran que el porcentaje de mortalidad de los nematodos aumenta al ser expuestos a los suplementos dietarios a largo plazo, y este porcentaje es directamente proporcional a la dosis de exposición. La respuesta al estrés oxidativo también se ve afectada negativamente. Por el contrario, se concluyó que la exposición de los nematodos a la ovoalbúmina a largo plazo no produjo cambios significativos respecto al grupo control por lo que no podemos decir que influye en la longevidad del modelo ni modifica la capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo.

Este trabajo aportó información científica relevante sobre el efecto de los suplementos dietarios a largo plazo siendo, además, un análisis inédito con suplementos de origen nacional. Sin embargo, existieron limitaciones propias del modelo biológico elegido, y, por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo final no son extrapolables a humanos. Se sugiere realizar estudios más exhaustivos en otros modelos biológicos.

ABSTRACT

The biological model of nematodes *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used for this project because of its genetic homology with the human species and its qualities for cultivation, low-cost maintenance, and simple manipulation, which allows this analysis to be carried out at an organic level.

Food supplements are usually used by healthy people, generally athletes to incorporate additional nutrients into their diet. Currently there is some controversy regarding its consumption and the damage it can cause, since there is not enough scientific evidence to support it. For this reason, this study evaluated the long-term effects of different doses of protein-based food supplements on the longevity and resistance to oxidative stress in *C. elegans*. The results showed that the percentage of mortality increased when nematodes were exposed in the long-term to food supplements, and this percentage was directly proportional to the dose of exposure. The response to oxidative stress was also adversely affected. On the contrary, it was concluded that the exposure of nematodes to ovalbumin in the long term did not produce significant changes with respect to the control group, so we cannot say that it influences the longevity of the model or modifies the responsiveness to oxidative stress.

This work provided relevant scientific information on the effect of food supplements in the long term and was also an unpublished analysis with national supplements. However, there are limitations of the chosen biological model, and, therefore, the results obtained in this final work cannot be extrapolated to humans. It is suggested to carry out more exhaustive research in other biological models to study the long-term effects of the consumption of food supplements, as well as the quality, strength, purity, and actual composition of them.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MODELO BIOLÓGICO *Caenorhabditis elegans*

1.1.1 Características generales

En este proyecto final de investigación se utilizó como modelo biológico al nematodo *Caenorhabditis elegans* (cepa N2 de tipo silvestre), perteneciente a la familia *Rhabditidae*. *Caenorhabditis elegans*, en adelante *C. elegans*, es un nematodo microscópico cuyas larvas recién eclosionadas miden 0,25 milímetros de longitud, mientras que los adultos maduros alcanzan una longitud de 1 milímetro. Este nematodo, transparente y no patogénico, vive principalmente en el suelo con altos niveles de humedad y a temperaturas muy variadas. Se alimenta principalmente de bacterias y hongos y su ciclo de vida es relativamente rápido ya que demora entre 3 y 6 días en llegar a la adultez, viviendo alrededor de 4 semanas (Corsi, 2015).

Debido a que el genoma de *C. elegans* fue totalmente secuenciado desde 1998 (Stein *et al.* 1998) y que se supo que posee una alta homología genética con la especie humana (40% aproximadamente), resultó adecuado su uso para el estudio de ciertas enfermedades, como, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer o la enfermedad de Huntington. Estas enfermedades neurodegenerativas humanas, comparten factores de riesgo similares con este modelo, siendo principalmente el estrés oxidativo, el envejecimiento celular y la disfunción de las proteínas. (Markaki *et al.* 2020. Schmidt *et al.* 2007. Antoshechkin *et al.* 2007)

También *C. elegans* es uno de los principales modelos utilizados para el estudio de vías metabólicas, entre ellas de la insulina dado que los genes que codifican el receptor de esta hormona están presentes en este organismo. Esto permite estudiar patologías relacionadas del metabolismo como la diabetes mellitus de tipo 2 (Morcos *et al.* 2009).

En resumen, existe una gran amplitud en el uso de *C. elegans* como modelo de enfermedades humanas, siendo otro ejemplo que se puede destacar, su uso en el área de toxicología para identificar moléculas involucradas en las respuestas a largo plazo de diferentes drogas de abuso o sustancias adictivas, como así también entender la función

y el comportamiento del sistema nervioso. (Schafer, 2004. Markaki *et al.* 2020. Engleman *et al.* 2016).

1.1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida se divide en una etapa embrionaria, seguido de cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) hasta la edad adulta (Figura 1). La duración del mismo depende principalmente de la temperatura a la cual se encuentran almacenados en el laboratorio: 3 días en condiciones normales a 25°C o 6 días a 15°C.

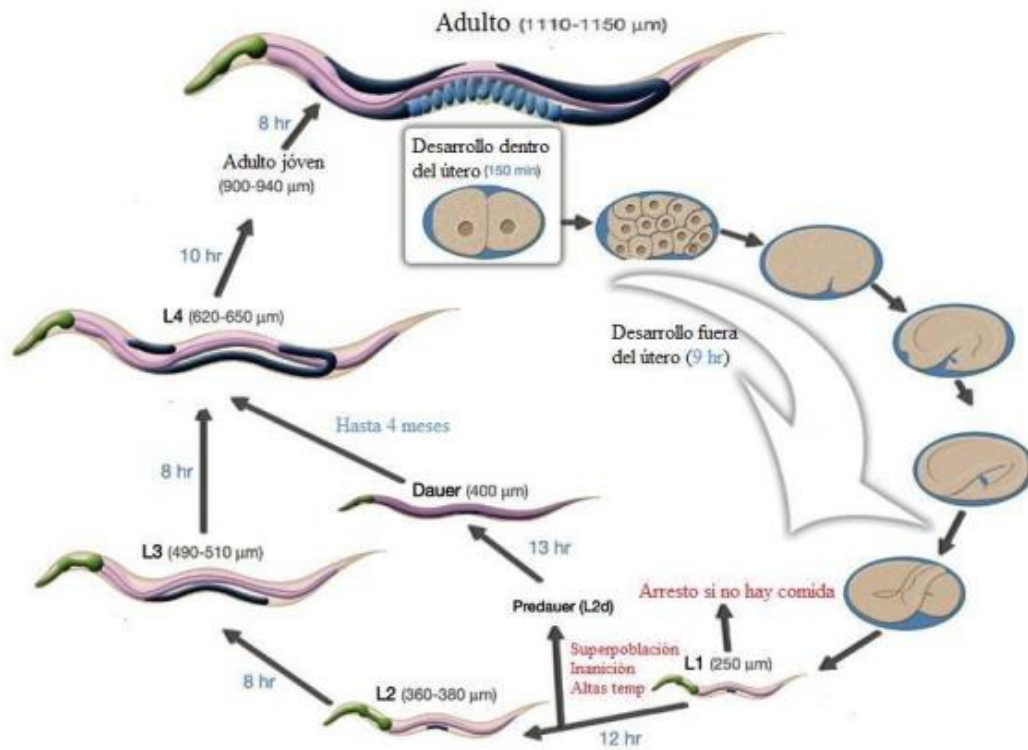


Figura 1. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. Imagen adaptada de WormAtlas (www.wormatlas.org).

La embriogénesis y la etapa L1 tienen una duración de 16 horas a 20°C, mientras que el resto de las etapas (L2-L4) duran 12 horas cada una. Al final de la etapa L4, cada adulto hermafrodita comienza a producir su progenie por un período de 2-3 días. Luego del período reproductivo pueden vivir varias semanas más hasta entrar en senescencia.

Al finalizar la etapa L2, la larva puede entrar en estado de arresto (estadio dauer) si las condiciones ambientales no son favorables para su crecimiento. En este estadio las larvas difieren morfológicamente de la larva desarrollada en condiciones normales y producen una cutícula resistente que las protege de sustancias químicas, estrés oxidativo y altas temperaturas permitiendo sobrevivir en condiciones adversas. El estadio dauer finaliza cuando las condiciones se vuelven favorables y hay alimento disponible para que se desarrolle la larva normal L4 (Corsi 2015).

1.1.3 Anatomía

C. elegans es un microorganismo pluricelular que se puede encontrar en dos formas sexuales diferentes: como hermafrodita, principalmente, o machos, aunque estos existen en una frecuencia menor al 0,2%. Los hermafroditas poseen dos ovarios, oviductos, una cavidad para almacenar esperma y un útero; mientras que los machos poseen una sola gónada, vasos eferentes y una cola especializada para la cópula (Altun 2009).

El nematodo adulto tiene un cuerpo cilíndrico alargado formado por un tubo externo compuesto por una cutícula de colágeno en la superficie exterior, hipodermis, neuronas, músculos y sistema excretor, y por un tubo interno que comprende un sistema de órganos compuesto por la boca, esófago, intestino y ano (Figura 2).

Todos estos tejidos están bajo una presión hidrostática interna que es regulada por un sistema osmoregulador (Altun 2009).

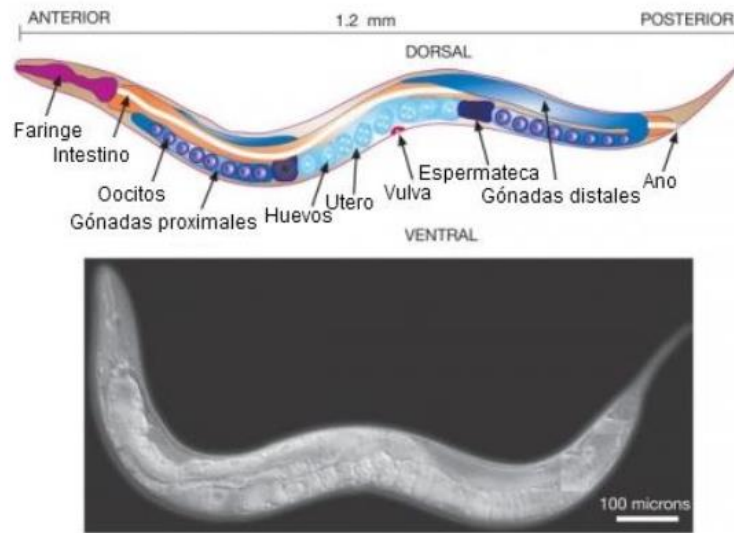


Figura 2. Anatomía de *Caenorhabditis elegans*. Adaptado de York et al. 2014.

1.1.4 Ventajas de *C. elegans* como modelo biológico

Como se nombró en el apartado general, este modelo ha sido ampliamente utilizado y validado para el estudio de enfermedades humanas porque a diferencia de otros modelos tradicionales como el ratón, resulta más económico y simple para trabajar (Yu Li et al 2013). Además, por su alta homología con los humanos a nivel molecular y genómico, y su corto periodo de vida, se puede utilizar para evaluar el envejecimiento o la longevidad (Maglioni et al. 2016). También posee características únicas que facilitan su uso para el descubrimiento de nuevos fármacos y para la evaluación de eficacia de los existentes. (Artal-Sanz et al. 2006. Ewbank et al 2011. Ahamefule et al. 2020).

A su vez, este modelo permite desarrollar investigaciones a nivel fisiológico, sin las limitaciones orgánicas que puede tener el modelo de cultivo celular (Strange et al 2007. Silverman et al. 2009). Es un modelo experimental muy útil en las áreas de biología, genética y biomedicina por la gran cantidad de características favorables que posee (Altun et al. 2012. Fire, 2007. Wah Chu et al. 2002. Yochem, 2006), entre las que se nombran:

- Mantenimiento y manipulación sencilla y de bajo costo: es capaz de crecer en placas de Petri y alimentarse de la bacteria *Escherichia Coli* (*E. coli*).

- Ahorro de tiempo: debido a su ciclo de vida, es posible obtener resultados en poco tiempo.
- Ahorro de espacio: frente a otros modelos animales de mayor tamaño.
- Mayor valor estadístico: ya que con *C. elegans* se obtienen poblaciones de 300 individuos.
- Al ser transparentes, es posible visualizarlos con más detalle con un microscopio óptico y hasta con lupa.
- Tamaño pequeño: permite realizar ensayos *in vivo* en microplacas de 96 pocillos
- Crio preservación a largo plazo: pueden congelarse en estado larvario Dauer y utilizarse cuando sea necesario.
- Se puede utilizar un único gusano para llenar la placa debido a que *C. elegans* es hermafrodita auto fertilizante.
- Existe gran similitud genética con los humanos de entre un 40%.
- A diferencia de las pruebas realizadas *in vitro*, este modelo tiene todas las propiedades fisiológicas de un animal pudiendo estudiar los sistemas orgánicos como el sistema digestivo, sensorial, neurológico, endocrinológico, metabólico, etc.

1.2 SUPLEMENTOS DIETARIOS

1.2.1 Marco normativo de Suplementos Dietarios y antecedentes

Tomando como caso internacional de referencia a la regulación de medicamentos y alimentos en Estados Unidos, la misma surge como necesidad luego de la presentación de la novela de Upton Sinclair denominada "The Jungle", que dejó en evidencia las condiciones antihigiénicas de los corrales de ganado de Chicago y el posterior envasado de la carne. Gracias a esta novela, en 1906 se aprobó la Ley de Alimentos y Fármacos Puros, que promueve las inspecciones y la descripción de los ingredientes en las etiquetas de los productos o medicamentos (Food and Drug Administration (FDA), 2018). Más tarde, en 1938 luego de producirse la muerte de más de cien personas por consumir elixir de sulfanilamida, que contenía dietilenglicol (tóxico), se aprobó una Ley que le permitió al ente estatal "Food and Drug Administration" (FDA) el control sobre los productos antes de ser comercializados (FDA Consumer magazine, 1981).

Hacia la década de 1960, se empezó a enfocar la regulación de los suplementos dietarios, en primer lugar, haciendo que se especifique qué contenía realmente cada producto. En 1989 la ingesta de suplemento dietario de L-triptófano, produjo 37 muertes y más de 1500 casos de síndrome eosinofilia-mialgia. Esto condujo a que en 1994 se decretara la ley “Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)”, donde se definió a los suplementos dietarios como *“un producto (distinto del tabaco) destinado a complementar la dieta que lleva o contiene uno o más de los siguientes ingredientes dietéticos: una vitamina; un mineral; una hierba u otro botánico; un aminoácido; una sustancia dietética para que la use el hombre para complementar la dieta aumentando la ingesta dietética total; o un concentrado, metabolito, constituyente, extracto o combinación de cualquier ingrediente descrito anteriormente”* (DSHEA 1994). Esta ley consideró a los suplementos dietarios como alimentos, no como aditivos alimentarios, por lo que no debieran seguir pautas de regulación como lo hacen con los fármacos, solo era necesario notificar a la FDA antes de su comercialización. Esta ley también marcó la importancia económica de la industria de estos productos en Estados Unidos. Aunque con la DSHEA se comienzan a tratar cuestiones relacionadas a eficacia y la realización de pruebas de seguridad, esto es una responsabilidad de los fabricantes, por lo cual la FDA solo puede retirarlos del mercado cuando se haya comprobado que algún suplemento no es seguro para su comercialización. Al no llevarse a cabo un proceso estándar de registro, como en el caso de los fármacos, esto dio lugar a que en productos que contenían una determinada molécula, no se sepa la concentración, calidad ni dosis apropiada de consumo.

En nuestro país, en el año 1992, a raíz de una intoxicación con jarabe y caramelos de propóleo contaminados con dietilenglicol que causó el fallecimiento de veinticinco personas, se creó mediante el Decreto 1490/92 la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Al igual que en Estados Unidos y otros países de alta vigilancia sanitaria, comenzó a ser necesario el control de los medicamentos y alimentos comercializados. En Argentina, las jurisdicciones bromatológicas inscriben los alimentos y suplementos de elaboración nacional, mientras que la ANMAT ejerce su actividad regulatoria para productos a exportar e importados a través del Instituto Nacional de Alimentos (INAL).

Con el objetivo de regular el registro y la posterior comercialización de suplementos dietarios, resulta necesario contar con un marco normativo bien delimitado. El Código Alimentario Argentino (CAA), puesto en vigencia por la Ley 18.284, es un reglamento técnico con disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial, que establece las condiciones básicas para la elaboración, importación y exportación de productos alimenticios. Su principal objetivo es la protección de la salud de la población, además de velar por mejorar el acceso a los alimentos y garantizar su inocuidad. Los suplementos dietarios fueron incorporados al CAA en el año 1998.

Las normativas vigentes y el CAA se encuentran en constante revisión por parte de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), creada por el Decreto 815/99. Este organismo es el encargado de proponer las modificaciones necesarias para mantener el código alimentario actualizado y adecuarlo a las necesidades nacionales y normas internacionales. Cabe aclarar que los particulares también pueden presentar sugerencias de modificaciones al CAA. Recientemente, el INAL consideró necesario actualizar el artículo 1381 del CAA, en el cual se definen los suplementos dietarios, las exigencias de rotulado y su composición (Resolución Conjunta 3/2020), con el fin de favorecer la interpretación del marco regulatorio entre las autoridades sanitarias, empresas y consumidores. Actualmente, la denominación de Suplemento dietarios se entiende como: *“productos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes y/u otros ingredientes en la dieta de las personas sanas que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales. Deberán ser de administración oral y podrán presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulado, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras), u otras formas para absorción gastrointestinal. Todos los suplementos dietarios deben ser elaborados de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura y contenidos en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos”*. (Cápitulo XVII – Alimentos de Régimen o Dietéticos).

En los últimos años se incrementó la oferta de suplementos dietarios comercializados por internet, los cuales muchos de estos productos no están registrados ni cumplen con normativa alguna. Este es un tema que preocupa mucho a las autoridades

sanitarias y a los consumidores ya que no se puede garantizar la calidad de los productos consumidos. La falta de información y de estudios realizados en estos suplementos, también a nivel local, dificulta la elaboración de pautas claras para abordar la problemática del uso, mal uso y abuso de estos suplementos. Por este motivo, resulta sumamente importante destacar el marco normativo de los suplementos dietarios para plantear y entender la problemática de estudio en este trabajo.

1.2.2 Estadísticas de consumos generales de suplementos dietarios

Los suplementos proteicos son ampliamente utilizados por atletas y personas físicamente activas con el objetivo de incrementar la masa muscular y acelerar la recuperación física luego de una actividad intensa (Draganidis *et al.* 2017, Pasiakos *et al.* 2013, Petroczi *et al.* 2008). A pesar de que su uso se encuentra discutido por la escasa evidencia científica, la suplementación proteica representa un mercado de más de 5 billones de dólares sólo en los Estados Unidos (Poulios *et al.* 2019). Además, las encuestas han revelado que casi el 50% de los 260.000.000 de estadounidenses consumen regularmente suplementos de vitaminas, minerales o hierbas como un medio para mejorar su nutrición (DSHEA 1994).

Los estudios basados generalmente en encuestas afirman que cerca de un 88% de estudiantes universitarios pertenecientes a la liga de básquetbol de los Estados Unidos son consumidores de por lo menos un suplemento dietario (Burns *et al.* 2004). Según estos estudios, los estudiantes en su mayor parte (77,07%) recurren al consejo de sus amigos para informarse sobre el consumo de suplementos, mientras que un 11,5% se informan mediante sus entrenadores y un 11,5% a través de anuncios (Colls Garrido *et al.* 2015). En general, el tipo de suplemento parece estar relacionado al tipo de deporte, los objetivos generales de los deportistas y el sexo (Garthe *et al.* 2018). También se estudió que los atletas de alto rendimiento tienen mayor tendencia al consumo de suplementos (Knapik *et al.* 2016). Además, se detectó que el consumo de suplementos dietarios por parte de atletas universitarios para mejorar su rendimiento, está asociada a una mayor tendencia al consumo de drogas (ej. alcohol) (Buckman *et al.* 2013).

Otro grupo poblacional de estudio distinto fue el personal de fuerzas armadas, donde se detectó que entre el 60% y el 70% de ellos, consume como mínimo un suplemento dietario por semana, de los cuales el 7% dijo experimentar desde su uso latidos cardíacos anormales, temblores o dolor estomacal (Austin *et al.* 2016).

Las estadísticas mencionadas anteriormente corresponden a trabajos publicados en revistas científicas de carácter internacional, basadas en encuestas realizadas, en su mayoría, a la población estadounidense. En nuestro país existe escasa o nula información al respecto de estadísticas de consumo de suplementos dietarios en esta población.

1.2.3 Contaminaciones y efectos adversos

En principio, se debe aclarar que en este Trabajo Final no se puso en discusión la calidad de los suplementos, sino que se analizaron distintos parámetros con productos ya comercializados en nuestro país, de venta al público general directo. Pero creemos que es importante mencionar los análisis realizados en base a los posibles efectos adversos y las contaminaciones encontradas en suplementos dietarios, a modo de recalcar la necesidad de continuar los estudios sobre estos productos.

Según Martínez-Sanz *et al.*, se describen dos tipos de contaminaciones en suplementos dietarios: contaminación cruzada y contaminación intencional; la primera se refiere a la transferencia de agentes contaminantes (biológicos, físicos o químicos) y puede surgir involuntariamente por la fabricación y manipulación de distintos tipos de productos en una misma planta. En cambio, la segunda se refiere al agregado intencional (adulteración) por parte del fabricante de sustancias no autorizadas o en dosis que superan los límites permitidos con el fin de mejorar o potenciar el efecto que realiza el suplemento (Martínez-Sanz *et al.* 2017).

Según bibliografía, debido a deficiencias en las prácticas de fabricación, surgen casos, por ejemplo, en donde se encontró solo un 34% de la dosis de ácido fólico indicada en el producto o también, se han encontrado niveles tóxicos de vitamina A, D, B6 y Selenio; y hasta demostrado el hallazgo de impurezas como plomo, vidrios rotos, heces de animales, etc. (Maughan 2005).

El primer estudio fue realizado en Laboratorios acreditados de la Universidad Alemana de Deportes, en Colonia, donde acreditaron que los suplementos (que no lo indicaban en su etiqueta) estaban contaminados con esteroides. El estudio se realizó utilizando técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas, hallándose nandrolona, testosterona y otros esteroides (Geyer *et al.* 2000). Luego, en esta misma institución, fue hallado el Dianabol (metandrostenolona), un esteroide anabólico “duro”, capaz de generar daño hepático y carcinogenicidad (Gmeiner *et al.* 2002). La ingesta de estos esteroides en dosis desconocidas puede generar síntomas como virilización, trastornos menstruales, ginecomastia, daño hepático, enfermedad cardiovascular, trastornos psicológicos y a largo plazo producir dependencia por un síndrome de abstinencia agudo (Geyer *et al.* 2008).

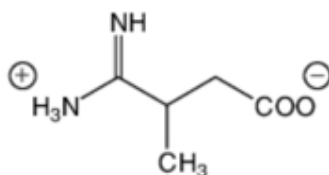
A su vez, se ha encontrado por método de espectrometría de masas lo que los autores denominaron como “esteroides de diseño”, moléculas de esteroides modificados con estructura desconocida, de los cuales no se conocen sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, asumiendo que se fabrican con el fin de aumentar las ventas de estos productos por la adicción generada de estos estimulantes, no declarados en su etiqueta (Geyer *et al.* 2008).

