



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Biotecnología Molecular

**FORMULACIÓN PROBIÓTICA DERIVADA DE CEPAS NATIVAS DE
PERRO USADA COMO COMPLEMENTO EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES DE MASCOTAS**

Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología Molecular

POR: Paula Kathein Buldres Inzunza

Profesor Guía: Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso

Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos

Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Concepción, 24 de mayo de 2023

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

“Donde haya un árbol que plantar, plántalo tú. Donde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú. Donde haya un esfuerzo que todos esquivan, hazlo tú. Sé tú el que aparta la piedra del camino.”

Gabriela Mistral

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que han estado en este camino de hacer un postgrado en plena pandemia, con todas las dificultades físicas y emocionales que implicó. Quiero agradecer primero a mi eterna compañera de pregrado y magíster, la seca de la Mary. Recuerdo que nos convencimos una a la otra de entrar, y ahora que terminó este proceso sólo me queda agradecer el apañe en todo aspecto; como al estudiar conmigo en horarios que ambas podíamos por Teams; el acompañarme en el lab aunque no trabajáramos en los mismos lugares y el escucharme siempre con paciencia y amor, eres la mejor amiga que me pudo dejar el arco y este programa.

Luego están mis ex roomies, el Félix que es mi modelo a seguir como científico, como profesional y como el “primer egresado del programa” (un clásico jaja). Gracias por compartir todo lo que sabes conmigo, tienes una paciencia infinita y no pude haber quedado en mejor compañía tanto en el lab como en el depa. También gracias al Santi, que sumándose al final de la temporada del 303, mostraste ser el mejor compañero de depa y de lab, esperando que yo terminara de trabajar y luego esperar al Félix, por supuesto. Tiene todos mis respetos Ingeniero, me quedó claro que si tengo una duda, usted es el indicado.

Ahora de mis amores del lab, mi querido Leito y mi archienemigo Brian, gracias por aguantarme y crear un espacio seguro para ser yo, porque desde el primer momento que les vi en el lab, supe que iba a tener risas, drama y acción. A Ecuador mil gracias por permitir que volviera la linda de la Carlita, el estupendo del Fer y el mejor trabajador de fármaco el Bryan, que agradecida me siento por conocerles, saber de su cultura y por las miles de onces ricas que nos dimos entremedio de esto de ser científicas y científicos.

Siempre estaré agradecida de todas las personas que conocí en el Departamento de Fisiopatología, desde los que pertenecen a otros laboratorios, de los que vienen de otros países, a los profesores y profesoras, a los administrativos y por supuesto a la Sra. Nancy y Don Marco con su cariño

al hacer las cosas y conversarme por las mañanas, porque no todo es ciencia, es importante también el conocer y cuidar el grupo humano.

Gracias al Profesor Jorge Toledo que me invitó a pertenecer a su grupo de investigadores, entre ellos a Felipe Sandoval que es un seco, siempre dispuesto a responder mis miles de preguntas desde la primera vez que llegué al lab, y a Carolina Muñoz que es una profesional impresionante en el conocimiento que tiene. No dudaría en volver a trabajar con ustedes.

Agradecida también con el programa de Magíster en Biotecnología Molecular por las herramientas que me entregaron y el financiamiento en distintas circunstancias. De igual manera le agradezco a la Asociación de Mujeres Universitarias (AMUC) por la beca de arancel, por interesarse y en ayudar a mujeres en la ciencia para equiparar la diferencia. Esto fue un recordatorio de que cuando se puede, se ayuda y se retribuye.

A mi pareja, gracias por apoyarme incondicionalmente en este viaje de hace dos años, se ha aprendido tanto a la distancia y eso es lo que importa, porque cada paso que damos es en pro de convertirnos en las mejores científicas y abrir el camino a les que vienen. Te amo Monserrat.

A mi familia, mi madre Sigrid, mi abuela Juana, mi tío Leo y mi hermano Matías, esta tesis es por ustedes, por todos los años de creer en mí y tener la paciencia de verme crecer en algo que pareciera ajeno a un trabajo común, pero aun así es importante para mí y este es sólo el comienzo.