El servicio de emergencias estadounidense ha calculado un aproximado de veintisiete mil casos de consultas anuales por consumo de suplementos dietarios, en general, personas jóvenes con taquicardia, dolor de pecho y también dificultades para tragar (disfagia) (Geller *et al.* 2015). También, se relacionó la ingesta de suplementos con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de células germinales en testículos de hombres, potenciándose en aquellos que consumieron durante plazos prolongados, siendo menores de 25 años (Yu Li *et al.* 2015).

Además del daño que pueden llegar a producir física y psicológicamente las contaminaciones en estos productos, se detectaron casos de atletas de alto rendimiento con doping positivo por el consumo de suplementos dietarios, lo que llevó a que en Países Bajos y Alemania se creara una base de datos de suplementos dietarios de bajo riesgo (Geyer *et al.* 2008).

1.2.4 Creatina

La creatina es uno de los suplementos ergogénicos más populares en atletas. Es un ácido orgánico nitrogenado que se encuentra en mayor proporción en el músculo esquelético (Figura 3).



Creatina

Figura 3: Estructura de la Creatina.

La creatina se produce de forma endógena en hígado, riñón y páncreas a partir de los aminoácidos metionina, glicina y arginina (Butts *et al.* 2018). Se encuentra estrictamente regulada, con un balance entre la síntesis, sus niveles en sangre y su excreción (Havenetidis 2016). Las células con requerimientos altos de energía utilizan la creatina en forma de fosfocreatina como fuente de fosfato para producir ATP.

En los primeros estudios donde se documentó el aumento de la masa muscular utilizando suplementación con creatina, concluyeron que esta suplementación incrementó un 20% la concentración de creatina en el músculo (Harris *et al.* 1992). Estudios más modernos declaran que la suplementación con creatina incrementa la masa corporal como así también la fuerza, la explosividad y la eficacia en ejercicios de corta duración con alta intensidad (Greydanus *et al.* 2010). Un meta-análisis realizado en 2003 (Branch 2003) comparó 100 estudios concluyendo que la suplementación con creatina mejora el rendimiento en ejercicios realizados en laboratorio, pero no en deportes específicos como fútbol (Claudino *bet al.* 2014, Williams *et al.* 2014), tenis (Pluim *et al.* 2006) y natación (Thompson *et al.* 1996), entre otros. Sin embargo, otros estudios han demostrado que los atletas con niveles basales más altos de creatina no han evidenciado las mejoras antes mencionadas, sugiriendo una inconsistencia en los resultados de los diferentes ensayos con respecto a la suplementación con creatina (Lemon 2002). En línea con lo demostrado, se han reportado escasos efectos adversos donde el más destacable es el aumento de peso

(Buford *et al.* 2007, Greenwood *et al.* 2003, Kreider *et al.* 2003, Rodriguez *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2016).

La ingesta de suplemento dietario de creatina ha sido avalada por numerosos profesionales, destacando efectos positivos si se administra de forma adecuada, como aumento de masa muscular y fuerza, menor fatiga durante los entrenamientos y beneficios asociados a distintos tipos de enfermedades como miopatías, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades reumáticas, etc. (Kreider *et al.* 2017). Cabe destacar que en numerosas publicaciones acerca de los efectos positivos para la salud que tiene la ingesta de creatina, se han declarado conflicto de intereses o auspicio por parte de fabricantes de los mismos.

Por otro lado, otras publicaciones científicas afirman que el consumo de creatina *per se*, no sería dañino, pero al degradarse puede transformarse en sarcosina, metilamina y formaldehído, moléculas citotóxicas que pueden dañar el epitelio intestinal, células endoteliales y perjudicar la función renal, por lo que indican que su consumo a largo plazo aun no debería estar definido como seguro para la salud (Davani-Davari *et al.* 2018). Otro estudio sugiere que la ingesta de creatina como suplemento, genera en el organismo una menor expresión de creatina por lo menos en los músculos esqueléticos lográndose un balance homeostático, pero que a su vez el exceso de consumo podría perjudicar la función renal (Poortmans *et al.* 2000).

En resumen, el uso de la suplementación con creatina a corto plazo es considerada segura y sin efectos adversos significativos. Sin embargo, permanecen inciertos los efectos en la práctica deportiva (Butts *et al.* 2018) y en su utilización a largo plazo ya que los estudios son escasos (Close *et al.* 2016).

1.2.5 Glutamina

La glutamina es un aminoácido neutral no esencial compuesto por 5 átomos de Carbono y su peso molecular es de 146.15 KDa (Roth 2008). La concentración de glutamina disponible en el cuerpo depende del balance entre la síntesis y la liberación de este, como también del consumo de los tejidos y órganos (Cruzat *et al.* 2018). Es el aminoácido más abundante y versátil en el cuerpo

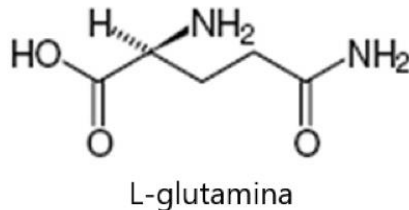


Figura 4: Estructura de la L-glutamina.

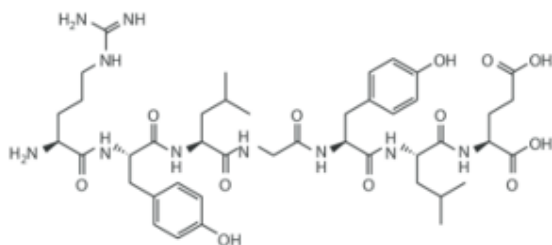
La glutamina forma parte de procesos biológicos relacionados con la proliferación de linfocitos, producción de citoquinas, actividad fagocítica de los macrófagos y la actividad antibacteriana de los neutrófilos (Cruzat *et al.* 2018) (Figura 4). Además, juega un rol importante en otras funciones biológicas como la producción de energía, la glucogénesis, mantenimiento del equilibrio ácido-base, entre otros (Coqueiro *et al.* 2019).

El uso cotidiano de la glutamina en la suplementación deportiva, radica en sus propiedades “anti fatiga”, el cual es un fenómeno de múltiples causas definido como la imposibilidad de mantener fuerza resultando en una incapacidad física y mental (Finsterer 2012). Sin embargo, se necesita un mayor conocimiento y estudios que confirmen esta propiedad.

Según Ahmadi *et al.* quien realizó un meta-análisis sobre este aminoácido, concluyó entre 47 estudios, que la suplementación con glutamina no tiene efectos en el sistema inmune del atleta, ni en la performance aeróbica, ni en la composición corporal. Sin embargo, se observó que hubo una disminución importante del peso corporal y pareciera que estos resultados dependen de la dosis y el tipo de suplemento suministrado (Ramezani Ahmadi *et al.* 2019).

1.2.6 Caseína (como caseinato de calcio o calcaseína)

La caseína es una proteína de alto valor biológico que se encuentra en una alta proporción en la leche bovina (Figura 5). Su función biológica consiste en transportar calcio y fosfatos al estómago con el fin de lograr una correcta digestión (Haug *et al.* 2007).



Caseína

Figura 5: Estructura de la caseína.

Es un suplemento muy popular, de lenta digestión cuya función consiste en disminuir el metabolismo de los aminoácidos y con ello prolongar la síntesis de proteínas. Además, previene la degradación muscular e incrementa la composición corporal (Kunz *et al.* 1990).

Un estudio realizado afirma que aquellas personas que consumieron caseína (además de una dieta hipocalórica y un entrenamiento de resistencia) incrementaron al doble su masa muscular en comparación con el grupo control (Demling *et al.* 2000). Misma conclusión obtuvieron en otro estudio reforzando esta idea con la salvedad que la ingesta de caseína fue antes de dormir (Snijders *et al.* 2015).

Actualmente, existen pocos estudios al respecto. La mayoría de ellos evalúa los efectos a corto plazo y no tienen en cuenta las consecuencias que podría tener en la salud si esta suplementación se mantiene por un periodo de tiempo prolongado. Ciertas páginas de nutrición que se encuentran en la web citan estos trabajos a corto plazo y aseguran que no poseen ningún efecto adverso cuando en realidad no existen estudios que así lo demuestren. Estas páginas están enfocadas en vender el producto y la información que brindan está sesgada para su beneficio.

1.2.7 Quemadores de grasa

El término “quemador de grasa” es utilizado para describir un tipo de suplemento nutricional que promete incrementar el metabolismo y disminuir la absorción de las grasas, incrementar la pérdida de peso e incrementar la oxidación de las grasas durante el ejercicio. Los más populares están compuestos por cafeína, té verde, ácido linoleico,

carnitina, entre otros; los cuales actúan principalmente aumentando la tasa de oxidación de las grasas y el glucógeno almacenado en el músculo (Jeukendrup *et al.* 2011).

La mayoría de los estudios con quemadores de grasa están realizados en animales y son a corto plazo. Para la mayoría de estos suplementos hay una clara falta de datos científicos. Sin embargo, podemos decir que, analizando los estudios existentes, hay evidencia que la cafeína (Berube-Parent *et al.* 2005) y el té verde (Shimotoyodome *et al.* 2005) poseen propiedades que aumentan el metabolismo de las grasas.

Los primeros estudios mostraron que la ingesta de cafeína justo antes de un ejercicio vigoroso elevaba significativamente la tasa de oxidación de grasas como así también el rendimiento que estaría dado por la movilización de la grasa y el glucógeno del musculo (Costill *et al.* 1978, Essig *et al.* 1980). Además, la cafeína fue asociada con tener un efecto directo en la lipólisis. Esto fue descripto en un estudio *in vitro* donde la cafeína inhibió a la fosfodiesterasa, la enzima responsable de la degradación de AMP (AMPc) el cual estimula la lipólisis (Leijten *et al.* 1984). Sin embargo, como se viene repitiendo en muchos de los suplementos, no está estudiado si este efecto se produce *in vivo*.

Para el caso del té verde, se han realizado estudios en animales que apoyan la idea que realizar una suplementación con dicho componente aumenta significativamente la tasa de oxidación de las grasas durante el ejercicio (Murase *et al.* 2005, Murase *et al.* 2006). Sin embargo, otro estudio analizó la suplementación con té verde a largo plazo demostrando que la ingesta crónica de este suplemento en humanos disminuye la capacidad respiratoria de los mismos (Ichinose *et al.* 2011).

Como se describió con la mayoría de los suplementos nutricionales, hay una clara falta de estudios en humanos a largo plazo para evaluar su inocuidad (Jeukendrup *et al.* 2011). Tristemente, la lista de quemadores de grasa sigue en aumento y es muy poco probable que la evidencia científica pueda ir acompañada con ese crecimiento.

1.2.8 Ovoalbúmina (comercializado como Omelette)

La ovoalbúmina (Figura 6) es la proteína principal de la clara de huevo que suele comercializarse como suplemento dietario de forma deshidratada y pasteurizada.

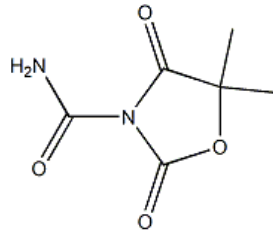


Figura 6: Estructura de la Ovoalbúmina.

En el organismo, la albúmina se sintetiza en el hígado y se encuentra presente en el plasma sanguíneo (seroalbúmina). Es extremadamente importante para el mantenimiento del pH y el transporte de nutrientes como el calcio, magnesio y las grasas, además de participar en el transporte de la bilirrubina y ciertos fármacos (Kratz, 2008). También se han observado aplicaciones medicinales de la ovoalbúmina relacionadas a la supresión de tumores malignos ya que ha sido reportado que posee factores liberadores de necrosis tumoral (Kovacs-Nolan *et al.* 2000).

En cuanto a su uso en la suplementación deportiva, se cree que la albúmina de huevo mejora la función metabólica y la salud muscular favoreciendo el desarrollo de los músculos y la síntesis proteica. Se emplea, sobre todo en el culturismo para ganar fuerza y acelerar la recuperación de los músculos luego del entrenamiento (Hida *et al.* 2012). Sin embargo, los informes científicos que avalan su uso como suplemento dietario son escasos y se desconocen sus efectos a largo plazo.

1.3 IMPORTANCIA DEL PROYECTO

El consumo de suplementos dietarios ha incrementado alrededor de todo el mundo. Por ejemplo, el 80% de los jóvenes en etapa universitaria los consumen para mejorar su rendimiento físico y mental (Colls Garrido *et al.* 2015), como así también el 70% de los integrantes de las fuerzas armadas (Austin *et al.* 2016) o deportistas profesionales (dado que su consumo no es motivo de dopaje positivo).

Si bien hay escasas publicaciones científicas a nivel internacional que relacionan el consumo de suplementos dietarios con problemas renales, hepáticos o neurológicos; existe cierta controversia al respecto y aún no se realizaron estudios en Argentina en individuos que los hayan ingerido por un largo periodo de tiempo. Por este motivo, es importante enfocar nuevos estudios que evalúen los efectos a largo plazo para definir la inocuidad de los suplementos y las cantidades adecuadas de consumo para evitar posibles efectos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue evaluar los efectos a largo plazo de diferentes suplementos dietarios a base de proteínas sobre la longevidad y resistencia al estrés oxidativo utilizando como modelo de estudio al nematodo *Caenorhabditis elegans*.

2.2 Objetivos específicos

- Puesta a punto de los protocolos de mantenimiento y manipulación del modelo biológico *C. elegans*, a través del uso de equipamiento de UADE Labs.
- Puesta a punto de los protocolos de exposición a los suplementos dietarios.
- Determinar las concentraciones óptimas de cada suplemento, para las cuales el ensayo se hace posible.
- Registrar los efectos de las distintas concentraciones de los suplementos dietarios sobre la longevidad y resistencia al estrés oxidativo del nematodo.

3. HIPÓTESIS

El suministro a largo plazo de suplementos dietarios posee un impacto directo en la longevidad y resistencia al estrés oxidativo en el modelo de *C. elegans*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología, cito en el noveno piso del edificio UADE Labs. Las instalaciones de este laboratorio cuentan con los equipamientos necesarios para todas las actividades realizadas en este estudio. Los equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo fueron:

- Cava
- Estufa incubadora
- Estufa incubadora de agitación
- Freezer y heladera
- Microscopio óptico
- Lupa estereoscópica
- Centrifuga
- Balanza
- Autoclave - esterilizador a vapor
- Cabina de Flujo laminar

4.1 Material biológico

La cepa utilizada de *C. elegans* en este proyecto fue la N2 (cepa silvestre o wild type), que al igual que la bacteria *Escherichia coli* OP50, utilizada como fuente de alimento, fueron proporcionadas por el laboratorio de UADE (UADE Labs). También, se contactó al Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (CONICET-UBA), quien concedió una alícuota de los nematodos, con el fin de corroborar que la cepa se siga manteniendo “wild type” para normalizar los ensayos, dado que con el paso generacional pueden sufrir algunas mutaciones.

4.2 Cultivo y mantenimiento de *C. elegans*

Se cultivó a los nematodos a 20°C en placas de Petri con medio agar sólido NGM (Nematode Growth Medium) (Anexo 1) selladas con parafilm para evitar la deshidratación del medio y mantener las condiciones en estado óptimo (Figura 7).

Las bacterias *E. coli* utilizadas como alimento de los nematodos, se cultivaron en caldo LB (Lysogeny Broth) esterilizado y se las incubó a 37°C durante toda la noche en estufa de agitación. Luego se mantuvieron en heladera a 4°C hasta su inoculación en superficie de placas con medio NGM.

Con el fin de mantener a los nematodos en una cantidad aceptable por placa y evitar hacinamiento, falta de alimento o deterioro del medio de cultivo, se utilizó medio M9 para lavar las placas, manteniendo en suspensión a los mismos e inocular otra placa nueva con una alícuota de ellos. También se utilizaron pequeños recortes de placas anteriores para posterior siembra de éstos en placas nuevas con césped de bacterias para mantenimiento.



Figura 7. *C. elegans* en placa de Petri con medio NGM.

4.3 Sincronización de gusanos

Se llevó a cabo el proceso de sincronización de *C. elegans* para iniciar cada ensayo con los nematodos en un mismo estadio larvario, es decir, realizar el conteo diario de forma estandarizada, corroborando que el inhibidor de la reproducción de los nematodos sea efectivo y no se reproduzcan (lo que podría cambiar drásticamente los resultados). Por lo cual, se mantuvieron los huevos y las larvas fueron eliminadas (Figura 8). Luego

de este tratamiento, que se describirá a continuación, los huevos eclosionaron y de esa forma se obtuvo a todos los nematodos del ensayo en el mismo estadio.

Para dar inicio a la sincronización, es óptimo contar con placas de nematodos alimentados al menos dos o tres días antes, dado que, en esas condiciones, poseen una reproducción exponencial, lo que se traduce en mayor cantidad adultos con huevos en su interior.

La sincronización comenzó al realizar un lavado de las placas con medio M9 y recolectar la suspensión con los nematodos en tubos Falcon de 15ml. Luego de una centrifugación de aproximadamente 20 segundos a 3400 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó la solución de sincronización (Anexo 1) que contiene hidróxido de sodio y cloro, y se agitó suavemente por 4 minutos. Dicha solución de sincronización fue corrosiva para los adultos, liberando los huevos al medio. Luego se realizó una centrifugación de 20 segundos a 3400rpm para obtener un precipitado con los huevos, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con medio M9 para diluir a la solución de sincronización y que la misma deje de actuar, para así preservar a los huevos. El precipitado obtenido con los huevos se conservó en un tubo Falcon con agregado de Amoxicilina para evitar contaminaciones. Los huevos eclosionaron a larva L1 y continuaron su desarrollo hasta dauer en el tubo Falcon, estancando su crecimiento en ese estadio hasta tanto no se le suministre alimento.

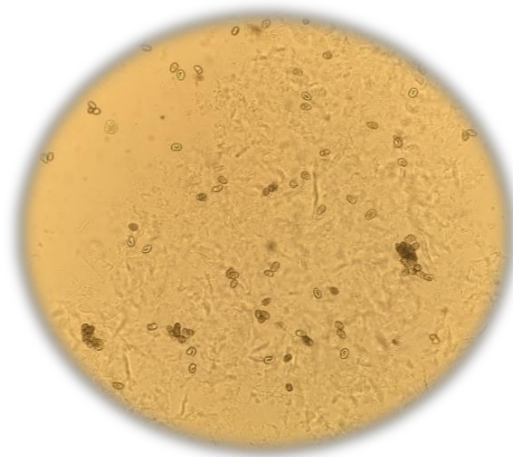


Figura 8. Huevos de C. elegans obtenidos a partir de la sincronización.

4.4 Preparación de los nematodos para los diferentes ensayos

Se utilizó una solución FUDR-Mix (5-fluoro-2'-deoxyuridine) (Anexo I) con el fin de inhibir la reproducción de los nematodos para utilizarlos en los ensayos de longevidad y resistencia al estrés oxidativo. La solución FUDR se obtuvo comercialmente por la empresa Sigma Aldreich®.

Para la preparación de los nematodos con la solución FUDR-Mix se tomaron tres alícuotas de 10ul de la solución que contenía los nematodos en estadio dauer (es decir, luego de la sincronización) en portaobjetos y se realizó un conteo visual de los mismos con el microscopio óptico, con el fin de establecer la concentración que había de los mismos en ese volumen y realizar los cálculos pertinentes para la obtención de 20 nematodos por pocillo para cada ensayo (Figura 9).

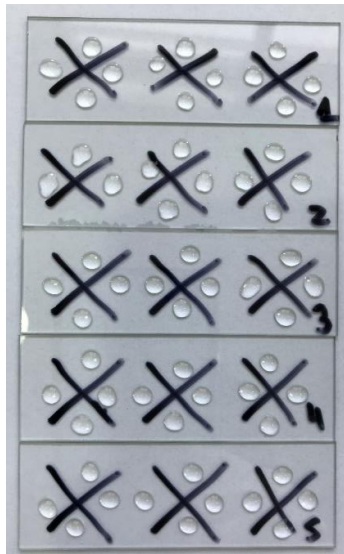


Figura 9. Portaobjetos para la contabilización promedio de *C. elegans*

El volumen final para cada pocillo previo al tratamiento fue de 400ul, incluyendo en este volumen lo necesario según la concentración de la solución con nematodos (20 en cada pocillo), 0,8ul de FUDR (para los ensayos correspondientes), 4ul de antibiótico, 50ul de solución con bacterias *E. coli* OP50 como alimento y medio S hasta completar volumen.

4.5 Elección y administración de los suplementos

Para desarrollar este Trabajo Final se eligió la marca Pulver, de origen y producción nacional, dado que no existe información acerca de testeos en productos desarrollados en nuestro país. Los suplementos dietarios fueron obtenidos en un local comercial (farmacia) y son de venta libre para el público en general. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en una investigación previa realizada en esta misma Institución, donde se concluyó que el suministro de carbohidratos en este modelo, afecta negativamente la longevidad de los nematodos (Santoro *et al.* 2016), seleccionamos aquellos suplementos que contenían cantidades "no significativas" de carbohidratos según el valor establecido en el CAA ($\leq 0,5g$) (Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los Alimentos. CAA). La información nutricional de cada suplemento se encuentra en el Anexo 2 y se puede consultar en la página web de Pulver (www.pulver.com.ar) o en los rótulos de cada producto.

Se administró como tratamiento cada suplemento por separado, en dos pulsos de 100ul cada uno. El primer pulso fue administrado el primer día del ensayo y el segundo pulso al cuarto día del ensayo. Esto se justifica dado que el objetivo de este estudio es analizar los efectos a largo plazo en este modelo, el cual culmina con las mediciones al octavo día del ensayo. Se analizaron tres concentraciones distintas de cada suplemento (0,01gr/ml, 0,025gr/ml y 0,05gr/ml), realizando cada tratamiento por triplicado, basadas en el ensayo de supervivencia, a fin de que se pueda relacionar con el tiempo de vida de los nematodos (ver Anexo 3).

4.6 Ensayo de longevidad

Los nematodos sincronizados se cultivaron en placas multiwell de 24 pocillos, en conjunto con la solución FUDR-Mix a tres concentraciones distintas (0,01gr/ml, 0,025gr/ml y 0,05gr/ml para cada suplemento) adicionando 100ul de cada suplemento en dos oportunidades, una al segundo día del ensayo y otra al cuarto día. Se realizó un conteo inicial de cuantos nematodos se encontraban por pocillo. Luego se realizó un conteo diario de nematodos muertos por cada pocillo por el término de ocho días consecutivos. La diferencia fisiológica de los nematodos muertos radica en la postura recta que

adquieren, mientras que los vivos, aunque no estén en movimiento, poseen una curvatura característica (Figura 10).



Figura 10. Cultivo de C. elegans en placa con medio NGM. Se observan gusanos vivos (curvos) mientras que los gusanos muertos se observan de forma recta y sin movimiento.

4.7 Ensayo de resistencia al estrés oxidativo

El estrés oxidativo se origina cuando existe un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y/o una disminución de los antioxidantes en la célula. Los ROS tienen un rol importante como segundos mensajeros en diferentes cascadas de señalización intracelular destinadas a mantener la célula en homeostasis con el entorno y también están implicados en la defensa contra agentes infecciosos. El desequilibrio por sobreproducción de ROS y una reducción del mecanismo de defensa antioxidante, puede causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres los cuales dañan los componentes de la célula (proteínas, lípidos y ADN, entre otros) generando pérdida de función e incluso muerte celular (Carvajal 2019, Diez *et al.* 2021).

El fin de este ensayo, fue determinar si los suplementos proporcionan una resistencia al estrés oxidativo luego de la incorporación de peróxido de hidrógeno como agente inductor, o si, por el contrario, lo aumentan provocando entonces un daño orgánico.

Luego de la sincronización, al igual que en el ensayo de longevidad, los nematodos se cultivaron en placas multiwell de 24 pocillos en conjunto con solución FUDR-mix a tres concentraciones distintas de suplementos (0,01gr/ml, 0,025gr/ml y 0,05gr/ml para cada suplemento) y 50 mM de peróxido de hidrogeno cuya concentración fue establecida según bibliografía al respecto (Romanowski 2013). Se realizó un conteo inicial (día 0) de cuántos nematodos se encontraban por pocillo. Luego se realizó un conteo diario de nematodos muertos por cada pocillo por el término de 8 días consecutivos.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los ensayos de longevidad y resistencia al estrés oxidativo se analizaron con el programa estadístico InfoStat. Debido a la naturaleza de las variables se decidió utilizar el modelo estadístico ANOVA no paramétrico (Prueba de Kruskal-Wallis) ya que las muestras eran aleatorias e independientes, pero no cumplían con el supuesto de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk), ni de homocedasticidad (Prueba de Levene). La unidad experimental utilizada fue cada pocillo de las placas multiwell con un promedio de 20 gusanos y el nivel de significación en todo el análisis fue del 5%. Luego, se realizó la prueba de comparaciones de Tukey para verificar si existía diferencia significativa entre los grupos.

Este análisis se repitió para las tres concentraciones de suplementos utilizadas en este trabajo (0,01 gr/ml, 0,025 gr/ml y 0,05 gr/ml) tanto para el ensayo de longevidad como para el ensayo de resistencia al estrés oxidativo.

Siendo el mismo análisis estadístico aplicado a todas las concentraciones, a continuación, se detalla el análisis realizado para el ensayo de longevidad y para el ensayo de resistencia al estrés oxidativo, según la aplicación de 0,05 gr/ml de cada suplemento. Se eligió detallar la aplicación de mayor concentración debido a que en esta se observaron las diferencias más significativas y mayor diferenciación entre grupos respecto del grupo control.

En los Anexos 5 y 7 está descripto el mismo análisis para las aplicaciones de menor concentración (0,01 gr/ml y 0,025 gr/ml, respectivamente para cada ensayo).

5.1 Análisis estadístico general del ensayo de longevidad

Tras el agregado de los diferentes suplementos dietarios y el conteo diario de los nematodos muertos, se obtuvieron los porcentajes de mortalidad descriptos en el Anexo 4. Para visualizar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el grupo control, los resultados fueron reflejados en barras de porcentaje de mortalidad según cada suplemento al final de la observación, en las dosis de 0,05gr/ml de tratamiento (Gráfico 1), 0,025gr/ml de tratamiento (Gráfico 2) y 0,01 gr/ml de tratamiento (Gráfico 3):

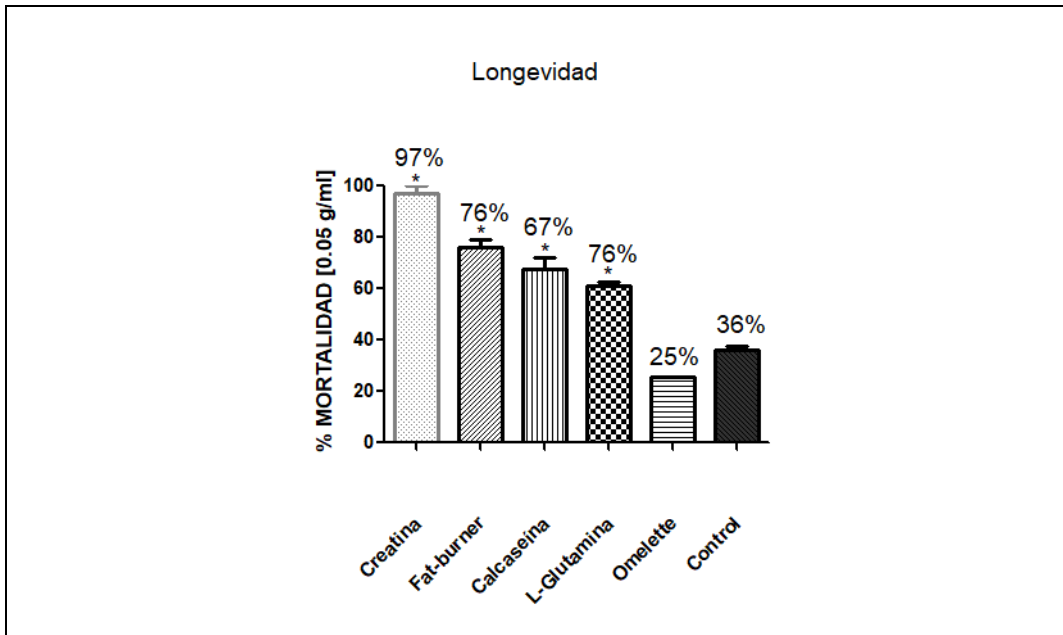


Gráfico 1. Gráfico de barras sobre promedios de porcentaje de mortalidad al final del tratamiento, según la aplicación de 0,05gr/ml de suplementos. De la prueba de Tukey realizada resulta que el Omelette y el grupo control son similares, no hay diferencia significativa. Pero con respecto a L- Glutamina, Calcaseína y Fat Burner sí hay diferencia respecto del grupo control. Sin embargo, la diferencia significativa más pronunciada es entre el grupo control y Creatina. Es decir, la administración de suplementos (excepto el omelette) a largo plazo, perjudicó significativamente la longevidad de los nematodos. Se utilizó un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).

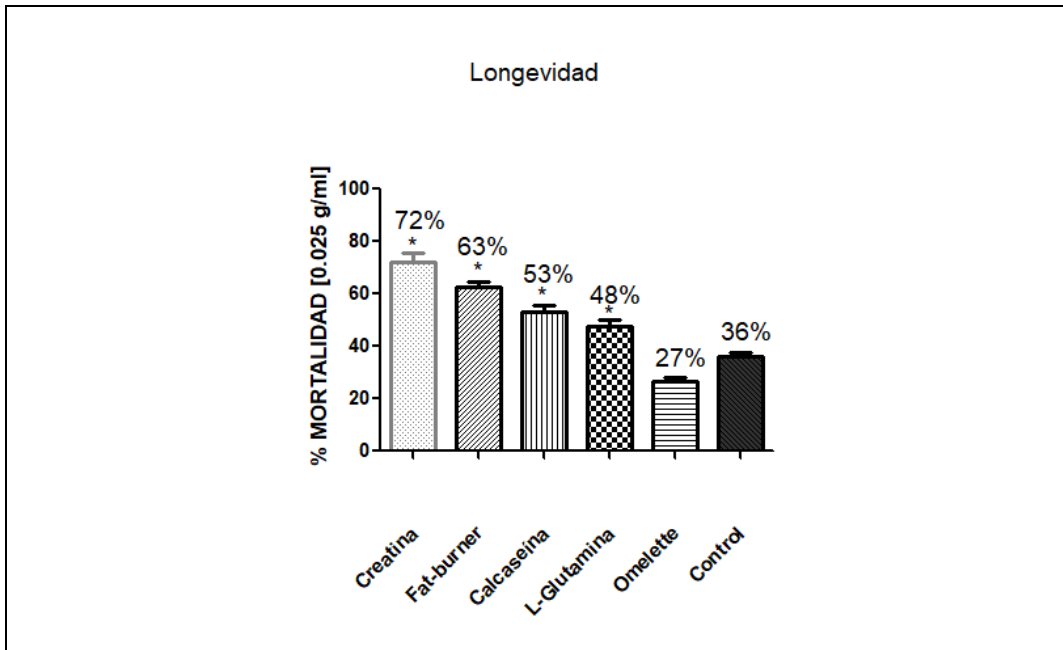


Gráfico 2. Gráfico de barras sobre promedios de porcentaje de mortalidad al final del tratamiento, según la aplicación de 0,025gr/ml de suplementos. En este caso, se sostiene que el suplemento omelette arrojó resultados similares al grupo control, mientras que se diferenció la L-Glutamina; más pronunciadamente Calcaseína y Fat burner (pero no hay diferencias entre estos últimos). Como en el caso anterior, se sostiene a la Creatina como la diferencia más significativa respecto del grupo control, es decir, con los efectos negativos a largo plazo más pronunciados. Se utilizó un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).

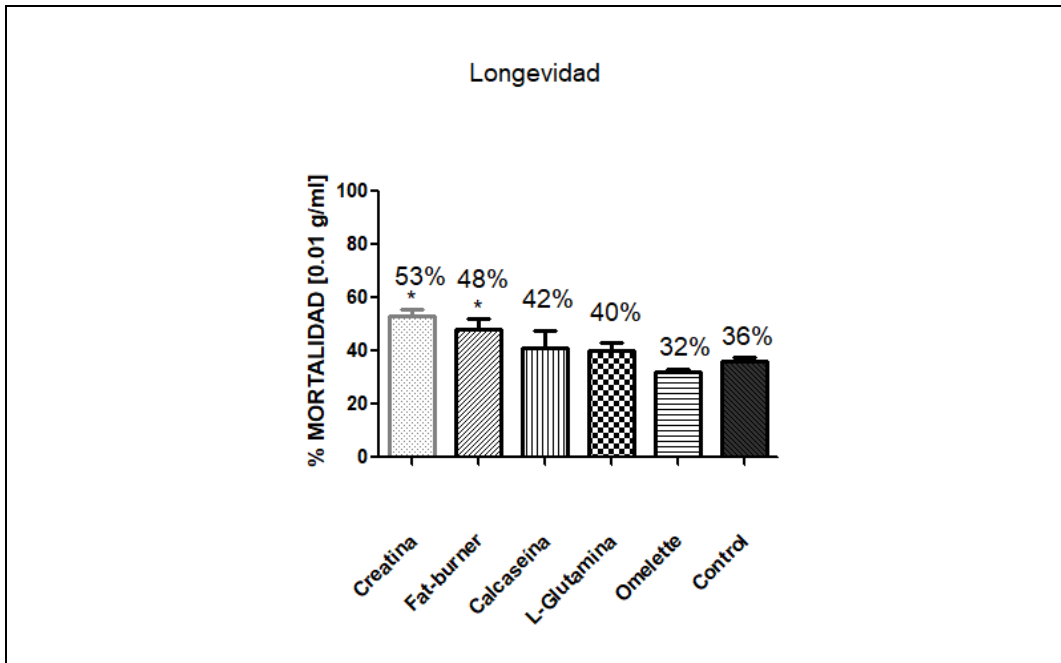


Gráfico 3. Gráfico de barras sobre promedios de porcentaje de mortalidad al final del tratamiento, según la aplicación de 0,01gr/ml de suplementos. En este caso de menor dosis aplicada de los tratamientos, el grupo control no posee diferencias significativas con Omelette, L- Glutamina ni Calcaseína. Sin embargo, se sostiene la diferencia entre grupo control con respecto al Fat Burner y Creatina (aunque no existen diferencias entre estos últimos). Incluso en la menor dosis aplicada, se encuentra diferencia significativa con estos tratamientos, indicando efectos perjudiciales a largo plazo en la longevidad de los nematodos. Se utilizó un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).

Se puede observar que, a mayor dosis de exposición de los nematodos a los distintos tratamientos, mayor es el porcentaje de mortalidad de los mismos y mayor diferenciación entre los distintos grupos respecto del control. La excepción de esto es el caso del Omelette (ovoalbúmina) donde a mayor concentración de suplemento, se redujo el porcentaje de mortalidad de los nematodos. En el caso del agregado de 0,01gr/ml produjo un 32% de mortalidad. En el agregado de 0,025gr/ml produjo un 27% de mortalidad y en el caso del último tratamiento con 0,05gr/ml produjo un 25% de

mortalidad. Sin embargo, luego del análisis estadístico, no hay diferencia significativa respecto del grupo control en estas dosis aplicadas.

Con estos datos recabados de los porcentajes de mortalidad obtenidos, se procedió a analizarlos con el programa InfoStat para obtener la relevancia estadística fehaciente, según cada dosis de análisis y según el paso de los días con los distintos tratamientos. Se describe a continuación solo la dosis de 0,05gr/ml de aplicación de los distintos tratamientos, para mejor visualización también de las diferencias significativas. Como mencionamos anteriormente, el análisis correspondiente a las concentraciones de 0,01gr/ml y 0,025gr/ml para este ensayo de longevidad, se describió en el Anexo 5.

5.1.1 Análisis estadístico del ensayo de longevidad con 0,05gr/ml de los distintos tratamientos:

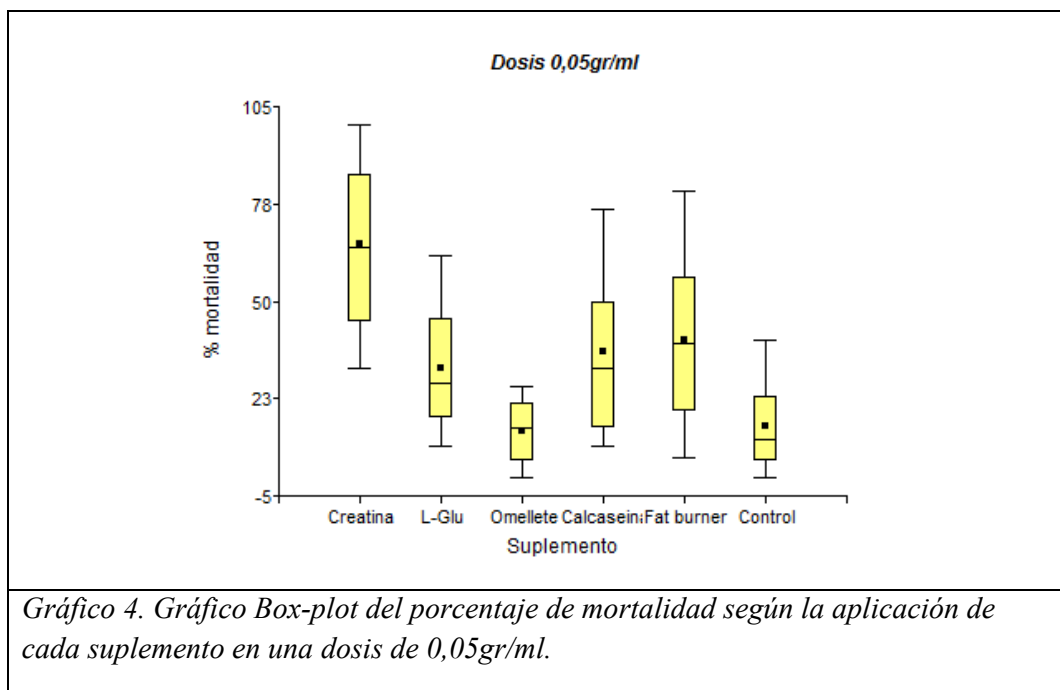
En primer lugar, de los datos surgidos se evalúa las medidas de resumen en esta dosis de tratamiento con los suplementos:

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Calc caseína	% mortalidad	24	35,83	19,47	54,34	31,00
Control	% mortalidad	24	14,50	11,59	79,94	11,00
Creatina	% mortalidad	24	66,38	22,99	34,63	65,00
Fat burner	% mortalidad	24	38,92	22,29	57,28	38,00
L-Glu	% mortalidad	24	31,25	17,28	55,28	27,00
Omellete	% mortalidad	24	13,21	8,94	67,68	14,00

Tabla I. Medidas de resumen del análisis de la variable porcentaje de mortalidad, con el agregado de 0,05gr/ml de los distintos suplementos.

Con este análisis se puede observar la media (o promedio) del porcentaje de mortalidad de cada suplemento, así como el desvío estándar y el coeficiente de variación. Describiendo la media en orden creciente se puede ordenar: Omellete, Control, L-Glu, Calc caseína, Fat Burner, y por último nuevamente, Creatina. En cuanto al coeficiente de variación, en todos los tratamientos aplicados supera el 20%, lo que indica que los datos no son homogéneos.

Para observar la presencia o ausencia de datos atípicos y ver gráficamente las medidas de resumen se realizó el siguiente box-plot.



Se puede inferir que no hay presencia de datos atípicos y que en general, en todos los tratamientos e incluso en el control, la media y la mediana son relativamente cercanas. Gráficamente se observa cierta similitud entre el porcentaje de mortalidad del omellete con respecto al control, pero sin diferencia significativa como se demuestra más adelante.

Al haber planteado un modelo estadístico ANOVA, se postula como hipótesis nula o H0:

H0: El porcentaje de mortalidad de nematodos no varía con el agregado de 0,05gr/ml de suplementos dietarios con respecto del tratamiento control

Por lo tanto, se postula como H1:

H1: El agregado de 0,05gr/ml de suplementos dietarios influye en el porcentaje de mortalidad de nematodos.

Para llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente a este modelo, se observó nuevamente si se cumplía con los siguientes supuestos:

- 1- Muestras aleatorias y observaciones independientes: la preparación de los nematodos para la aplicación de los tratamientos y la forma de observación según cada pocillo demuestra que se cumplió con este supuesto.
- 2- Supuesto de normalidad: para ello se realizó la Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Esta prueba exige plantear hipótesis según el comportamiento de la variable:

Hipótesis nula H0: La variable (porcentaje de mortalidad) tiene comportamiento normal.

Hipótesis H1: La variable (porcentaje de mortalidad) no tiene comportamiento normal.

En la Tabla II se puede observar que no todos los tratamientos resultan normales dado que no en todos los casos se cumple que el p -valor sea menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto de normalidad no se cumple, es decir, hay evidencia de que la variable no se distribuye normalmente en todos los tratamientos con una dosis de 0,05gr/ml.

Shapiro-Wilks (modificado)						
Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Calc caseína	% mortalidad	24	35,83	19,47	0,91	0,1156
Control	% mortalidad	24	14,50	11,59	0,89	0,0383
Creatina	% mortalidad	24	66,38	22,99	0,89	0,0424
Fat burner	% mortalidad	24	38,92	22,29	0,91	0,0966
L-Glu	% mortalidad	24	31,25	17,28	0,88	0,0213
Omellete	% mortalidad	24	13,21	8,94	0,87	0,0129

Tabla II. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de normalidad con una dosis de 0,05gr/ml de los distintos tratamientos.

3- Supuesto de Homocedasticidad: Se corroboró este supuesto mediante la Prueba de Levene. Las hipótesis de esta prueba fueron:

Hipótesis nula H0: Varianzas del porcentaje de mortalidad en los distintos tratamientos con una dosis de 0,05gr/ml no difieren respecto del control.

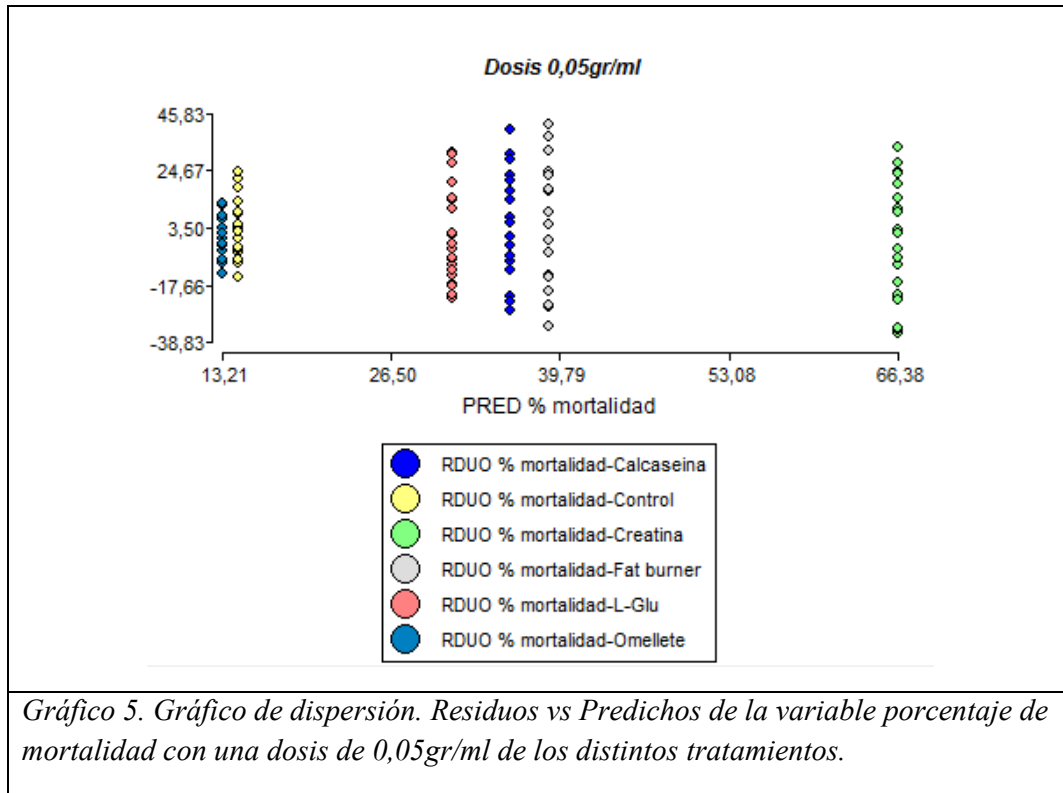
Hipótesis H1: Al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad con dosis de 0,05gr/ml difiere respecto del control.

En la Tabla III se puede ver el análisis de los residuos de la variable, donde resulta que las varianzas del porcentaje de mortalidad en los tratamientos no son iguales al control, dado que el p -valor arrojado fue menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto no se cumple, es decir, al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad difiere respecto del control.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS % mortalidad	144	0,20	0,17	62,97	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2783,52	5	556,70	6,75	<0,0001
Suplemento	2783,52	5	556,70	6,75	<0,0001
Error	11375,12	138	82,43		
Total	14158,64	143			

Tabla III. Prueba de Levene. Análisis de los residuos absolutos las varianzas del porcentaje de mortalidad en los distintos tratamientos con 0,05gr/ml de estos.

A su vez, se realizó un análisis mediante gráfico de dispersión, donde el eje Y corresponde a los residuos de la variable porcentaje de mortalidad (es decir, la diferencia entre el valor real de la variable y el valor propuesto para la misma) y el eje X corresponde a los predichos de la variable. Este gráfico permite analizar si están vinculadas linealmente. Al observar el gráfico 5, se puede apreciar la variabilidad entre el grupo control y los distintos tratamientos. Gráficamente, el suplemento omellete es el más cercano al grupo control, mientras que el más alejado es la creatina.



Debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad, ni de homocedasticidad exigido por el modelo de análisis de la varianza paramétrica, se procedió a realizar un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis. Las hipótesis exigidas por esta prueba son:

Hipótesis nula H0: El porcentaje de mortalidad en los tratamientos expuestos a 0,05gr/ml de los suplementos no difiere de su tendencia central.

Hipótesis H1: El porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,05gr/ml de los suplementos, difiere de su tendencia central.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Suplemento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% mortalidad	Calc caseína	24	35,83	19,47	31,00	70,04	<0,0001
% mortalidad	Control	24	14,50	11,59	11,00		
% mortalidad	Creatina	24	66,38	22,99	65,00		
% mortalidad	Fat burner	24	38,92	22,29	38,00		
% mortalidad	L-Glu	24	31,25	17,28	27,00		
% mortalidad	Omellete	24	13,21	8,94	14,00		

Tabla IV. Prueba de Kruskal Wallis. Análisis de la varianza no paramétrica.