ÍNDICE

índice	vi
Índice de tablas	viii
índice de Figuras	ix
1.- Resumen	xi
2. Abstract	xii
3. Introducción	1
3.1 Bienestar de las mascotas	1
3.2. Sistema inmune y microbiota	2
3.3. Enfermedades gastrointestinales y probióticos	4
3.4. Probióticos formulados: Métodos de microencapsulación	8
3.5. Normativa chilena para producción y comercialización	11
4. Problema de Investigación	12
5. Hipótesis	14
6. Objetivos	14
6.1 Objetivo General:	14
6.2 Objetivos Específicos:	14
7. Materiales y métodos	16
7.1. Estandarización de las condiciones de trabajo con las cepas <i>Lactobacillus</i> sp.	16
7.1.1. Caracterización de cepas aisladas de leche canina.	16
7.1.2. Cultivo y preparación de muestras	17
7.1.3. Determinación de la producción de biomasa	17
7.1.4. Medición de la densidad óptica	17
7.1.5. Determinación de concentración de glucosa consumida	18
7.1.6. Determinación de viabilidad celular	19
7.2. Métodos de microencapsulación de biomasa	20
7.2.1. Liofilización	20
7.2.2. Secado por atomización	21
7.2.3. Morfología de microencapsulados	21
7.3. Prueba de estabilidad de almacenamiento normal	21
7.4. Prueba de estabilidad de almacenamiento acelerado	22
7.5. Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	23

7.5.1. Ensayo <i>in vitro</i>	23
7.5.2. Ensayo <i>in vivo</i>	25
7.6. Análisis estadístico	29
8. Resultados	30
8.1 Condiciones de cultivo cepas probióticas	30
8.1.1. Producción de biomasa	30
8.1.2. Densidad óptica.....	31
8.1.3. Consumo de glucosa.....	32
8.1.4. Viabilidad celular	33
8.2 Microencapsulación de biomasa.....	34
8.2.1. Microencapsulados por liofilización.....	34
8.2.2. Microencapsulados en secado por atomización	36
8.3. Estabilidad en almacenamiento normal	37
8.4. Estudio de estabilidad acelerada	40
8.5. Pruebas <i>in vitro</i> : Ensayo de Viabilidad celular y Adhesión.	41
8.6. Pruebas <i>in vivo</i> : Ensayo en ratones y perros.	43
9. Discusión.....	54
10. Conclusión	60
11. Glosario	61
12. Referencias bibliográficas	62
13. Anexos.....	68
ANEXO 1: Caracterización de cepas probióticas en Facultad de Ciencias Veterinarias.....	68
ANEXO 2: Consentimiento Informado.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Curva de calibración de glucosa.	19
Tabla 2. Secuencias de partidores usados en RT-PCR para la especie <i>Mus musculus</i>	26
Tabla 3. Grupos de estudio para ensayo en perros.	28
Tabla 4. Secuencias de partidores usados en RT-PCR para la especie <i>Canis lupus familiaris</i>	29
Tabla 5. Viabilidad celular y rendimiento de cepas caninas y porcina liofilizadas.	35
Tabla 6. Viabilidad celular y rendimiento a distintos parámetros de secado por atomización de cepas caninas.	36
Tabla 7. Estabilidad de las preparaciones microencapsuladas con técnicas de liofilizado y secado por atomización al tercer mes de almacenamiento a diferentes temperaturas.	39
Tabla 8. Sistema de puntuación de consistencia de heces en encuestas diarias en ensayo en perros.	48
Tabla 9. Sistema de puntuación de frecuencia de heces en encuestas diarias en ensayo en perros.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fórmulas probióticas usadas en perros y la solución propuesta por el proyecto.....	13
Fig. 2. Producción de biomasa en g/L de cepas canina y porcina.	30
Fig. 3. Curvas de crecimiento de las cepas probióticas derivada de leche canina y porcina crecidas en medio de cultivo MRS.	31
Fig. 4. Curso temporal del consumo de glucosa en el tiempo en los cultivos de las cepas probióticas crecidas en medio líquido MRS.	32
Fig. 5. Evaluación de la viabilidad celular de las cepas probióticas cultivadas con refuerzo nutricional a las 12h.....	33
Fig. 6. Evaluación de las preparaciones microencapsuladas por liofilización mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	35
Fig. 7. Evaluación de las preparaciones microencapsuladas en secado por atomización mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	37
Fig. 8. Evaluación mensual de la estabilidad de cepas caninas y porcina liofilizadas y almacenadas a diferentes temperaturas.....	38
Fig. 9. Evaluación de la estabilidad acelerada durante el almacenamiento de cepas caninas, cepa porcina y probiótico formulado a 50°C.....	40
Fig. 10. Evaluación de la estabilidad acelerada durante el almacenamiento de cepas caninas, cepa porcina y probióticos formulados a 25°C.....	41
Fig. 11. Ensayo de viabilidad en células caninas MDCK tratadas con las preparaciones probióticas y analizadas mediante MTT.	42
Fig. 12. Ensayo de adhesión a células epiteliales intestinales HT-29.....	43
Fig. 13. Expresión relativa de citoquinas en intestino de ratones tratados con las cepas probióticas en estudio.	45
Fig. 14. Expresión relativa de citoquinas en bazo de ratones tratados con las cepas probióticas en estudio.	46
Fig. 15. Expresión relativa de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) en el intestino de ratones tratados con las cepas probióticas en estudio.. ..	47
Fig. 16. Consistencia de las heces.	50