Mediante este análisis, se infiere que al no superar el nivel de significación del 5%, ($p < 0,05$), se debe rechazar H_0 , es decir, el porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,05gr/ml de los suplementos difiere de su tendencia central.

Para observar las comparaciones entre grupos, se realizó la prueba de comparaciones de Tukey:

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	45437,39	5	9087,48	28,44	<0,0001
Suplemento	45437,39	5	9087,48	28,44	<0,0001
Error	44097,25	138	319,55		
Total	89534,64	143			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14,73397

Error: 319,5453 gl: 138

Suplemento Medias n E.E.

Omellete	13,21	24	3,65	A
Control	14,50	24	3,65	A
L-Glu	31,25	24	3,65	B
Calc caseína	35,83	24	3,65	B
Fat burner	38,92	24	3,65	B
Creatina	66,38	24	3,65	C

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

Tabla V. Prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,05gr/ml de los distintos tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

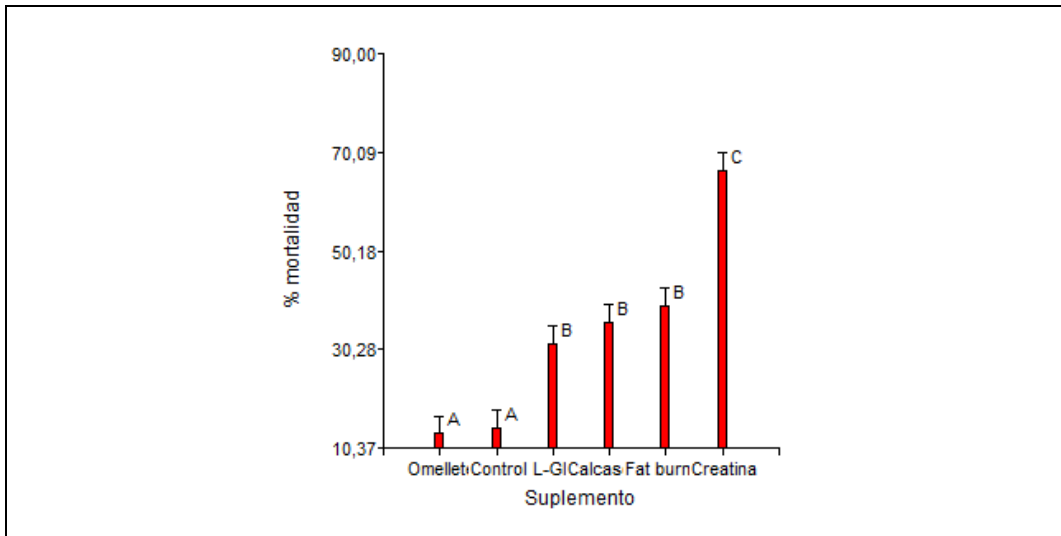


Gráfico 6. Gráfico de barras de la prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,05gr/ml de los distintos tratamientos. Medias de la variable porcentaje de mortalidad con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Esta prueba de comparaciones de Tukey arrojó que la Diferencia Mínima Significativa (DMS) entre los grupos en esta dosis de 0,05gr/ml de cada tratamiento es de 14,73397. Las letras diferentes en que fueron agrupados los distintos tratamientos a través de esta prueba (Grupo A: Control y omelleto; Grupo B: L-Glu, Calcasaína y Fat Burner y Grupo C: Creatina) indican una diferencia significativa entre los tratamientos de los otros grupos, es decir, que existen efectos negativos sobre el porcentaje de mortalidad de los nematodos, causado por la aplicación de los distintos tratamientos a largo plazo (excepto el Omelette). En orden creciente de diferenciación respecto del control se ubican L-Glutamina, Calcasaína, Fat Burner y Creatina. ($p < 0,05$).

5.2 Análisis estadístico general del ensayo de resistencia al estrés oxidativo

Luego de la aplicación del tratamiento con peróxido de hidrógeno y tras el agregado de los diferentes suplementos dietarios, se realizó el conteo diario de los nematodos muertos. Para este ensayo de resistencia al estrés oxidativo, se obtuvieron los porcentajes de mortalidad, descriptos en el Anexo 6. Los mismos fueron reflejados en gráficos de barras sobre porcentaje de mortalidad al final de la observación, según cada

suplemento en las dosis de 0,05gr/ml de tratamiento (Gráfico 13), 0,025gr/ml de tratamiento (Gráfico 14) y 0,01 gr/ml de tratamiento (Gráfico 15):

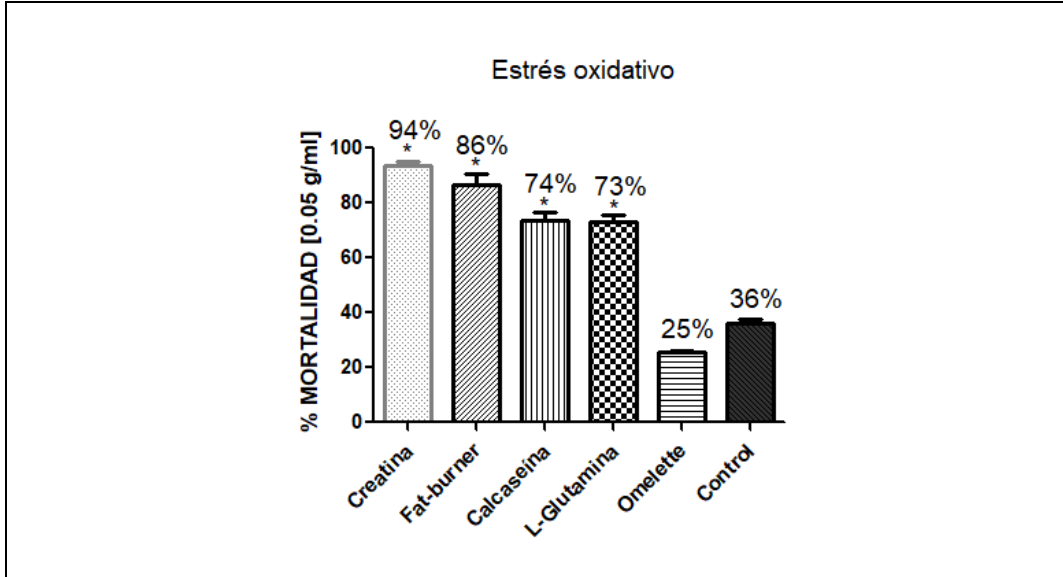
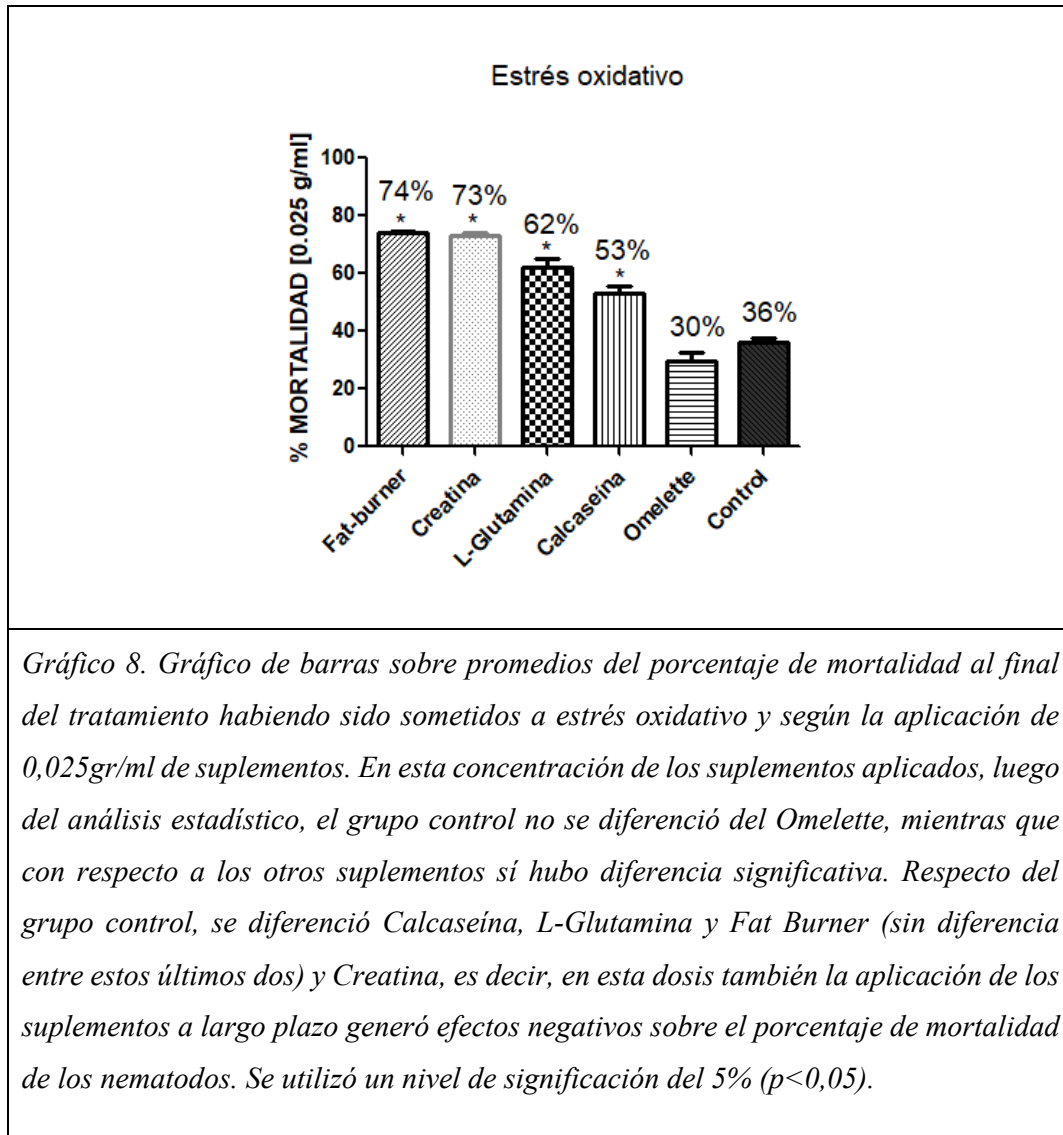
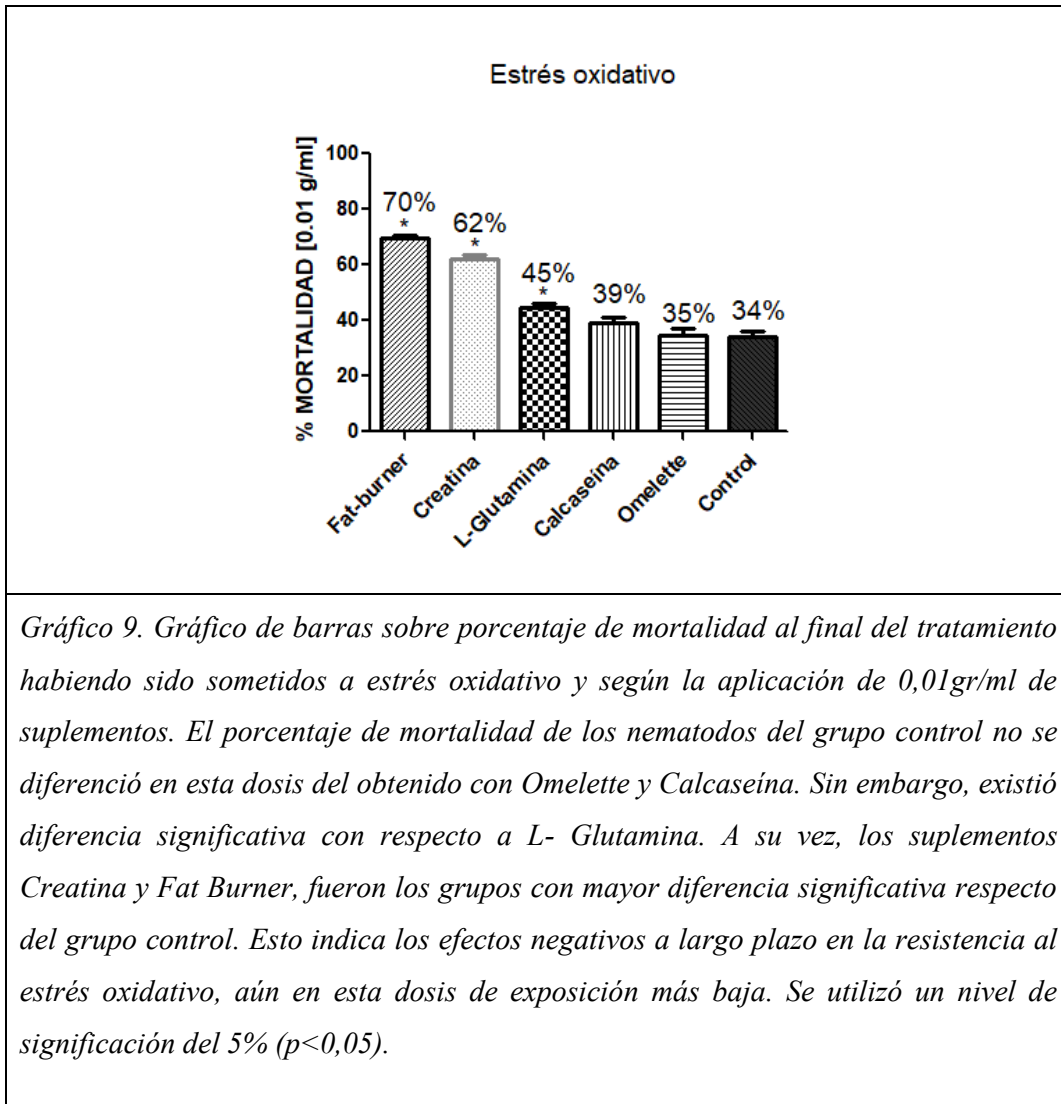


Gráfico 7. Gráfico de barras sobre promedios de porcentaje de mortalidad al final del tratamiento habiendo sido sometidos a estrés oxidativo y según la aplicación de 0,05gr/ml de suplementos. De la prueba de Tukey surgió que, como en el ensayo anterior, el suplemento Omelette no tiene diferencia significativa con el grupo control. Sin embargo, sí existe tal diferencia con respecto a Calc caseína, L-Glutamina y Fat Burner. A su vez, la diferencia significativa más pronunciada, nuevamente es Creatina, es decir, la exposición a largo plazo de los nematodos sometidos a estrés oxidativo tratados con estos suplementos dietarios modificó negativamente el porcentaje de mortalidad de los mismos. Se utilizó un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).





Como en el caso del ensayo de longevidad, en este ensayo de resistencia al estrés oxidativo se puede observar que, a mayor dosis de exposición de los nematodos a los distintos tratamientos, mayor es el porcentaje de mortalidad de los mismos y mayor diferenciación entre los distintos grupos respecto del control. El suplemento Omelette (ovoalbúmina) sigue siendo la excepción a lo nombrado antes, donde a mayor concentración de suplemento, mayor reducción el porcentaje de mortalidad de los nematodos. Sin embargo, luego del análisis estadístico, no hay diferencia significativa respecto del grupo control en estas dosis aplicadas para el suplemento Omelette.

A continuación, se describe exhaustivamente el análisis estadístico realizado con la dosis de 0,05gr/ml de aplicación de los distintos tratamientos. Como mencionamos anteriormente, al ser similar, el análisis correspondiente a las concentraciones de 0,01gr/ml y 0,025gr/ml para este ensayo de resistencia al estrés oxidativo, se describió en el Anexo 7.

5.2.1 Análisis estadístico del ensayo de resistencia al estrés oxidativo con 0,05gr/ml de los distintos tratamientos

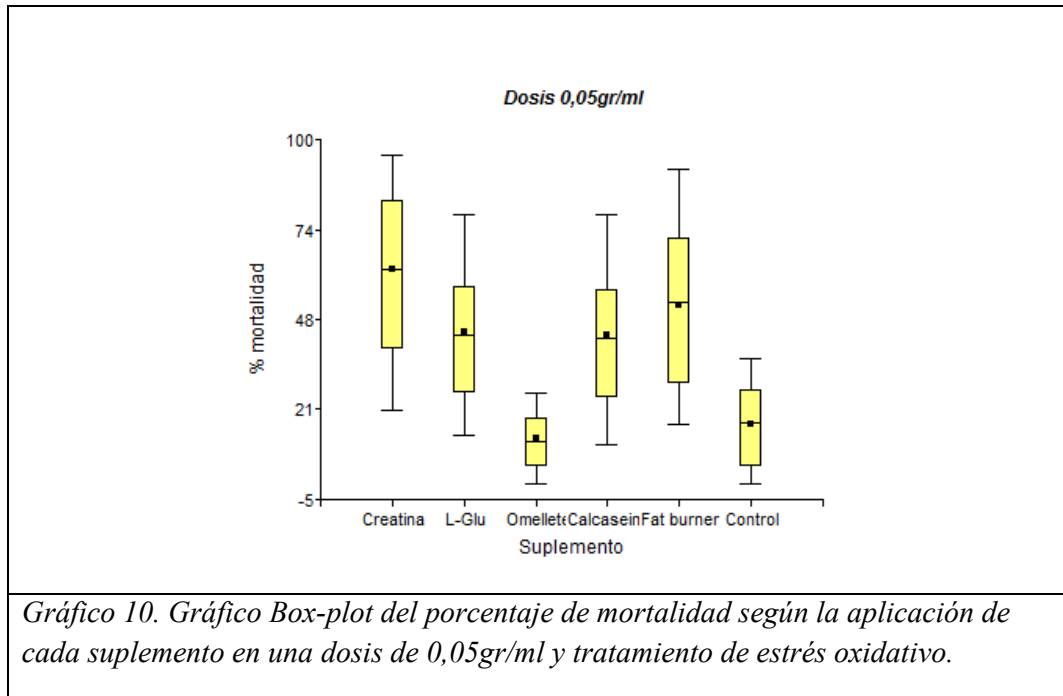
De los datos surgidos se evalúa las medidas de resumen en esta dosis de tratamiento con los suplementos:

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Calc caseína	% mortalidad	24	42,79	19,92	46,55	42,00
Control	% mortalidad	24	17,00	11,83	69,58	17,50
Creatina	% mortalidad	24	61,92	22,54	36,40	62,00
Fat burner	% mortalidad	24	51,67	23,78	46,02	52,50
L-Glu	% mortalidad	24	43,71	18,83	43,08	43,00
Omellete	% mortalidad	24	12,83	8,63	67,21	12,00

Tabla VI. Medidas de resumen del análisis de la variable porcentaje de mortalidad, con el agregado de 0,05gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

Describiendo la media en orden creciente se puede ordenar: Omellete, Control, Calc caseína, L-glu, Fat Burner y Creatina. En cuanto al coeficiente de variación, supera el 20% en todos los casos, lo que indica que los datos no son homogéneos.

Para observar la presencia o ausencia de datos atípicos y ver gráficamente las medidas de resumen se realizó el siguiente box-plot:



Se puede inferir que no hay presencia de datos atípicos y que en general, en todos los tratamientos e incluso en el control, la media y la mediana son relativamente cercanas. Gráficamente se observa cierta similitud entre el porcentaje de mortalidad del omellete con respecto al control, pero sin diferencia significativa como se demuestra más adelante.

Al haber planteado un modelo estadístico ANOVA, se postula como hipótesis nula o H0:

H0: El porcentaje de mortalidad de nematodos no varía con el agregado de 0,05gr/ml de suplementos dietarios con respecto del tratamiento control habiendo sido sometidos a estrés oxidativo.

Por lo tanto, se postula como H1:

H1: El agregado de 0,05gr/ml de suplementos dietarios influye en el porcentaje de mortalidad de nematodos habiendo sido sometidos a estrés oxidativo.

Para llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente a este modelo, se observó si se cumplía con los siguientes supuestos:

- 1- Muestras aleatorias y observaciones independientes: la preparación de los nematodos para la aplicación de los tratamientos y la forma de observación según cada well demuestra que se cumplió con este supuesto.
- 2- Supuesto de normalidad: para ello se realizó la Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Esta prueba exige plantear hipótesis según el comportamiento de la variable:

Hipótesis nula H0: La variable tiene comportamiento normal.

Hipótesis H1: La variable no tiene comportamiento normal.

En la Tabla VII se puede observar que no todos los tratamientos resultan normales dado que no en todos los casos se cumple que el p-valor sea menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto de normalidad no se cumple, es decir, hay evidencia de que la variable no se distribuye normalmente en todos los tratamientos con una dosis de 0,05gr/ml habiendo sometido a los nematodos a estrés oxidativo.

Shapiro-Wilks (modificado)

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Calc caseína	% mortalidad	24	42,79	19,92	0,93	0,2957
Control	% mortalidad	24	17,00	11,83	0,89	0,0405
Creatina	% mortalidad	24	61,92	22,54	0,91	0,1148
Fat burner	% mortalidad	24	51,67	23,78	0,90	0,0778
L-Glu	% mortalidad	24	43,71	18,83	0,93	0,2657
Omellete	% mortalidad	24	12,83	8,63	0,89	0,0406

Tabla VII. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de normalidad con una dosis de 0,05gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

3- Supuesto de Homocedasticidad: Consiste en suponer que todos los tratamientos tienen la misma variabilidad; o los residuos tienen variabilidad constante. Se corroboró este supuesto mediante la Prueba de Levene. Las hipótesis de esta prueba fueron:

Hipótesis nula H0: Varianzas del porcentaje de mortalidad de los nematodos sometidos a distintos suplementos con una dosis de 0,05gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo, no difieren respecto del control.

Hipótesis H1: Al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad de los nematodos sometidos a distintos suplementos con una dosis de 0,05gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo, difiere respecto del control.

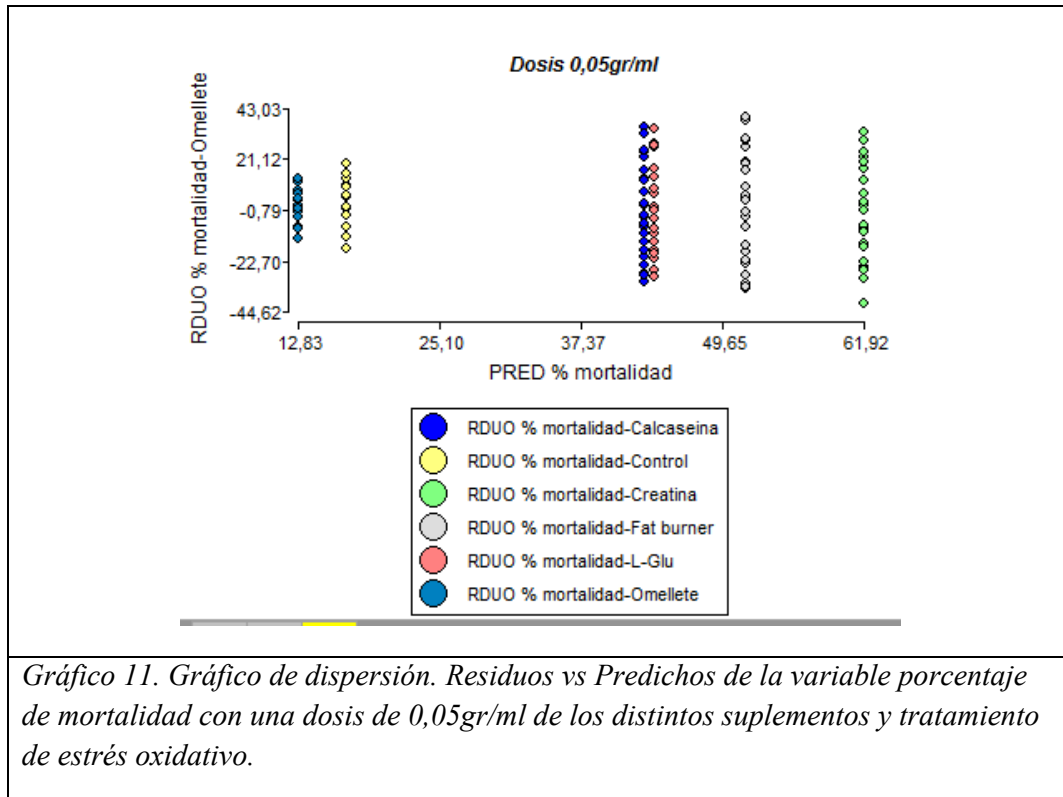
En la Tabla VIII se puede ver el análisis de los residuos de la variable, donde resulta que las varianzas del porcentaje de mortalidad en los tratamientos no son iguales al control, dado que el *p*-valor arrojado fue menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto no se cumple, es decir, al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad de los nematodos sometidos a distintos suplementos con una dosis de 0,05gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo, difiere respecto del control.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS % mortalidad	144	0,20	0,17	64,58	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3158,59	5	631,72	6,98	<0,0001
Suplemento	3158,59	5	631,72	6,98	<0,0001
Error	12489,99	138	90,51		
Total	15648,58	143			

Tabla VIII. Prueba de Levene. Análisis de los residuos absolutos de las varianzas del porcentaje de mortalidad en nematodos sometidos a los distintos suplementos con 0,05gr/ml de estos y tratamiento de estrés oxidativo.

Al observar el gráfico 11, se puede apreciar la variabilidad entre el grupo control y los distintos tratamientos. Gráficamente, el suplemento omellete es el más cercano al grupo control, mientras que el más alejado es la creatina.



Debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad, ni de homocedasticidad exigido por el modelo de análisis de la varianza paramétrica, se procedió a realizar un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis. Las hipótesis exigidas por esta prueba son:

Hipótesis nula H0: El porcentaje de mortalidad en los nematodos expuestos a 0,05gr/ml de los suplementos y tratamiento de estrés oxidativo, no difiere de su tendencia central.

Hipótesis H1: El porcentaje de mortalidad en nematodos sometidos a alguno de los suplementos con dosis de 0,05gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo, difiere de su tendencia central.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Suplemento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% mortalidad	Calc caseina	24	42,79	19,92	42,00	76,26	<0,0001
% mortalidad	Control	24	17,00	11,83	17,50		
% mortalidad	Creatina	24	61,92	22,54	62,00		
% mortalidad	Fat burner	24	51,67	23,78	52,50		
% mortalidad	L-Glu	24	43,71	18,83	43,00		
% mortalidad	Omellete	24	12,83	8,63	12,00		

Tabla IX. Prueba de Kruskal Wallis. Análisis de la varianza no paramétrica.

Mediante este análisis, se infiere que al no superar el nivel de significación del 5%, ($p < 0,05$), el porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,05gr/ml de los suplementos y tratamiento de estrés oxidativo difiere de su tendencia central.

Para observar las comparaciones entre grupos, es decir, si existe alguna relación entre los distintos tratamientos o con el grupo control, se realizó la prueba de comparaciones de Tukey:

% mortalidad 144 0,49 0,47 48,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	45313,89	5	9062,78	26,67	<0,0001
Suplemento	45313,89	5	9062,78	26,67	<0,0001
Error	46901,42	138	339,87		
Total	92215,31	143			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=15,19522

Error: 339,8653 gl: 138

Suplemento Medias n E.E.

Omellete	12,83	24	3,76	A
Control	17,00	24	3,76	A
Calc caseina	42,79	24	3,76	B
L-Glu	43,71	24	3,76	B
Fat burner	51,67	24	3,76	B C
Creatina	61,92	24	3,76	C

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

Tabla X. Prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,05gr/ml de los distintos tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

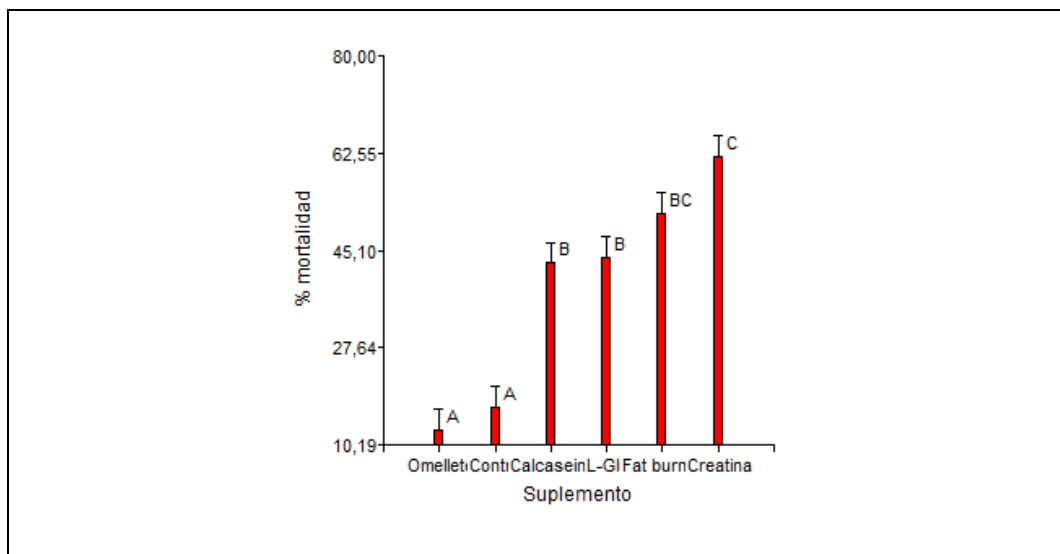


Gráfico 12. Gráfico de barras de la prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,05gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo. Medias de la variable porcentaje de mortalidad con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Esta prueba de comparaciones de Tukey arrojó que la Diferencia Mínima Significativa (DMS) entre los grupos en esta dosis de 0,05gr/ml de cada tratamiento es de 15,19522 para considerar que existe diferencia en el porcentaje de mortalidad entre un tratamiento y otro. Las letras diferentes en que fueron agrupados los distintos tratamientos a través de esta prueba (Grupo A: Omellete y control; Grupo B: Calca y L-glu; Grupo BC: Fat Burner; Grupo C: Creatina) indican una diferencia significativa entre los tratamientos de los otros grupos. En cuanto al suplemento Omelette, no existe diferencia significativa con el grupo control.

Por lo tanto, se puede decir que existe una diferencia significativa mayor entre el porcentaje de mortalidad del grupo control y Creatina, como grupo más diferenciado. También se observa diferencias significativas entre la L-glu, Calcaseína y Fat Burner respecto del grupo control. Es decir, el porcentaje de mortalidad de los nematodos sometidos a estrés oxidativo se vio afectado por la administración de los suplementos a largo plazo, lo que se traduce en una reducción en la capacidad de los nematodos para efectuar respuesta antioxidante.

6. DISCUSIÓN

En primer lugar, desde el punto de vista técnico-práctico podemos describir que se logró la puesta a punto en la manipulación del modelo biológico *C. elegans* para poder desarrollar este trabajo. Además, se logró el cultivo y mantenimiento de los nematodos en un medio libre de contaminación a pesar de que surgió como inconveniente una contaminación fúngica en un principio. Sin embargo, se logró controlar la situación y mantener el cultivo limpio.

Con relación al procedimiento de sincronización, podemos destacar que se fue optimizando la técnica y a pesar de que un principio no se obtenían los resultados esperados por ser una técnica operador-dependiente, realizamos un proceso de entrenamiento exhaustivo hasta obtener el resultado esperado.

También se logró desarrollar los protocolos de exposición de nematodos a los suplementos estableciendo las concentraciones adecuadas y descartando aquellas que generaban muerte inmediata por aumento significativo del pH del medio de cultivo. Como operadores de los equipos necesarios y como observadores del modelo biológico, se logró desarrollar el entrenamiento visual necesario para poder llevar el conteo y obtener los resultados de cada ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y descriptos en el análisis estadístico, podemos concluir que la exposición a largo plazo de los nematodos a los suplementos dietarios, aumenta significativamente el porcentaje de mortalidad de los mismos (a excepción del suplemento Omelette). Es decir, a nivel fisiológico, la exposición a estos suplementos no resulta inocua, sino que a su vez es perjudicial para la longevidad del modelo de *C. elegans*. Además, cuanto mayor es la dosis de exposición a largo plazo, en general mayor es el porcentaje de mortalidad, siendo el ejemplo más claro el caso de la Creatina.

También se concluyó que la respuesta al estrés oxidativo se vio modificada negativamente por la exposición a los suplementos dietarios a largo plazo en los nematodos, es decir, los mismos han perdido capacidad en la respuesta endógena antioxidante y deterioro en su homeostasis. La única excepción de lo descripto

anteriormente es el caso de la ovoalbúmina (omelette), donde se obtuvieron resultados similares al grupo control en las diferentes dosis de exposición, por lo que se puede concluir que no genera efectos negativos a largo plazo en la longevidad del modelo, ni modifica la capacidad de respuesta frente a estrés oxidativo.

Finalmente, se destaca que los resultados obtenidos en este trabajo no son extrapolables a humanos y que se requieren ensayos en otros modelos biológicos para poder estudiar los efectos a largo plazo del consumo de los suplementos dietarios, así como las causas que los generan. Este trabajo aporta información inédita la cual permite llevar a cabo un análisis preliminar sobre los suplementos dietarios a nivel nacional en un campo que no está del todo explorado.

7. IMPLICANCIAS A FUTURO

Los resultados obtenidos, en su mayoría con efectos negativos por la exposición a estos suplementos dietarios reflejan la importancia y la necesidad de contar con estudios exhaustivos sobre estos productos y sobre todo de origen nacional, como los de este Trabajo, dada la escasa información al respecto.

Por nuestro lado, también se puso en marcha la puesta a punto de un ensayo para la observación de ácidos grasos en los nematodos luego de la exposición a estos suplementos, con el fin de obtener información al respecto. Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados para la tinción con Oil Red (paso clave para la observación de los ácidos grasos), postulamos que algún componente de los suplementos dietarios no permitió la óptima fijación del colorante. Proponemos futuras investigaciones acerca de la composición de los productos ya que podrían existir excipientes no declarados en el rótulo, como la bibliografía también lo indicó a nivel internacional (Martinez-Sanz *et al.* 2017. Geyer *et al.* 2000. Maughan 2005).

Por último, considerando los resultados obtenidos con efectos perjudiciales en este modelo, es que destacamos y promovemos la continuidad de estos análisis, por ejemplo, para la observación de la calidad, concentración, pureza y composición de los mismos. Recalamos que sería influyente contar con otros estudios en productos también de origen nacional, dada la escasa información disponible, así como encuestas sociales acerca del consumo en nuestra población, tipos de deportes asociados al consumo de estos productos, combinación de varios suplementos y situaciones de adicción a los mismos, entre otros.

ANEXOS

Anexo 1. Composición de los medios de cultivo

Según bibliografía al respecto (Simonetta *et al.* 2009. Brenner, 1974), a continuación, se detallan los componentes de los medios utilizados:

- NGM (500 ml)

Componente	Cantidad
Agar	8,5 g
Peptona	1,25 g
NaCl	1,5 g
H ₂ O _d	487,5 ml

Una vez esterilizado en autoclave, se adiciona: Colesterol 0,5 ml, MgSO₄ 1M 0,5 ml, CaCl₂ 1M 0,5 ml, Buffer PO₄ 12,5 ml. pH =6.

- LB (100 ml)

Componente	Cantidad
Triptona	1 g
Extracto de levadura	0,5 g
NaCl	0,5 g
H ₂ O _d	c.s.p 100 ml

Ajustar a pH 7 y esterilizar en autoclave.

- Buffer M9 (1000 ml)

Componente	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ 1M	0,12 g
H ₂ O _d	c.s.p. 1000 ml

- Solución de Sincronización (NaOH/Cl₂):

Volumen final	10 ml	15 ml	20 ml	30 ml	40 ml
Cloro 5%*	3.8 ml	5.7 ml	7.6 ml	11.4 ml	15.2 ml
NaOH 1 M	5 ml	7.5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
H ₂ O d	1,2 ml	1,8 ml	2,4 ml	3,6 ml	4,8 ml

- FUDR-mix: 20 nematodos por pocillo

Componente	Cantidad
Bacteria <i>E. coli</i> OP50 (100 mg / ml)	50 µl
ATB Ampicilina	4 µl
FUDR 40 mM	0,8 µl
Medio S	c.s.p 400 µl

- Solución S basal (1000 ml)

Componente	Cantidad
K ₃ PO ₄ 1M	50 ml
NaCl	5,9 g
H ₂ O d	c.s.p. 1000 ml

- Medio S completo

Reactivo	Cantidad
Colesterol*	1 ml
Citrato de Potasio* 1M pH=6	10 ml
Trace Metal Solution*	10 ml
CaCl ₂ *	3 ml
MgSO ₄ *	3 ml

*Soluciones esterilizadas en autoclave por separado.

- Solución de Congelado de gusanos:

Buffer B	1000 ml	50 ml	30 ml
NaCl	5,7 g	0,285 g	0,171 g
KH ₂ PO ₄ 1M pH=6	50 ml	2,5 ml	1,5 ml
Glicerol	300 ml	15 ml	9 ml
H ₂ O d	644 ml	32,2 ml	19,32 ml

Anexo 2. Información nutricional detallada de cada suplemento dietario descripta en el rótulo del producto (www.pulver.com.ar).

	<p>Ingredientes: Monohidrato de Creatina.</p> <p>Información Nutricional Porción: 5 g (1 medida dosificadora). Cantidad por porción: Valor energético 20 Kcal = 82 Kj Carbohidratos 0 g Proteínas 0 g Grasas totales 0 g Grasas saturadas 0 g Grasas trans 0 g Fibra 0 g Sodio 0 mg</p>
	<p>Ingredientes: L-Glutamina.</p> <p>Información Nutricional Porción: 5 g (1 1/2 medida dosificadora). Cantidad por porción: Valor energético 0 Kcal = 0 Kj Carbohidratos 0 g Proteínas 0 g Fibra 0 g Lípidos 0 g</p>

	<p>Ingredientes: Albúmina en polvo (80% de proteína de huevo), esencia artificial de jamón y queso, glutamato monosódico.</p> <p>Información Nutricional Porción: 35 g (1 medida dosificadora). Cantidad por porción: Valor energético 112 Kcal = 468 Kj Carbohidratos 0 g Proteínas 28 g Grasas totales 0 g Grasas saturadas 0 g Grasas trans 0 g Fibra 0 g Sodio 260 mg</p>
	<p>Ingredientes: Calcio caseinato, ANAH (INS 341iii), ARO, EDU (sucralosa).</p> <p>Información Nutricional Porción: 25 g (1 medida dosificadora). Cantidad por porción: Valor energético 88 Kcal = 370 Kj Carbohidratos 0 g Proteínas 22 g Grasas totales 0 g Grasas saturadas 0 g Grasas trans 0 g Fibra 0 g Sodio 2,2 mg</p>
	<p>Ingredientes: Monohidrato de dextrosa, l-metionina, colina, l-carnitina, inositol, garcinia cambogia, betaina, acidulante (INS 330), aromatizantes.</p> <p>Información Nutricional Porción: 10 g (2 medidas dosificadoras). Cantidad por porción: Valor energético 12 Kcal = 49 Kj Carbohidratos 0 g Proteínas 0 g Grasas totales 0 g Grasas saturadas 0 g Grasas trans 0 g Fibra 0 g Sodio 0 mg</p>

Anexo 3. Ensayo de supervivencia para la administración de los suplementos dietarios

Con el fin de determinar una concentración no letal para la administración de los distintos suplementos, es que se realizó un ensayo previo que consistió en diluir cada suplemento en medio S (según la indicación del fabricante) y exponer a los nematodos no sincronizados a los mismos. Se destaca que esta concentración era mucho más alta que cualquier producto o droga ya testeado en nematodos, en donde se observan en general, concentraciones de drogas a testear en milimolar o micro molar (cuando la concentración real es conocida) (Yu Li et al. 2013).

Al analizar la longevidad de los nematodos con la concentración sugerida por el fabricante para uso en humanos, se observó que era dosis letal, ya que produjo una acidificación pronunciada del medio de cultivo. Por lo cual, se realizaron distintas diluciones de los suplementos dietarios hasta alcanzar las seleccionadas (0,01gr/ml, 0,025gr/ml y 0,05gr/ml), lo que permitió realizar los ensayos y el conteo diario hasta el octavo día de exposición. Se postuló al octavo día como último para el conteo dado que se cumple con el objetivo de análisis a largo plazo en este modelo y se evita la degradación del medio de cultivo y de las condiciones generales del ensayo, lo que podría generar alteraciones en la expresión génica del nematodo. (Hunt 2017).

Anexo 4. Porcentajes de mortalidad de nematodos en el ensayo de longevidad según cada suplemento

Creatina

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	5%	0%	5%	18%	15%	11%	31%	32%	33%
2	16%	10%	5%	18%	20%	17%	44%	45%	43%
3	16%	10%	20%	23%	20%	28%	44%	50%	62%
4	21%	24%	25%	27%	35%	28%	56%	59%	62%
5	32%	29%	35%	45%	45%	39%	69%	68%	76%
6	47%	33%	45%	55%	60%	56%	81%	77%	90%
7	58%	43%	50%	68%	60%	61%	94%	86%	100%
8	58%	52%	50%	73%	65%	78%	100%	91%	100%
Totales	53%			72%			97%		

L-Glu

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	6%	6%	0%	5%	10%	11%	9%	13%	10%
2	6%	10%	5%	14%	15%	17%	14%	17%	10%
3	19%	10%	16%	19%	15%	17%	23%	21%	19%
4	25%	10%	26%	19%	20%	28%	27%	21%	24%
5	25%	20%	26%	24%	20%	33%	27%	29%	33%
6	31%	30%	32%	33%	30%	33%	32%	42%	52%
7	38%	35%	32%	33%	40%	39%	45%	46%	52%
8	44%	35%	42%	43%	50%	50%	59%	63%	62%
Totales	40%			48%			61%		

Omellete

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	0%	5%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	0%
2	0%	5%	5%	5%	0%	0%	0%	5%	5%
3	6%	10%	5%	5%	5%	0%	4%	10%	11%
4	17%	10%	10%	9%	10%	5%	4%	15%	21%
5	17%	14%	20%	18%	10%	5%	8%	15%	21%
6	22%	24%	20%	18%	14%	14%	13%	20%	21%
7	28%	33%	25%	23%	14%	24%	17%	20%	26%
8	33%	33%	30%	27%	24%	29%	25%	25%	26%
Totales	32%			27%			25%		

Calciseína

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	0%	6%	5%	10%	4%	6%	9%	14%	12%
2	7%	6%	10%	15%	13%	11%	14%	14%	24%
3	13%	17%	14%	25%	22%	22%	14%	24%	29%
4	33%	22%	24%	30%	26%	28%	27%	29%	29%
5	40%	22%	29%	30%	35%	39%	36%	33%	41%
6	40%	28%	29%	35%	43%	50%	41%	43%	53%
7	47%	33%	33%	45%	48%	50%	50%	57%	65%
8	53%	33%	38%	55%	48%	56%	59%	67%	76%
Totales	42%			53%			67%		

Fat

Burner

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	9%	13%	5%	10%	14%	9%	6%	14%	14%
2	14%	13%	5%	15%	18%	18%	13%	14%	19%
3	14%	17%	16%	20%	27%	23%	25%	19%	24%
4	23%	26%	26%	30%	27%	32%	38%	24%	33%
5	27%	30%	37%	35%	36%	41%	44%	38%	38%
6	32%	35%	42%	45%	50%	50%	56%	57%	48%
7	41%	43%	42%	60%	50%	59%	63%	62%	57%
8	55%	43%	47%	65%	59%	64%	81%	76%	71%
Totales	48%			63%			76%		

Días	Control 1	Control 2	Control 3
1	0%	5%	0%
2	0%	5%	6%
3	5%	10%	6%
4	5%	14%	11%
5	9%	19%	11%
6	18%	24%	17%
7	23%	24%	28%
8	36%	33%	39%
Totales	36%		

Anexo 5. Análisis estadístico del ensayo de longevidad

Con 0,01 gr/ml de los distintos tratamientos

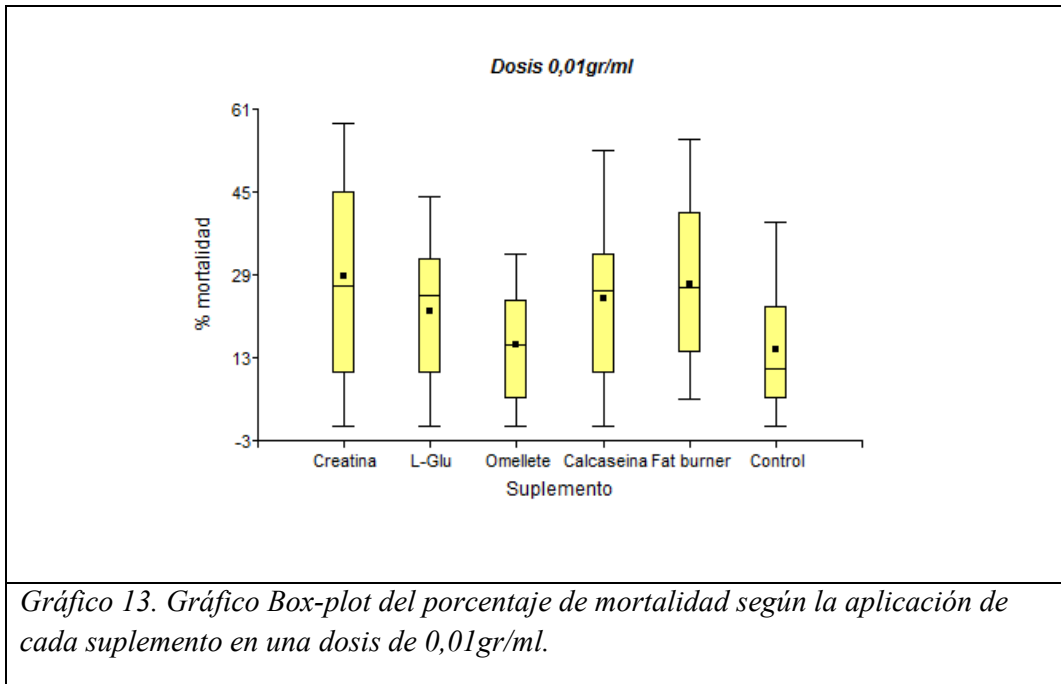
De los datos surgidos se evalúa las medidas de resumen en esta dosis de tratamiento con los suplementos:

<u>Suplemento</u>	<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>D.E.</u>	<u>CV</u>	<u>Mediana</u>
Calc caseína	% mortalidad	24	24,25	14,47	59,66	26,00
Control	% mortalidad	24	14,50	11,59	79,94	11,00
Creatina	% mortalidad	24	28,71	18,35	63,91	27,00
Fat burner	% mortalidad	24	27,29	14,44	52,93	26,50
L-Glu	% mortalidad	24	22,04	13,01	59,04	25,00
Omellete	% mortalidad	24	15,50	11,19	72,19	15,50

Tabla XI. Medidas de resumen del análisis de la variable porcentaje de mortalidad, con el agregado de 0,01gr/ml de los distintos suplementos.