Fig. 17. Frecuencia diaria de deposiciones.	51
Fig. 18. Expresión relativa de marcadores inflamatorios en células mononucleares de sangre periférica de perros tratados con la formulación probiótica prototipo.	53

1.- RESUMEN

En este estudio se caracterizaron cepas potencialmente probióticas aisladas de la leche materna para su uso en enteropatías caninas. Se utilizaron dos cepas de leche materna canina y una cepa de leche materna porcina previamente caracterizadas según sus propiedades funcionales, propiedades presuntivas de seguridad y efecto inhibitorio sobre patógenos. Estas bacterias se formularon mediante liofilización y secado por atomización, comparando rendimiento y almacenamiento en tiempo normal y acelerado. Se analizaron el efecto citotóxico, adhesión al intestino y el efecto inmunomodulador de las formulaciones con mejor caracterización probiótica *in vitro* e *in vivo*. Se determinó que, en base al rendimiento de encapsulación y la viabilidad de las formulaciones, el recubrimiento óptimo para las cepas TUCO-17 y TUCO-4 fue FOS e inulina; y para la cepa TUCO-16 fue maltodextrina e inulina. Todas las cepas resultaron no citotóxicas en cultivos de células de perro MDCK y TUCO-17 mostró mayor adhesión a las células epiteliales intestinales. Resultó relevante que la administración de la formulación probiótica disminuyó la expresión de marcadores proinflamatorios *in vivo*, tanto en el intestino como en el bazo de ratones. Además, su administración en perros con alteraciones entéricas indujo una reducción de la duración de la diarrea, mejoró la consistencia de las heces y los parámetros clínicos. Finalmente, la combinación de estas tres cepas en estudio (TUCO-16, TUCO-17 y TUCO-4) cubriría las propiedades probióticas en formulación e inmunomodulación de todos los marcadores en estudio.

2. ABSTRACT

In this study, potentially probiotic strains isolated from breast milk were characterized for use in canine enteropathies. Two strains from canine breast milk and one strain from swine breast milk previously characterized according to their functional properties, presumptive safety properties, and inhibitory effect on pathogens were used. These bacteria were formulated by freeze-drying and spray-drying, comparing performance and storage in normal and accelerated time. The non-cytotoxic characteristics, adhesion to the intestine, and the immunomodulatory effect of the formulations with better probiotic characterization *in vitro* and *in vivo* were analyzed. Based on the encapsulation performance and the viability of the formulations, it was determined that the optimal coating for the TUCO-17 and TUCO-4 strains was FOS and Inulin. For the TUCO-16 strain, it was Maltodextrin and Inulin. All strains were non-cytotoxic in dog MDCK cell cultures, and TUCO-17 showed increased adhesion to intestinal epithelial cells. It was relevant that the administration of the probiotic formulation decreased the expression of proinflammatory markers *in vivo*, both in the intestine and in the spleen of mice. In addition, its administration in dogs with enteric disorders reduced the duration of diarrhea and improved stool consistency and clinical parameters. Finally, combining these three strains under study (TUCO-16, TUCO-17, and TUCO-4) would cover the probiotic properties in the formulation and immunomodulation of all the markers under study.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Bienestar de las mascotas