Describiendo la media en orden creciente se puede ordenar: Control, Omellete, L-glu, Calc caseína, Fat Burner y por último Creatina. En cuanto al coeficiente de variación, en todos los tratamientos aplicados supera el 20%, lo que indica que los datos no son homogéneos.

Para observar la presencia o ausencia de datos atípicos y ver gráficamente las medidas de resumen se realizó el siguiente box-plot.



Se puede inferir que no hay presencia de datos atípicos y que en general, en todos los tratamientos e incluso en el control, la media y la mediana son relativamente cercanas. Gráficamente se observa cierta similitud entre el porcentaje de mortalidad del omellete con respecto al control. Posteriormente se analizará si la diferencia o similitud es significativa estadísticamente.

Al haber planteado un modelo estadístico ANOVA, se postula como hipótesis nula o H0:

H0: El porcentaje de mortalidad de nematodos no varía con el agregado 0,01gr/ml de suplementos dietarios con respecto del tratamiento control

Por lo tanto, se postula como H1:

H1: El agregado de 0,01gr/ml de suplementos dietarios influye en el porcentaje de mortalidad de nematodos.

Para llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente a este modelo, se observó si se cumplía con los siguientes supuestos:

- 1- Muestras aleatorias y observaciones independientes: la preparación de los nematodos para la aplicación de los tratamientos y la forma de observación según cada pocillo demuestra que se cumplió con este supuesto.
- 2- Supuesto de normalidad: para ello se realizó la Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. En la Tabla XII se puede observar que no todos los tratamientos resultan normales dado que no en todos los casos se cumple que el p-valor sea menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto de normalidad no se cumple, es decir, hay evidencia de que la variable no se distribuye normalmente en todos los tratamientos.

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Calc caseína	% mortalidad	24	24,25	14,47	0,94	0,4045
Control	% mortalidad	24	14,50	11,59	0,89	0,0383
Creatina	% mortalidad	24	28,71	18,35	0,90	0,0727
Fat burner	% mortalidad	24	27,29	14,44	0,92	0,1820
L-Glu	% mortalidad	24	22,04	13,01	0,91	0,1248
Omellete	% mortalidad	24	15,50	11,19	0,88	0,0195

Tabla XII. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de normalidad con una dosis de 0,01gr/ml de los distintos tratamientos.

3- Supuesto de Homocedasticidad: Consiste en suponer que todos los tratamientos tienen la misma variabilidad; o los residuos tienen variabilidad constante. Se corroboró este supuesto mediante la Prueba de Levene. En la Tabla XIII se puede ver el análisis de los residuos de la variable, donde resulta que las varianzas del porcentaje de mortalidad en los tratamientos no son iguales al control, dado que el p-valor arrojado fue menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto no se cumple, es decir, al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad difiere respecto del control.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS % mortalidad	144	0,08	0,05	59,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	584,10	5	116,82	2,38	0,0416
Suplemento	584,10	5	116,82	2,38	0,0416
Error	6768,03	138	49,04		
Total	7352,12	143			

Tabla XIII. Prueba de Levene. Análisis de los residuos absolutos de las varianzas del porcentaje de mortalidad en los distintos tratamientos con dosis de 0,01gr/ml de éstos.

Al observar el gráfico 14, se puede apreciar la variabilidad entre el grupo control y los distintos tratamientos en una dosis de 0,01gr/ml. Gráficamente se sigue cumpliendo que el suplemento omellete es el más cercano al grupo control, mientras que el más alejado es la creatina.

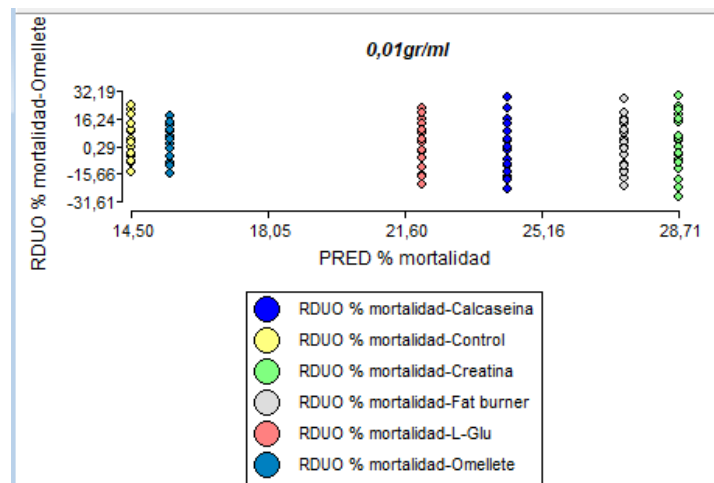


Gráfico 14. Gráfico de dispersión. Residuos vs Predichos de la variable porcentaje de mortalidad con una dosis de 0,01gr/ml de los distintos tratamientos.

Debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad, ni de homocedasticidad exigido por el modelo de análisis de la varianza paramétrica, se procedió a realizar un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Suplemento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% mortalidad	Calc caseína	24	24,25	14,47	26,00	17,31	0,0039
% mortalidad	Control	24	14,50	11,59	11,00		
% mortalidad	Creatina	24	28,71	18,35	27,00		
% mortalidad	Fat burner	24	27,29	14,44	26,50		
% mortalidad	L-Glu	24	22,04	13,01	25,00		
% mortalidad	Omellete	24	15,50	11,19	15,50		

Tabla XIV. Prueba de Kruskal Wallis. Análisis de la varianza no paramétrica.

Mediante este análisis, se infiere que al no superar el nivel de significación del 5%, ($p < 0,05$), se debe rechazar H_0 , es decir, que el porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,01gr/ml de los suplementos difiere de su tendencia central.

Para observar las comparaciones entre grupos, es decir, si existe alguna relación entre los distintos tratamientos o con el grupo control, se hace realiza la prueba de comparaciones de Tukey:

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4237,28	5	847,46	4,30	0,0012
Suplemento	4237,28	5	847,46	4,30	0,0012
Error	27221,38	138	197,26		
Total	31458,66	143			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,57628

Error: 197,2563 gl: 138

Suplemento	Medias	n	E.E.	
Control	14,50	24	2,87	A
Omellete	15,50	24	2,87	A
L-Glu	22,04	24	2,87	A B
Calc caseina	24,25	24	2,87	A B
Fat burner	27,29	24	2,87	B
Creatina	28,71	24	2,87	B

Tabla XV. Prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,01gr/ml de los distintos tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

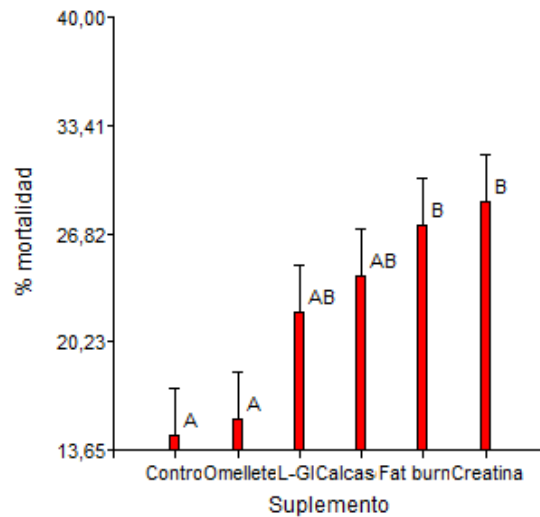


Gráfico 15. Gráfico de barras de la prueba de comparaciones de Tukey. Medias de la variable porcentaje de mortalidad con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), con dosis de 0,01gr/ml de los tratamientos.

Esta prueba de comparaciones de Tukey arroja que la Diferencia Mínima Significativa (DMS) entre los grupos en esta dosis de 0,01gr/ml de cada tratamiento es de 11,57628 para considerar que existe diferencia en el porcentaje de mortalidad entre un

tratamiento y otro. Las letras diferentes en que fueron agrupados los distintos tratamientos a través de esta prueba (Grupo A: Control y omellete; Grupo AB: L-glutamina y calcaseína; Grupo C: Fat Burner y creatina) indican una diferencia significativa entre los tratamientos de los otros grupos.

Por lo tanto, se puede decir que existe diferencia significativa entre el porcentaje de mortalidad del tratamiento control con respecto al Fat Burner y creatina (pero no hay diferencia significativa entre estos últimos entre sí). Sin embargo, el porcentaje de mortalidad con el tratamiento con omellete, L-glutamina y calcaseína no presenta diferencias significativas respecto del control.

Con 0,025gr/ml de los distintos tratamientos

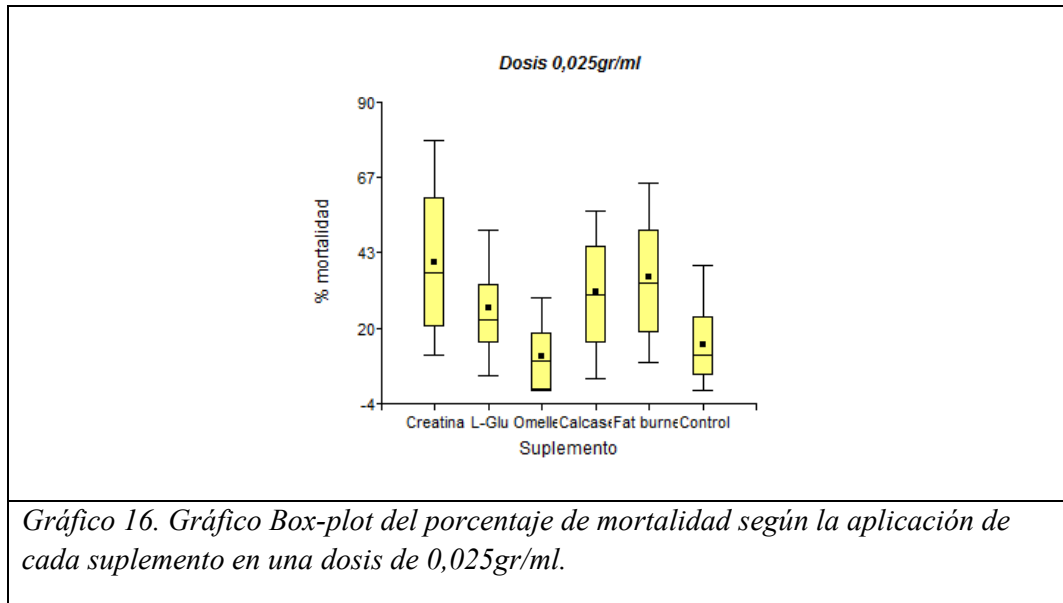
De los datos surgidos se evalúa las medidas de resumen en esta dosis de tratamiento con los suplementos:

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Calcaseína	% mortalidad	24	31,08	16,08	51,73	30,00
Control	% mortalidad	24	14,50	11,59	79,94	11,00
Creatina	% mortalidad	24	40,21	21,11	52,50	37,00
Fat burner	% mortalidad	24	35,71	18,14	50,80	33,50
L-Glu	% mortalidad	24	25,75	12,62	49,02	22,00
Omellete	% mortalidad	24	10,79	9,55	88,50	9,50

Tabla XVI. Medidas de resumen del análisis de la variable porcentaje de mortalidad, con el agregado de 0,025gr/ml de los distintos suplementos.

Describiendo la media en orden creciente se puede ordenar: Omellete, Control, L-Glu, Calcaseína, Fat Burner, y por último nuevamente, Creatina. En cuanto al coeficiente de variación, en todos los tratamientos aplicados supera el 20%, lo que indica que los datos no son homogéneos.

Para observar la presencia o ausencia de datos atípicos y ver gráficamente las medidas de resumen se realizó el siguiente box-plot.



Se puede inferir que no hay presencia de datos atípicos y que en general, en todos los tratamientos e incluso en el control, la media y la mediana son relativamente cercanas. Gráficamente se observa cierta similitud entre el porcentaje de mortalidad del omellete con respecto al control, como ha pasado con la dosis anterior, pero no es significativo, como se describe más adelante.

Al haber planteado un modelo estadístico ANOVA, se postula como hipótesis nula o H_0 :

H_0 : El porcentaje de mortalidad de nematodos no varía con el agregado de 0,025gr/ml de suplementos dietarios con respecto del tratamiento control

Por lo tanto, se postula como H_1 :

H_1 : El agregado de 0,025gr/ml de suplementos dietarios influye en el porcentaje de mortalidad de nematodos.

Para llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente a este modelo, se observó si se cumplía con los siguientes supuestos:

- 1- Muestras aleatorias y observaciones independientes: la preparación de los nematodos para la aplicación de los tratamientos y la forma de observación según cada pocillo demuestra que se cumplió con este supuesto.
- 2- Supuesto de normalidad: para ello se realizó la Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. En la Tabla XVII se puede observar que no todos los tratamientos resultan normales dado que no en todos los casos se cumple que el p-valor sea menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto de normalidad no se cumple, es decir, hay evidencia de que la variable no se distribuye normalmente en todos los tratamientos con una dosis de 0,025gr/ml.

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Calc caseína	% mortalidad	24	31,08	16,08	0,92	0,1332
Control	% mortalidad	24	14,50	11,59	0,89	0,0383
Creatina	% mortalidad	24	40,21	21,11	0,88	0,0213
Fat burner	% mortalidad	24	35,71	18,14	0,90	0,0480
L-Glu	% mortalidad	24	25,75	12,62	0,92	0,2036
Omellete	% mortalidad	24	10,79	9,55	0,86	0,0053

Tabla XVII. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de normalidad con una dosis de 0,025gr/ml de los distintos tratamientos.

3- Supuesto de Homocedasticidad: Se corroboró este supuesto mediante la Prueba de Levene. En la Tabla XVIII se puede ver el análisis de los residuos de la variable, donde resulta que las varianzas del porcentaje de mortalidad en los tratamientos no son iguales al control, dado que el p-valor arrojado fue menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto no se cumple, es decir, al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad difiere respecto del control.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS % mortalidad	144	0,20	0,17	58,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1877,64	5	375,53	6,87	<0,0001
Suplemento	1877,64	5	375,53	6,87	<0,0001
Error	7540,59	138	54,64		
Total	9418,23	143			

Tabla XVIII. Prueba de Levene. Análisis de los residuos absolutos de las varianzas del porcentaje de mortalidad en los distintos tratamientos con 0,025gr/ml de estos.

Al observar el gráfico 17, se puede apreciar la variabilidad entre el grupo control y los distintos tratamientos. Gráficamente, como en el caso de la dosis anterior, se sigue cumpliendo que el suplemento omellete es el más cercano al grupo control, mientras que el más alejado es la creatina.

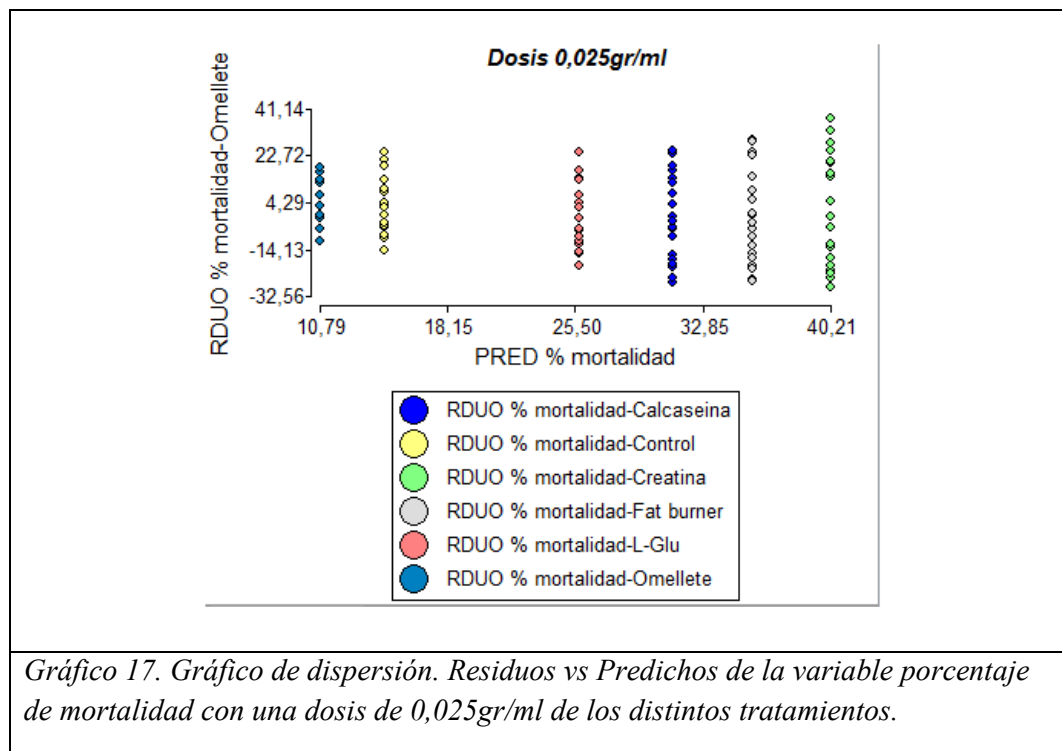


Gráfico 17. Gráfico de dispersión. Residuos vs Predichos de la variable porcentaje de mortalidad con una dosis de 0,025gr/ml de los distintos tratamientos.

Debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad, ni de homocedasticidad exigido por el modelo de análisis de la varianza paramétrica, se procedió a realizar un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis.

Variable	Suplemento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% mortalidad	Calc caseina	24	31,08	16,08	30,00	49,20	<0,0001
% mortalidad	Control	24	14,50	11,59	11,00		
% mortalidad	Creatina	24	40,21	21,11	37,00		
% mortalidad	Fat burner	24	35,71	18,14	33,50		
% mortalidad	L-Glu	24	25,75	12,62	22,00		
% mortalidad	Omellete	24	10,79	9,55	9,50		

Tabla XIX. Prueba de Kruskal Wallis. Análisis de la varianza no paramétrica.

Mediante este análisis, se infiere que al no superar el nivel de significación del 5%, ($p < 0,05$), se concluye que el porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,025gr/ml de los suplementos difiere de su tendencia central.

Para observar las comparaciones entre grupos, se hace realiza la prueba de comparaciones de Tukey:

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

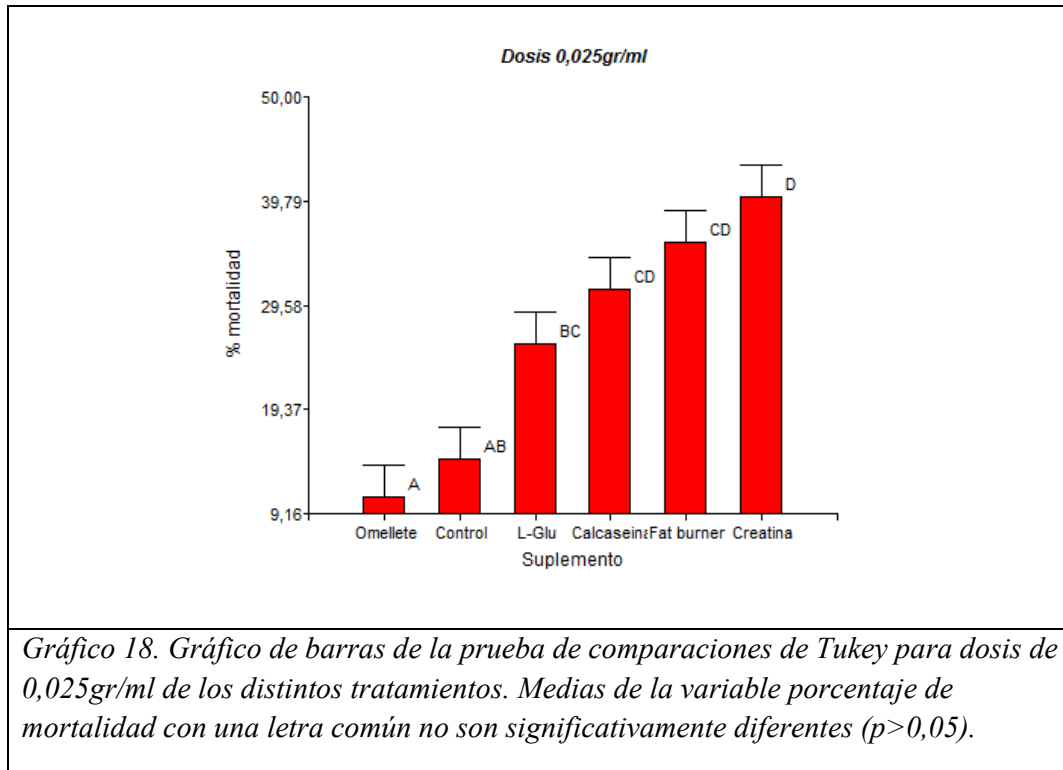
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16437,12	5	3287,42	13,91	<0,0001
Suplemento	16437,12	5	3287,42	13,91	<0,0001
Error	32615,21	138	236,34		
Total	49052,33	143			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,67138

Error: 236,3421 gl: 138

Suplemento	Medias	n	E.E.	
Omellete	10,79	24	3,14	A
Control	14,50	24	3,14	A B
L-Glu	25,75	24	3,14	B C
Calc caseina	31,08	24	3,14	C D
Fat burner	35,71	24	3,14	C D
Creatina	40,21	24	3,14	D

Tabla XX. Prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,025gr/ml de los distintos tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).



Esta prueba de comparaciones de Tukey arrojó que la Diferencia Mínima Significativa (DMS) entre los grupos en esta dosis de 0,025gr/ml de cada tratamiento es de 12,67138 para considerar que existe diferencia en el porcentaje de mortalidad entre un tratamiento y otro. Las letras diferentes en que fueron agrupados los distintos tratamientos a través de esta prueba (Grupo A: Control; Grupo AB: Control y Omellete; Grupo BC: L-glu; Grupo CD: Calc caseína y Fat Burner; Grupo D: Creatina) indican una diferencia significativa entre los tratamientos de los otros grupos.

Por lo tanto, se puede decir que existe diferencia significativa entre el porcentaje de mortalidad del tratamiento control con respecto a la creatina, como grupo más diferenciado. También se observa diferencias significativas entre la L-glu, Calc caseína y Fat Burner respecto del grupo control.

Anexo 6. Porcentajes de mortalidad de nematodos en el ensayo de resistencia al estrés oxidativo según cada suplemento

Creatina

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	10%	6%	14%	14%	18%	15%	21%	32%	35%
2	10%	12%	14%	24%	27%	30%	37%	36%	39%
3	19%	12%	23%	24%	32%	35%	47%	45%	52%
4	29%	18%	27%	33%	36%	45%	53%	55%	61%
5	33%	35%	41%	38%	45%	50%	63%	68%	65%
6	43%	47%	45%	52%	50%	60%	79%	82%	74%
7	52%	53%	50%	62%	64%	70%	84%	86%	91%
8	62%	65%	59%	71%	73%	75%	95%	95%	91%
Totales	62%			73%			94%		

L-Glu

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	11%	5%	11%	12%	14%	15%	17%	17%	14%
2	11%	15%	11%	18%	19%	20%	22%	26%	24%
3	21%	15%	16%	18%	19%	25%	33%	35%	29%
4	26%	25%	21%	29%	29%	40%	44%	39%	43%
5	26%	35%	26%	41%	33%	45%	50%	43%	43%
6	32%	40%	37%	47%	43%	55%	61%	52%	52%
7	32%	45%	42%	59%	52%	55%	72%	57%	57%
8	42%	45%	47%	65%	57%	65%	78%	70%	71%
Totales	45%			62%			73%		

Omellete

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	0%	0%	0%	0%	5%	0%	0%	0%	4%
2	0%	5%	0%	5%	9%	6%	0%	5%	9%
3	5%	5%	0%	10%	9%	6%	5%	5%	9%
4	5%	10%	6%	14%	14%	11%	11%	14%	9%
5	15%	10%	11%	14%	14%	22%	11%	14%	13%
6	20%	15%	22%	19%	23%	22%	16%	19%	17%
7	25%	20%	28%	19%	23%	28%	21%	24%	26%
8	35%	30%	39%	24%	32%	33%	26%	24%	26%
Totales	35%			30%			25%		

Calc caseína

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	5%	5%	0%	12%	9%	11%	11%	15%	14%
2	5%	10%	5%	16%	9%	16%	22%	25%	18%
3	11%	14%	10%	24%	14%	16%	28%	35%	32%
4	11%	19%	19%	28%	18%	21%	39%	40%	36%
5	16%	24%	29%	32%	32%	26%	44%	50%	45%
6	21%	24%	29%	40%	41%	37%	56%	55%	50%
7	26%	33%	33%	44%	45%	47%	67%	65%	59%
8	37%	38%	43%	52%	50%	58%	78%	75%	68%
Totales	39%			53%			74%		

Fat burner

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Días	0,01gr/ml			0,025gr/ml			0,05gr/ml		
1	10%	12%	5%	14%	9%	10%	17%	19%	18%
2	15%	12%	16%	18%	13%	15%	28%	29%	23%
3	25%	24%	26%	27%	22%	15%	33%	33%	36%
4	30%	29%	32%	32%	35%	25%	44%	48%	50%
5	40%	41%	42%	41%	43%	40%	56%	57%	55%
6	55%	53%	58%	50%	57%	55%	61%	71%	68%
7	60%	65%	63%	59%	65%	65%	72%	81%	82%
8	70%	71%	68%	73%	74%	75%	78%	90%	91%
Totales	70%			74%			86%		

Días	Control 1	Control 2	Control 3
1	0%	0%	5%
2	5%	0%	5%
3	5%	9%	9%
4	14%	17%	14%
5	18%	22%	18%
6	27%	26%	23%
7	27%	30%	32%
8	36%	30%	36%
Totales	34%		

Anexo 7. Análisis estadístico del ensayo de resistencia al estrés oxidativo

Con 0,01gr/ml de los distintos tratamientos

En primer lugar, se evalúa las medidas de resumen en esta dosis de tratamiento con los suplementos:

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Calc caseína	% mortalidad	24	19,46	12,19	62,67	19,00
Control	% mortalidad	24	17,00	11,83	69,58	17,50
Creatina	% mortalidad	24	32,46	18,72	57,66	31,00
Fat burner	% mortalidad	24	38,42	21,59	56,19	36,00
L-Glu	% mortalidad	24	26,54	12,97	48,88	26,00
Omellete	% mortalidad	24	12,75	12,06	94,58	10,00

Tabla XXI. Medidas de resumen del análisis de la variable porcentaje de mortalidad, con el agregado de 0,01gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

Describiendo la media en orden creciente se puede ordenar: Control, Omellete, Calc caseína, L-glu, Creatina y por último Fat Burner. En cuanto al coeficiente de variación, supera el 20% en los tratamientos con L-glu, creatina y Fat Burner, lo que indica que los datos no son homogéneos; mientras que en el resto de los tratamientos es inferior al 20%, indicando que son homogéneos.

Para observar la presencia o ausencia de datos atípicos y ver gráficamente las medidas de resumen se realizó el siguiente box-plot.

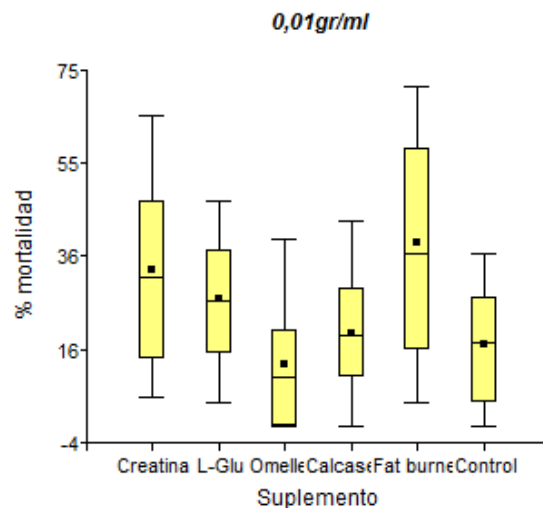


Gráfico 19. Gráfico Box-plot del porcentaje de mortalidad según la aplicación de cada suplemento en una dosis de 0,01gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo.

Se puede inferir que no hay presencia de datos atípicos y que en general, en todos los tratamientos e incluso en el control, la media y la mediana son relativamente cercanas. Gráficamente se observa cierta similitud entre el porcentaje de mortalidad del omellete con respecto al control, sin diferencia significativa, como se describe más adelante.

Al haber planteado un modelo estadístico ANOVA, se postula como hipótesis nula o H_0 :

H_0 : El porcentaje de mortalidad de nematodos no varía con el agregado de 0,01gr/ml de suplementos dietarios con respecto del tratamiento control habiendo sido sometidos a estrés oxidativo.

Por lo tanto, se postula como H_1 :

H_1 : El agregado de 0,01gr/ml de suplementos dietarios influye en el porcentaje de mortalidad de nematodos habiendo sido sometidos a estrés oxidativo.

Para llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente a este modelo, se observó nuevamente si se cumplía con los siguientes supuestos:

- 1- Muestras aleatorias y observaciones independientes: la preparación de los nematodos para la aplicación de los tratamientos y la forma de observación según cada pocillo demuestra que se cumplió con este supuesto.
- 2- Supuesto de normalidad: para ello se realizó la Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. En la Tabla XXII se puede observar que no todos los tratamientos resultan normales dado que no en todos los casos se cumple que el p-valor sea menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto de normalidad no se cumple, es decir, hay evidencia de que la variable no se distribuye normalmente en todos los tratamientos con una dosis de 0,01gr/ml habiendo sometido a los nematodos a estrés oxidativo.

Shapiro-Wilks (modificado)

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Calc caseína	% mortalidad	24	19,46	12,19	0,93	0,2568
Control	% mortalidad	24	17,00	11,83	0,89	0,0405
Creatina	% mortalidad	24	32,46	18,72	0,89	0,0390
Fat burner	% mortalidad	24	38,42	21,59	0,89	0,0286
L-Glu	% mortalidad	24	26,54	12,97	0,90	0,0650
Omellete	% mortalidad	24	12,75	12,06	0,86	0,0060

Tabla XXII. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de normalidad con una dosis de 0,01gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

- 3- Supuesto de Homocedasticidad: Se corroboró este supuesto mediante la Prueba de Levene. En la Tabla XXIII se puede ver el análisis de los residuos de la variable, donde resulta que las varianzas del porcentaje de mortalidad en los tratamientos no son iguales al control, dado que el p-valor arrojado fue menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto no se cumple, es decir, al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad de los nematodos sometidos a distintos suplementos con una dosis de 0,01gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo difiere respecto del control.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS % mortalidad	144	0,19	0,16	57,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1727,94	5	345,59	6,35	<0,0001
Suplemento	1727,94	5	345,59	6,35	<0,0001
Error	7514,64	138	54,45		
Total	9242,58	143			

Tabla XXIII. Prueba de Levene. Análisis de los residuos absolutos las varianzas del porcentaje de mortalidad en nematodos sometidos a los distintos suplementos con 0,01gr/ml de estos y tratamiento de estrés oxidativo.

Al observar el gráfico 20, se puede apreciar la variabilidad entre el grupo control y los distintos tratamientos. Gráficamente, el suplemento omellete es el más cercano al grupo control, mientras que el más alejado es la creatina.

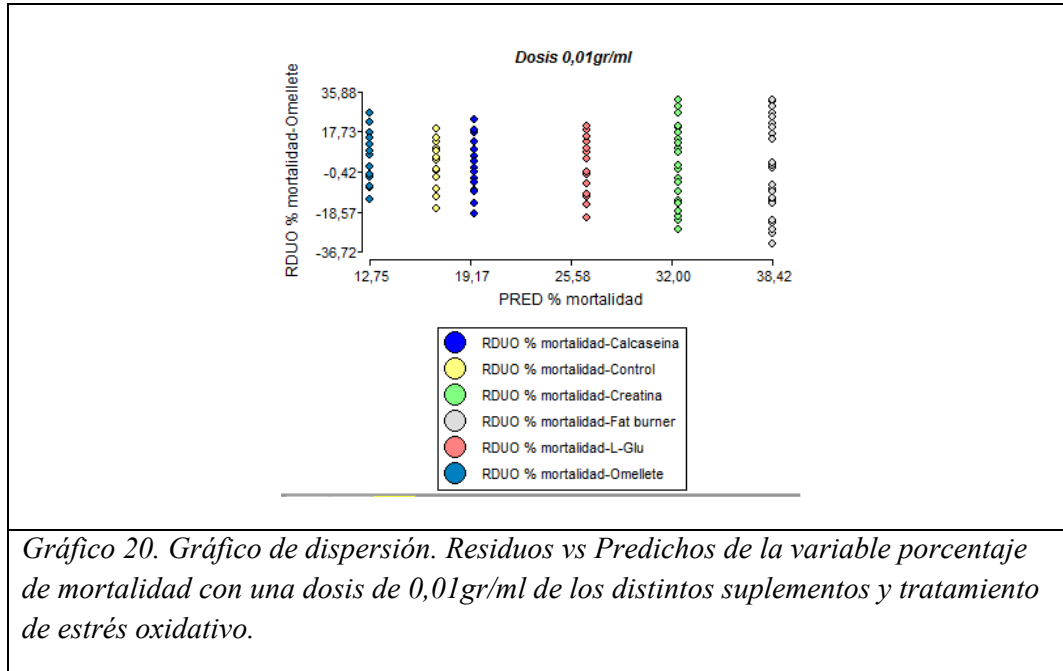


Gráfico 20. Gráfico de dispersión. Residuos vs Predichos de la variable porcentaje de mortalidad con una dosis de 0,01gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

Debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad, ni de homocedasticidad exigido por el modelo de análisis de la varianza paramétrica, se procedió a realizar un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Suplemento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% mortalidad	Calc caseina	24	19,46	12,19	19,00	32,65	<0,0001
% mortalidad	Control	24	17,00	11,83	17,50		
% mortalidad	Creatina	24	32,46	18,72	31,00		
% mortalidad	Fat burner	24	38,42	21,59	36,00		
% mortalidad	L-Glu	24	26,54	12,97	26,00		
% mortalidad	Omellete	24	12,75	12,06	10,00		

Tabla XXIV. Prueba de Kruskal Wallis. Análisis de la varianza no paramétrica.

Mediante este análisis, se infiere que al no superar el nivel de significación del 5%, ($p < 0,05$), el porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,01gr/ml de los suplementos y tratamiento de estrés oxidativo difiere de su tendencia central.

Para observar las comparaciones entre grupos, se hace realiza la prueba de comparaciones de Tukey:

‡ mortalidad 144 0,26 0,23 62,92						
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	11541,23	5	2308,25	9,76	<0,0001	
Suplemento	11541,23	5	2308,25	9,76	<0,0001	
Error	32628,21	138	236,44			
Total	44169,44	143				
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,67391						
Error: 236,4363 gl: 138						
Suplemento	Medias	n	E.E.			
Omellete	12,75	24	3,14	A		
Control	17,00	24	3,14	A	B	
Calc caseina	19,46	24	3,14	A	B	
L-Glu	26,54	24	3,14	B	C	
Creatina	32,46	24	3,14		C	
Fat burner	38,42	24	3,14		C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)						
<i>Tabla XXV. Prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,01gr/ml de los distintos tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).</i>						

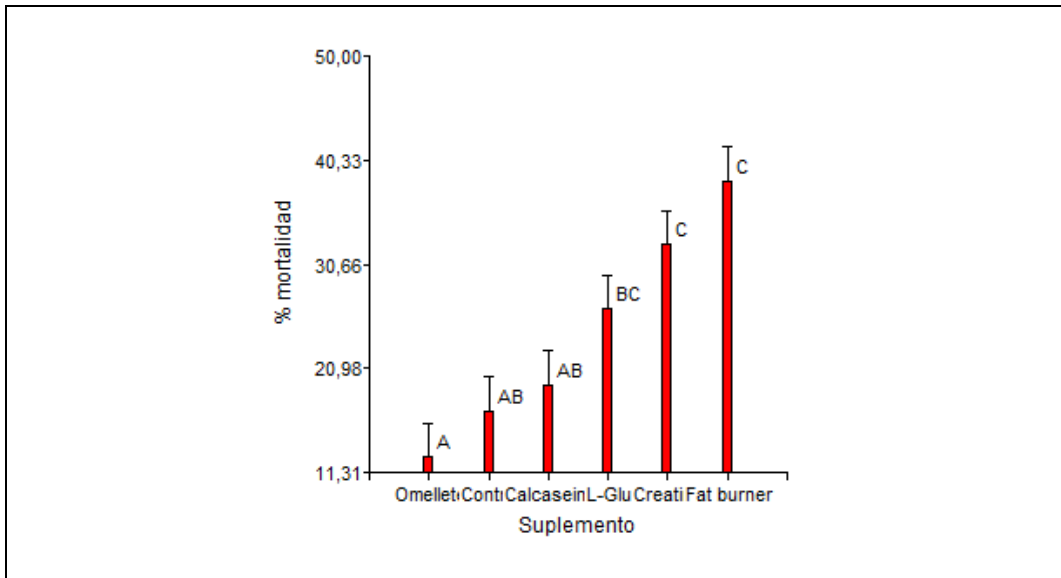


Gráfico 21. Gráfico de barras de la prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,01gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo. Medias de la variable porcentaje de mortalidad con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Esta prueba de comparaciones de Tukey arroja que la Diferencia Mínima Significativa (DMS) entre los grupos en esta dosis de 0,01gr/ml de cada tratamiento es de 12,67391 para considerar que existe diferencia en el porcentaje de mortalidad entre un tratamiento y otro. Las letras diferentes en que fueron agrupados los distintos tratamientos a través de esta prueba (Grupo A: Omellete; Grupo AB: Control y Calcaseína; Grupo BC: L-glu; Grupo C: Creatina y Fat Burner) indican una diferencia significativa entre los tratamientos de los otros grupos.

Por lo tanto, se puede decir que existe una diferencia significativa mayor entre el porcentaje de mortalidad del tratamiento control y la creatina. También se observa diferencias significativas entre la L-glu, Calcaseína y Fat Burner respecto del grupo control.

Con 0,025gr/ml de los distintos tratamientos

De los datos surgidos se evalúa las medidas de resumen en esta dosis de tratamiento con los suplementos:

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mediana
Calc caseína	% mortalidad	24	29,08	15,22	52,33	27,00
Control	% mortalidad	24	17,00	11,83	69,58	17,50
Creatina	% mortalidad	24	43,46	19,19	44,15	41,50
Fat burner	% mortalidad	24	38,83	22,34	57,53	37,50
L-Glu	% mortalidad	24	36,46	17,60	48,29	36,50
Omellete	% mortalidad	24	15,08	9,44	62,59	14,00

Tabla XXVI. Medidas de resumen del análisis de la variable porcentaje de mortalidad, con el agregado de 0,025gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

Describiendo la media en orden creciente se puede ordenar: Omellete, Control, Calc caseína, L-glu, Fat Burner y Creatina. En cuanto al coeficiente de variación, supera el 20% en todos los casos, lo que indica que los datos no son homogéneos.

Para observar la presencia o ausencia de datos atípicos y ver gráficamente las medidas de resumen se realizó el siguiente box-plot.

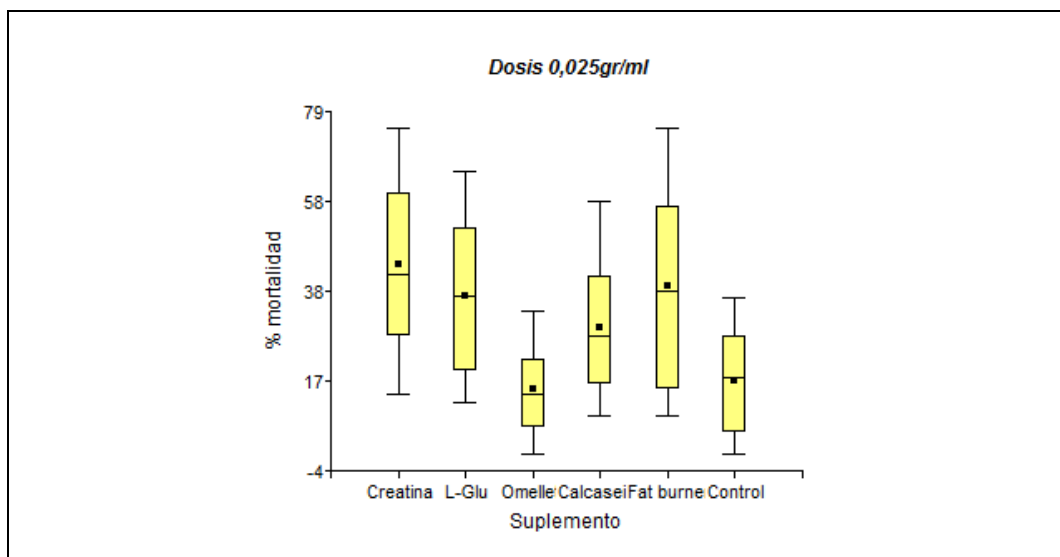


Gráfico 22. Gráfico Box-plot del porcentaje de mortalidad según la aplicación de cada suplemento en una dosis de 0,025gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo.

Se puede inferir que no hay presencia de datos atípicos y que en general, en todos los tratamientos e incluso en el control, la media y la mediana son relativamente cercanas. Gráficamente se observa nuevamente cierta similitud entre el porcentaje de mortalidad

del omellete con respecto al control, sin relevancia significativa, como se describe más adelante.

Al haber planteado un modelo estadístico ANOVA, se postula como hipótesis nula o H0:

H0: El porcentaje de mortalidad de nematodos no varía con el agregado de 0,025gr/ml de suplementos dietarios con respecto del tratamiento control habiendo sido sometidos a estrés oxidativo.

Por lo tanto, se postula como H1:

H1: El agregado de 0,025gr/ml de suplementos dietarios influye en el porcentaje de mortalidad de nematodos habiendo sido sometidos a estrés oxidativo.

Para llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente a este modelo, se observó si se cumplía con los siguientes supuestos:

- 1- Muestras aleatorias y observaciones independientes: la preparación de los nematodos para la aplicación de los tratamientos y la forma de observación según cada well demuestra que se cumplió con este supuesto.
- 2- Supuesto de normalidad: para ello se realizó la Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. En la Tabla XXVII se puede observar que no todos los tratamientos resultan normales dado que no en todos los casos se cumple que el p-valor sea menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto de normalidad no se cumple, es decir, hay evidencia de que la variable no se distribuye normalmente en todos los tratamientos con una dosis de 0,025gr/ml habiendo sometido a los nematodos a estrés oxidativo.

Shapiro-Wilks (modificado)

Suplemento	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Calc caseína	% mortalidad	24	29,08	15,22	0,90	0,0540
Control	% mortalidad	24	17,00	11,83	0,89	0,0405
Creatina	% mortalidad	24	43,46	19,19	0,91	0,0992
Fat burner	% mortalidad	24	38,83	22,34	0,88	0,0161
L-Glu	% mortalidad	24	36,46	17,60	0,88	0,0173
Omellete	% mortalidad	24	15,08	9,44	0,93	0,2964

Tabla XXVII. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la variable porcentaje de normalidad con una dosis de 0,025gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

3- Supuesto de Homocedasticidad: Se corroboró este supuesto mediante la Prueba de Levene. En la Tabla XXVIII se puede ver el análisis de los residuos de la variable, donde resulta que las varianzas del porcentaje de mortalidad en los tratamientos no son iguales al control, dado que el p-valor arrojado fue menor a 0,05. Por lo tanto, el supuesto no se cumple, es decir, al menos una de las varianzas del porcentaje de mortalidad de los nematodos sometidos a distintos suplementos con una dosis de 0,025gr/ml y tratamiento de estrés oxidativo, difiere respecto del control.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS % mortalidad	144	0,20	0,17	57,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2124,56	5	424,91	6,88	<0,0001
Suplemento	2124,56	5	424,91	6,88	<0,0001
Error	8525,22	138	61,78		
Total	10649,78	143			

Tabla XXVIII. Prueba de Levene. Análisis de los residuos absolutos las varianzas del porcentaje de mortalidad en nematodos sometidos a los distintos suplementos con 0,025gr/ml de estos y tratamiento de estrés oxidativo.

Al observar el gráfico 23, se puede apreciar la variabilidad entre el grupo control y los distintos tratamientos. Gráficamente, el suplemento omellete es el más cercano al grupo control, mientras que el más alejado es la creatina.

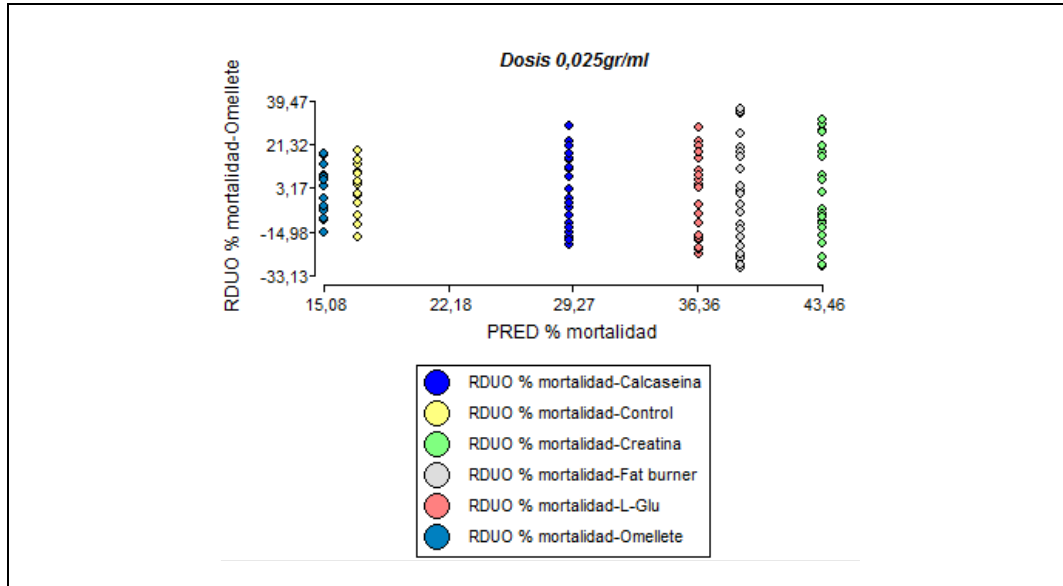


Gráfico 23. Gráfico de dispersión. Residuos vs Predichos de la variable porcentaje de mortalidad con una dosis de 0,025gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo.