En la actualidad, las mascotas reciben salud y bienestar como un integrante más de la familia, asegurando una nutrición equilibrada que permite cumplir con los requisitos metabólicos para prolongar su vida (Baffoni, 2018). Esta situación coincide con la tendencia mundial del aumento significativo en el mercado “Pet Care” donde la consultora Euromonitor International, estimó una tasa de crecimiento del 31%, para el año 2018 que se tradujo en venta global de US\$ 91.000 millones, mientras que en plena pandemia las ventas alcanzaron US\$ 150.000 millones en el 2021 (Euromonitor International, 2022). Los gastos acumulados de la industria de mascotas en EE.UU. se debe principalmente a alimentos y snacks para mascotas que constituyen el segmento de ventas más grande (42%), seguido de atención veterinaria y ventas de productos farmacéuticos (26%), luego suministros, animales vivos y medicamentos de venta libre (23%) y el resto en otros servicios como cuidado y paseo de mascotas (APPA, 2023). En Australia, tienen la mayor tasa de tenencia de mascotas del mundo (62%) con dos de cada cinco hogares con perros, experimentando el nuevo proceso de “premiumización” referido a la compra de más productos y servicios de alta calidad para mascotas como salones de belleza, juegos de iPad, carne gourmet, complementos de moda, juguetes eléctricos, alfombras térmicas y el último mercado emergente de dispositivos habilitados para Internet para monitorear y cuidar a las mascotas con valores superiores a US\$ 3.000 millones anuales (Australia, 2016; Strengers et al., 2016). A nivel latinoamericano, Chile

encabeza el ranking de gastos en comida, atención médica, juguetes, entre otros productos para mascotas, alcanzando los US\$ 808,6 millones anuales, monto registrado el año 2017. Los gastos de alimentación corresponden en promedio aproximadamente a US\$ 50 mensuales, es decir, \$40.000 pesos chilenos por mascota. La lista continúa con Argentina en gastos mensuales por mascotas de US\$ 28,3; Brasil con US\$ 26,6 y México con US\$ 16,1 (Euromonitor International, 2019). Además, en el contexto chileno, la encuesta Cadem llamada “El Chile que viene - Marzo 2022: Zoom a la tenencia de mascotas”, el 86% de los encuestados declara tener una mascota, lo que se traduce en que 8 de cada 10 chilenos tiene al menos uno, en su mayoría perros. Considerados en un miembro más de la familia y el 79% está dispuesto a pagar más por una buena alimentación de su mascota (Cadem, 2022).

3.2. Sistema inmune y microbiota

Los componentes nutricionales del alimento para mascotas cobran importancia al ser una vía para mejorar la salud al modular el sistema inmune y la microbiota de perros (Wernimont et al., 2020). La primera reacción ante un patógeno está dada por la respuesta inmune innata con reconocimiento inespecífico, y posteriormente se activa la respuesta inmune adaptativa, de forma más específica y con “capacidad de memoria” para reconocer de nuevo antígenos del mismo patógeno (Nicholson, 2016). La regulación que llevan a cabo estas células y moléculas se da en conjunto con la participación de las bacterias presentes en la piel, el tracto respiratorio, el tracto genital y el intestino. Se comunican directa y eficazmente al modular citoquinas y quimioquinas a través de la interacción con los Receptores de

Reconocimiento de Patrones (PRR), como NLR (receptores tipo NOD) y TLR (receptores tipo Toll), regulando de igual manera la producción local de anticuerpos (Liu et al., 2022). En perros, hay evidencia del aumento de 20% de la producción de marcadores moleculares por las células inmunes de la mucosa intestinal como las citoquinas pro-inflamatorias con el interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y también la disminución de 30% en citoquinas anti-inflamatorias como la interleuquina-10 (IL-10) en enfermedades inflamatorias intestinales (Dandrieux, 2016; Peiravan et al., 2018; Tizard and Jones, 2018; Soontararak et al., 2019). Es por esto que las alteraciones o desequilibrios en la microbiota tiene efectos significativos sobre el sistema inmunológico, fundamentalmente en enfermedades gastrointestinales, siendo relevante la comprensión de esta relación en el microambiente intestinal (Schmitz and Suchodolski, 2016; Eissa et al., 2019).