Debido a que no se cumplen los supuestos de normalidad, ni de homocedasticidad exigido por el modelo de análisis de la varianza paramétrica, se procedió a realizar un análisis de la varianza no paramétrica Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Suplemento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% mortalidad	Calc caseína	24	29,08	15,22	27,00	43,85	<0,0001
% mortalidad	Control	24	17,00	11,83	17,50		
% mortalidad	Creatina	24	43,46	19,19	41,50		
% mortalidad	Fat burner	24	38,83	22,34	37,50		
% mortalidad	L-Glu	24	36,46	17,60	36,50		
% mortalidad	Omellete	24	15,08	9,44	14,00		

Tabla XXIX. Prueba de Kruskal Wallis. Análisis de la varianza no paramétrica.

Mediante este análisis, se infiere que al no superar el nivel de significación del 5%, ($p < 0,05$), el porcentaje de mortalidad en alguno de los tratamientos expuestos a 0,025gr/ml de los suplementos y tratamiento de estrés oxidativo difiere de su tendencia central.

Para observar las comparaciones entre grupos, se hace realiza la prueba de comparaciones de Tukey:

§ mortalidad 144 0,31 0,28 55,10					
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16637,06	5	3327,41	12,19	<0,0001
Suplemento	16637,06	5	3327,41	12,19	<0,0001
Error	37668,92	138	272,96		
Total	54305,97	143			
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=13,61775					
Error: 272,9632 gl: 138					
Suplemento Medias n E.E.					
Omellete	15,08	24	3,37	A	
Control	17,00	24	3,37	A	B
Calc caseina	29,08	24	3,37	B	C
L-Glu	36,46	24	3,37	C	D
Fat burner	38,83	24	3,37	C	D
Creatina	43,46	24	3,37	D	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Tabla XXX. Prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,025gr/ml de los distintos tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

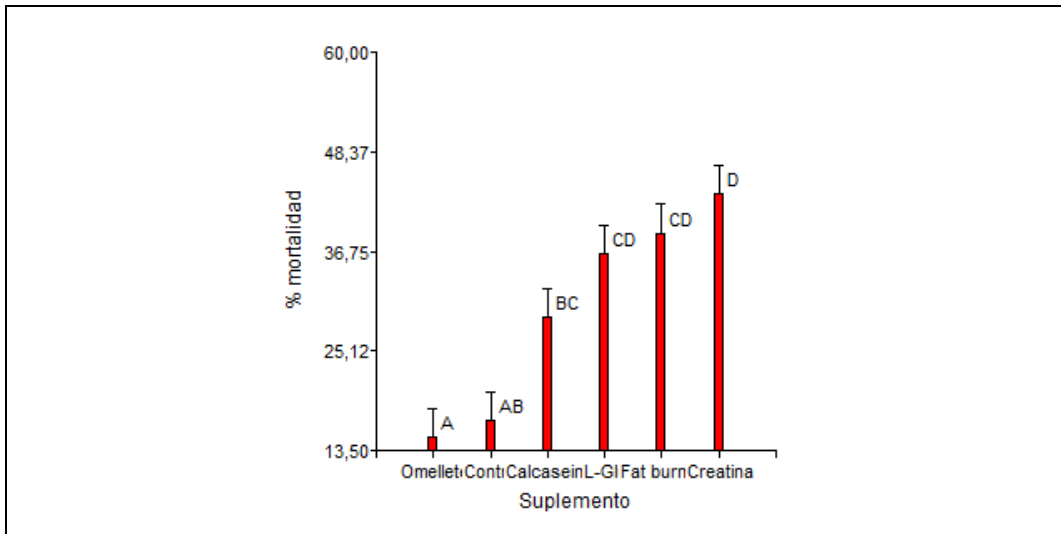


Gráfico 24. Gráfico de barras de la prueba de comparaciones de Tukey para dosis de 0,025gr/ml de los distintos suplementos y tratamiento de estrés oxidativo. Medias de la variable porcentaje de mortalidad con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Esta prueba de comparaciones de Tukey arrojó que la Diferencia Mínima Significativa (DMS) entre los grupos en esta dosis de 0,025gr/ml de cada tratamiento es de 13,61775. Las letras diferentes en que fueron agrupados los distintos tratamientos a través de esta prueba (Grupo A: Omellete; Grupo AB: Control; Grupo BC: Calcasaína; Grupo CD: L-glu y Fat Burner; y por último Grupo D: Creatina) indican una diferencia significativa entre los tratamientos de los otros grupos.

Por lo tanto, como en el caso de la dosis anterior, se puede decir que existe una diferencia significativa mayor entre el porcentaje de mortalidad del tratamiento control y la creatina. También se observa diferencias significativas entre la L-glu, Calcasaína y Fat Burner respecto del grupo control.

BIBLIOGRAFÍA

- Altun, Z. F. H., D.H. (2009). "Introduction". In WormAtlas." <<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>>.
- Altun, Z. F. H., L.A, C. Crocker, R. Lints and D. H. Hall. (2012). "Handbook of *C. elegans* Anatomy" in WormAtlas. <<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>>
- Antoshechkin I, Sternberg PW (2007). "The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research". Nat Rev Genet. 2007 Jul;**8**(7):518-32.
- Artal-Sanz M, de Jong L, Tavernarakis N (2006). "*Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery". Biotechnol J. 2006 Dec;**1**(12):1405-18.
- Austin, K. G., E. K. Farina and H. R. Lieberman (2016). "Self-reported side-effects associated with use of dietary supplements in an armed forces population." Drug Test Anal **8**(3-4): 287-295.
- Berube-Parent, S., C. Pelletier, J. Dore and A. Tremblay (2005). "Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men." Br J Nutr **94**(3): 432-436.
- Branch, J. D. (2003). "Effect of creatine supplementation on body composition and performance: a meta-analysis." Int J Sport Nutr Exerc Metab **13**(2): 198-226.
- Brenner, S. (1974). "The Genetics of *CAENORHABDITIS ELEGANS*". Genetics. 1974 May; **77**(1): 71-94.
- Buckman, J. F., S. G. Farris and D. A. Yusko (2013). "A national study of substance use behaviors among NCAA male athletes who use banned performance enhancing substances." Drug Alcohol Depend **131**(1-2): 50-55.
- Buford, T. W., R. B. Kreider, J. R. Stout, M. Greenwood, B. Campbell, M. Spano, T. Ziegenfuss, H. Lopez, J. Landis and J. Antonio (2007). "International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise." J Int Soc Sports Nutr **4**: 6.
- Burns, R. D., M. R. Schiller, M. A. Merrick and K. N. Wolf (2004). "Intercollegiate student athlete use of nutritional supplements and the role of athletic trainers and dietitians in nutrition counseling." J Am Diet Assoc **104**(2): 246-249.
- Butts, J., B. Jacobs and M. Silvis (2018). "Creatine Use in Sports." Sports Health **10**(1): 31-34.
- Carvajal, C. (2019). "Reactive oxygen species: training, function and oxidative stress." Medicina Legal de Costa Rica **36**(1): 91-100.
- Ahamefule CS, Qin Q, Odiba AS, Li S, Moneke AN, Ogbonna JC, Jin C, Wang B, Fang W (2020). "*Caenorhabditis elegans*- Based *Aspergillus fumigatus* Infection Model for Evaluating Pathogenicity and Drug Efficacy". Cell Infect Microbiol. 2020 Jun **26**;10:320.
- Claudino, J. G., B. Mezencio, S. Amaral, V. Zanetti, F. Benatti, H. Roschel, B. Gualano, A. C. Amadio and J. C. Serrao (2014). "Creatine monohydrate supplementation on lower-limb muscle power in Brazilian elite soccer players." J Int Soc Sports Nutr **11**: 32.

Close, G. L., D. L. Hamilton, A. Philp, L. M. Burke and J. P. Morton (2016). "New strategies in sport nutrition to increase exercise performance." Free Radic Biol Med **98**: 144-158.

Código Alimentario Argentino. Capítulo V. Disponible en https://www.argentina.gov.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_v_2021-05.pdf

Colls Garrido, C., J. L. Gomez-Urquiza, G. A. Canadas-De la Fuente and R. Fernandez-Castillo (2015). "[Use, Effects, and Knowledge of the Nutritional Supplements for the Sport in University Students]." Nutr Hosp **32**(2): 837-844.

Coqueiro, A. Y., M. M. Rogero and J. Tirapegui (2019). "Glutamine as an Anti-Fatigue Amino Acid in Sports Nutrition." Nutrients **11**(4).

Corsi, A. K. W., B. A Chalfie, M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. ed. The C. elegans Research Community, in WormBook, <<http://www.wormbook.org>>.

Costill, D. L., G. P. Dalsky and W. J. Fink (1978). "Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance." Med Sci Sports **10**(3): 155-158.

Cruzat, V., M. Macedo Rogero, K. Noel Keane, R. Curi and P. Newsholme (2018). "Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation." Nutrients **10**(11).

Davani-Davari, D., I. Karimzadeh, S. Ezzatzadegan-Jahromi and M. M. Sagheb (2018). "Potential Adverse Effects of Creatine Supplement on the Kidney in Athletes and Bodybuilders." Iran J Kidney Dis **12**(5): 253-260.

Demling, R. H. and L. DeSanti (2000). "Effect of a hypocaloric diet, increased protein intake and resistance training on lean mass gains and fat mass loss in overweight police officers." Ann Nutr Metab **44**(1): 21-29.

Diez, V., Traikov, S., Schmeisser, K. et al. "Glycolate combats massive oxidative stress by restoring redox potential in *Caenorhabditis elegans*". Commun Biol **4**, 151 (2021).

Draganidis, D., N. Chondrogianni, A. Chatzinikolaou, G. Terzis, L. G. Karagounis, A. Sovatzidis, A. Avloniti, M. Lefaki, M. Protopapa, C. K. Deli, K. Papanikolaou, A. Z. Jamurtas and I. G. Fatouros (2017). "Protein ingestion preserves proteasome activity during intense aseptic inflammation and facilitates skeletal muscle recovery in humans." Br J Nutr **118**(3): 189-200.

Engleman EA, Katner SN, Neal-Beliveau BS (2016). "*Caenorhabditis elegans* as a Model to Study the Molecular and Genetic Mechanisms of Drug Addiction". Prog Mol Biol Transl Sci. 2016;137:229-52.

Essig, D. C., D.L and P. J. Van Handel (1980). "Effects of caffeine ingestion on utilization of muscle glycogen and lipid during leg ergometer cycling." Int J Sports Med **1**: 86-90.

Ewbank JJ, Zugasti O (2011). "*C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery". Dis Model Mech. **4**(3):300-4.

Finsterer, J. (2012). "Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise." BMC Musculoskelet Disord **13**: 218.

- Fire, A. Z. (2007). "Gene silencing by double-stranded RNA." Cell Death Differ **14**(12): 1998-2012.
- FDA Consumer Magazine archive. FDA Consumer published online from 1989-2007. Recuperado 26.may.2013].
- Food and Drug Administration (FDA) (2018). Official website. Updated 28.oct.2018. [consulta oct.2021]. <<https://www.fda.gov>>.
- Garthe, I. and R. J. Maughan (2018). "Athletes and Supplements: Prevalence and Perspectives." Int J Sport Nutr Exerc Metab **28**(2): 126-138.
- Geller, A. I., N. Shehab, N. J. Weidle, M. C. Lovegrove, B. J. Wolpert, B. B. Timbo, R. P. Mozersky and D. S. Budnitz (2015). "Emergency Department Visits for Adverse Events Related to Dietary Supplements." N Engl J Med **373**(16): 1531-1540.
- Geyer, H., U. Mareck-Engelke, U. Reinhart, M. Thevis and W. Schañzer (2000). "Positive doping cases with norandrosterone after application of contaminated nutritional supplement." Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin **51**: 378-382.
- Geyer, H., M. K. Parr, K. Koehler, U. Mareck, W. Schanzer and M. Thevis (2008). "Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances." J Mass Spectrom **43**(7): 892-902.
- Gmeiner, G. and H. Hofer (2002). "Study into possible contaminations of nutritional supplements by anabolic steroids." Forschungsberichte des Österreichischen Bundesministeriums für soziale Sicherheit und Generationen.
- Greenwood, M., R. B. Kreider, L. Greenwood and A. Byars (2003). "Cramping and Injury Incidence in Collegiate Football Players Are Reduced by Creatine Supplementation." J Athl Train **38**(3): 216-219.
- Greydanus, D. E. and D. R. Patel (2010). "Sports doping in the adolescent: the Faustian conundrum of Hors de Combat." Pediatr Clin North Am **57**(3): 729-750.
- Harris, R. C., K. Soderlund and E. Hultman (1992). "Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation." Clin Sci (Lond) **83**(3): 367-374.
- Haug, A., A. T. Hostmark and O. M. Harstad (2007). "Bovine milk in human nutrition--a review." Lipids Health Dis **6**: 25.
- Havenetidis, K. (2016). "The use of creatine supplements in the military." J R Army Med Corps **162**(4): 242-248.
- Hida A, Hasegawa Y, Mekata Y, Usuda M, Masuda Y, Kawano H, Kawano Y (2012). "Effects of egg white protein supplementation on muscle strength and serum free amino acid concentrations". Nutrients. **4**(10):1504-17.
- Hunt PR (2017). "The *C. elegans* model in toxicity testing". J Appl Toxicol. 2017 Jan; **37**(1): 50–59.
- Ichinose, T., S. Nomura, Y. Someya, S. Akimoto, K. Tachiyashiki and K. Imaizumi (2011). "Effect of endurance training supplemented with green tea extract on substrate metabolism during exercise in humans." Scand J Med Sci Sports **21**(4): 598-605.

- Jeukendrup, A. E. and R. Randell (2011). "Fat burners: nutrition supplements that increase fat metabolism." Obes Rev **12**(10): 841-851.
- Knapik, J. J., R. A. Steelman, S. S. Hoedebecke, K. G. Austin, E. K. Farina and H. R. Lieberman (2016). "Prevalence of Dietary Supplement Use by Athletes: Systematic Review and Meta-Analysis." Sports Med **46**(1): 103-123.
- Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y (2000). "Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid". J Agric Food Chem. **48**(12):6261-6.
- Kratz, F (2008). "Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles". J Control Release **132**(3):171-83.
- Kreider, R. B. (2003). "Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations." Mol Cell Biochem **244**(1-2): 89-94.
- Kreider, R. B., D. S. Kalman, J. Antonio, T. N. Ziegenfuss, R. Wildman, R. Collins, D. G. Candow, S. M. Kleiner, A. L. Almada and H. L. Lopez (2017). "International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine." J Int Soc Sports Nutr **14**: 18.
- Kreider, R. B., C. Melton, C. J. Rasmussen, M. Greenwood, S. Lancaster, E. C. Cantler, P. Milnor and A. L. Almada (2003). "Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes." Mol Cell Biochem **244**(1-2): 95-104.
- Kunz, C. and B. Lonnerdal (1990). "Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods." Am J Clin Nutr **51**(1): 37-46.
- Leijten, P. A. and C. van Breemen (1984). "The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta." J Physiol **357**: 327-339.
- Lemon, P. W. (2002). "Dietary creatine supplementation and exercise performance: why inconsistent results?" Can J Appl Physiol **27**(6): 663-681.
- Li, N., R. Hauser, T. Holford, Y. Zhu, Y. Zhang, B. A. Bassig, S. Honig, C. Chen, P. Boyle, M. Dai, S. M. Schwartz, P. Morey, H. Sayward, Z. Hu, H. Shen, P. Gomery and T. Zheng (2015). "Muscle-building supplement use and increased risk of testicular germ cell cancer in men from Connecticut and Massachusetts." Br J Cancer **112**(7): 1247-1250.
- Li Yu, Gao S, Jing H, Qi L, Ning J, Tan Z, Yang K, Zhao C, Ma L, Li G (2013). "Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent ". Toxicology Research, Volume 2,6, November 2013. 403-412.
- Maglioni S, Arsalan N, Ventura N (2016). "*C. elegans* screening strategies to identify pro-longevity interventions". Mech Ageing Dev 2016 Jul; 157:60-9.
- Martinez-Sanz, J. M., I. Sospedra, C. M. Ortiz, E. Baladia, A. Gil-Izquierdo and R. Ortiz-Moncada (2017). "Intended or Unintended Doping? A Review of the Presence of Doping Substances in Dietary Supplements Used in Sports." Nutrients **9**(10).
- Maughan, R. J. (2005). "Contamination of dietary supplements and positive drug tests in sport." J Sports Sci **23**(9): 883-889.

- Markaki M, Nektarios T (2020). “*Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases”. *Biotechnology* 2020, 63:118–125
- Morcos M, Hutter H (2009). “The model *Caenorhabditis elegans* in diabetes mellitus and Alzheimer's disease”. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(4):897-908.
- Murase, T., S. Haramizu, A. Shimotoyodome, A. Nagasawa and I. Tokimitsu (2005). "Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**(3): R708-715.
- Murase, T., S. Haramizu, A. Shimotoyodome, I. Tokimitsu and T. Hase (2006). "Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**(6): R1550-1556.
- Pasiakos, S. M., S. J. Montain and A. J. Young (2013). "Protein supplementation in U.S. military personnel." *J Nutr* **143**(11): 1815S-1819S.
- Petroczi, A. and D. P. Naughton (2008). "The age-gender-status profile of high performing athletes in the UK taking nutritional supplements: lessons for the future." *J Int Soc Sports Nutr* **5**: 2.
- Pluim, B. M., A. Ferrauti, F. Broekhof, M. Deutekom, A. Gotzmann, H. Kuipers and K. Weber (2006). "The effects of creatine supplementation on selected factors of tennis specific training." *Br J Sports Med* **40**(6): 507-511; discussion 511-502.
- Poortmans, J. R. and M. Francaux (2000). "Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction?" *Sports Med* **30**(3): 155-170.
- Poulios, A., K. Georgakouli, D. Draganidis, C. K. Deli, P. D. Tsimeas, A. Chatzinikolaou, K. Papanikolaou, A. Batrakoulis, M. Mohr, A. Z. Jamurtas and I. G. Fatouros (2019). "Protein-Based Supplementation to Enhance Recovery in Team Sports: What is the Evidence?" *J Sports Sci Med* **18**(3): 523-536.
- Ramezani Ahmadi, A., E. Rayyani, M. Bahreini and A. Mansoori (2019). "The effect of glutamine supplementation on athletic performance, body composition, and immune function: A systematic review and a meta-analysis of clinical trials." *Clin Nutr* **38**(3): 1076-1091.
- Rodriguez, N. R., N. M. DiMarco, S. Langley, A. American Dietetic, C. Dietitians of, N. American College of Sports Medicine and P. Athletic (2009). "Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance." *J Am Diet Assoc* **109**(3): 509-527.
- Romanowski, A. (2013). *Ritmos circadianos y estrés en Caenorhabditis Elegans*, Universidad de Quilmes.
- Roth, E. (2008). "Nonnutritive effects of glutamine." *J Nutr* **138**(10): 2025S-2031S
- Santoro, M, Biondo, B, Prada, F, Cardozo, J (2016). “Efecto de diferentes endulzantes sobre la obesidad y expectativa de vida en el modelo de *Caenorhabditis Elegans*”, repositorio UADE (2016-11).
- Schafer R William (2004). “Addiction research in a simple animal model: the nematode *Caenorhabditis elegans*”. *Neuropharmacology.* 2004;47 Suppl 1:123-31

- Shimotoyodome, A., S. Haramizu, M. Inaba, T. Murase and I. Tokimitsu (2005). "Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice." Med Sci Sports Exerc **37**(11): 1884-1892.
- Silverman GA, Luke CJ, Bhatia SR, Long OS, Vetica AC, Perlmutter DH, Pak SC (2009). "Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*". Pediatr Res **65**(1):10-8.
- Simonetta, S ; Migliori, M; Romanowski, A ; Golombek, D. (2009). "Timing of locomotor activity circadian rhythms in *Caenorhabditis elegans*" PLoS ONE **4**(10): e7571.
- Snijders, T., P. T. Res, J. S. Smeets, S. van Vliet, J. van Kranenburg, K. Maase, A. K. Kies, L. B. Verdijk and L. J. van Loon (2015). "Protein Ingestion before Sleep Increases Muscle Mass and Strength Gains during Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Healthy Young Men." J Nutr **145**(6): 1178-1184.
- Schmidt Enrico, Mark Seifert, Ralf Baumeister. (2007) "*Caenorhabditis elegans* as a model system for Parkinson's disease". Neurodegenerative Disease **4**(2-3):199-217.
- Stein, L. D. and J. Thierry-Mieg (1998). "Scriptable access to the *Caenorhabditis elegans* genome sequence and other ACEDB databases." Genome Res **8**(12): 1308-1315.
- Strange Kevin (2007). "Revisiting the Krogh Principle in the post-genome era: *Caenorhabditis elegans* as a model system for integrative physiology research". J Exp Biol **210**(Pt 9):1622-31.
- Thomas, D. T., K. A. Erdman and L. M. Burke (2016). "Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance." J Acad Nutr Diet **116**(3): 501-528.
- Thompson, C. H., G. J. Kemp, A. L. Sanderson, R. M. Dixon, P. Styles, D. J. Taylor and G. K. Radda (1996). "Effect of creatine on aerobic and anaerobic metabolism in skeletal muscle in swimmers." Br J Sports Med **30**(3): 222-225.
- Wah Chu, K. and K. L. Chow (2002). "Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative." Aquat Toxicol **61**(1-2): 53-64.
- Williams, J., G. Abt and A. E. Kilding (2014). "Effects of creatine monohydrate supplementation on simulated soccer performance." Int J Sports Physiol Perform **9**(3): 503-510.
- WormAtlas, Altun, Z.F., Herndon, L.A., Wolkow, C.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. (ed.s) 2002-2021. <http://www.wormatlas.org>
- Yochem, J. K. (2006). "Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis." WormBook: 1-47.
- York WS, Agravat S, Aoki-Kinoshita KF, McBride R, Campbell MP, Costello CE, Dell A, Feizi T, Haslam SM, Karlsson N, Khoo KH, Kolarich D, Liu Y, Novotny M, Packer NH, Paulson JC, Rapp E, Ranzinger R, Rudd PM, Smith DF, Struwe WB, Tiemeyer M, Wells L, Zaia J, Kettner C (2014). "MIRAGE: the minimum information required for a glycomics experiment". Glycobiology **24**(5):402-6.