Las funciones previamente descritas pueden verse afectadas negativamente si ocurre una desregulación de la microbiota, conocida como disbiosis. Esta se produce de tres formas, como la (i) pérdida de microorganismos beneficiosos, (ii) la expansión de patobiontes o microorganismos potencialmente dañinos y (iii) la pérdida de la diversidad microbiana general. Existen factores externos que pueden favorecer el desarrollo de la disbiosis como intervenciones médicas, infecciones, genética individual, cambios hormonales, factores ambientales, estrés psicológico y físico. Esto ocasiona cuadros de diarrea en perros por infecciones con helmintos, protozoos, la enteritis viral o bacteriana primaria (Shmalberg et al., 2019). Dentro de los

organismos infecciosos se encuentra *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp., entre otros, como también parásitos gastrointestinales como *Giardia duodenalis* (Grzeńkowiak et al., 2015; Langlois et al., 2020; Ciuca et al., 2021).

3.3. Enfermedades gastrointestinales y probióticos

La diarrea es el signo clínico más común de visitas veterinarias no rutinarias en perros con enfermedades gastrointestinales. Constituye un aumento de agua y fluidez fecal a corto plazo, acompañado de vómito, pérdida de peso y de ánimo de la mascota. Específicamente, las diarreas agudas están asociadas mayoritariamente a infecciones con patógenos y alteraciones en la composición de la microbiota intestinal e influenciado por la dieta, el medio ambiente y la medicación (Soonthornsit et al., 2021). Sin embargo, en la atención primaria no se realizan análisis detallados de los patógenos que infectan a las mascotas, lo que en múltiples ocasiones conduce a que se administren antibióticos de amplio espectro de forma indiscriminada, generando como consecuencia la disbiosis o la resistencia bacteriana en el intestino, y con alta probabilidad de reincidencia de la enfermedad (Grzeńkowiak et al., 2015; Dandrieux, 2016). Se han reportado estudios donde el número de los aislamientos multirresistentes está aumentando y puede transmitirse entre bacterias de animales a la microbiota de los humanos, lo que acarrea un gran problema para la salud pública (Sfaciotte et al., 2015). Parte del tratamiento puede incluir el uso de probióticos, con el objetivo de ejercer un efecto beneficioso para la microbiota gastrointestinal, permitiendo mejorar las condiciones de la salud del animal después del consumo de

antibióticos, ya que producto del tratamiento influye en el microambiente intestinal, sino que también ejerce un efecto directo en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Anadón et al., 2019). Además, previene el uso indiscriminado de antibióticos porque su aplicación sustitutiva, permite reducir o controlar los signos gastrointestinales asociados a los antibióticos (AAGS). Específicamente, la administración de simbióticos (prebióticos + probióticos) en comparación con los tratamientos con antibióticos enrofloxacina/metronidazol disminuyen los trastornos de la ingesta de alimentos (Whittemore et al., 2019). Se observó la mejoría clínica de la diarrea en perros inducida por el tratamiento con probióticos que generaron una mejora significativa de la diversidad microbiana, un cambio marcado de la estructura y funciones de la microbiota intestinal. Esto, después de 60 días de administración con la regulación al alza de las vías involucradas en el metabolismo de los aminoácidos y la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Xu et al., 2019b). Cuando se comparó el tratamiento básico con y sin probióticos en perros con enfermedad inflamatoria intestinal canina (EII), se sugirió que los probióticos pueden tener un efecto beneficioso sobre la homeostasis de la mucosa intestinal canina (White et al., 2017). Entonces el tratamiento con probióticos y prebióticos representa una alternativa válida a la terapia antimicrobiana de uso común, ya que se ha demostrado una recuperación clínica más rápida en comparación a una formulación antibiótica debido al sinergismo en la recuperación de la barrera intestinal alterada (Pignataro et al., 2021).

Generalmente los probióticos administrados a perros son bacterias productoras de ácido láctico (BAL) y bifidobacterias de la microbiota del colon humano, cuyos efectos beneficiosos están comprobados y esta validado su consumo tanto para humano como animal (Grześkowiak et al., 2015). Los estudios sobre el uso de probióticos de origen canino son muy limitados y como resultado, los probióticos ampliamente utilizados en los perros son de origen no canino (Kumar et al., 2017). La suplementación con probióticos orales de cepas comerciales de humanos en perros jóvenes y adultos mayores, cambió la microbiota intestinal de los perros mayores a una composición parecida a la de los jóvenes (Xu et al., 2019a). Los beneficios mencionados anteriormente dependen de concentraciones mínimas al momento de ser ingeridos desde 10^6 y 10^7 UFC/g teniendo en cuenta que los recuentos bacterianos en perros desde el estómago al colon varían entre 10^4 y 10^{11} UFC/g de contenido (Baffoni, 2018). Entonces, las condiciones que debe cumplir el desarrollo de nuevos probióticos es la especificidad con el huésped para que se cumpla el efecto beneficioso aumentando la capacidad de supervivencia y colonización de tales cepas. En el caso de ser un aislamiento de otra especie, debe demostrar el efecto beneficioso. También debe cumplir con prevenir la disbiosis provocada por el consumo indiscriminado de antibióticos y, por último, proporcionar efectos inmunomoduladores en sitios distantes del tracto gastrointestinal.

Dentro de este marco, el impacto en la dieta de *Bifidobacterium* spp. (Bifidobacteriaceae), *Lactobacillus* spp. (Lactobacillaceae) y *Faecalibacterium* spp. (Ruminococcaceae) se investiga a menudo, ya que se considera

beneficioso en omnívoros como el perro. Su beneficio se atribuye a su efecto en la producción de subproductos de fermentación de carbohidratos, que posteriormente se convierten en butirato a través de la vía butiril-CoA: acetato-CoA-transferasa, la fuente de energía preferida para los colonocitos (Pilla and Suchodolski, 2020). Se demostró, igualmente, el potencial metabólico de las especies *Lactobacillus* de origen intestinal canino aisladas de muestras fecales frescas, donde *L. reuteri* AI resultó ser un posible candidato probiótico para usar como suplemento para perros (Coman et al., 2019).

Es cierto también, que la microbiota intestinal en perros cambia según la etapa de la vida. En la gestación, la lactancia y el crecimiento, la vía entero-mamaria proporciona células del tejido linfoide intestinal que viajan a las glándulas mamarias por el sistema linfático y la sangre periférica, transfiriendo la microbiota materna al recién nacido a través de la leche. Se demostró el aumento de cepas probióticas *Lactobacillus* sp. en la suplementación de probióticos pre y postnatal en perras y respectivos cachorros de pastores alemanes, proporcionando una mayor comprensión de la vía entero-mamaria y su influencia en la microbiota fecal canina (Vilson et al., 2018). Así el sitio de aislamiento a partir de leche canina presenta condiciones para obtener bacterias potencialmente probióticas. De la misma manera, el potencial de cepas de *Lactobacillus* aislados de la leche canina, particularmente de *L. reuteri* y *L. fermentum*, mostraron una alta actividad antimicrobiana, altas tasas de supervivencia después de la exposición a diferentes condiciones físicas adversas y actividades enzimáticas deseables como la α -glucosidasa, una enzima importante en la absorción de glucosa.

Además, estas cepas no degradaron la mucina y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de varios antibióticos estaban dentro de los valores recomendados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) – (Martín et al., 2010).

3.4. Probióticos formulados: Métodos de microencapsulación

Los probióticos comerciales se suelen presentar en dos formatos: solución acuosa y pulverizado donde la viabilidad se ve afectada por la presencia de compuestos antimicrobianos, la toxicidad del oxígeno, la post-acidificación y la temperatura de almacenamiento (Reyes et al., 2018; Frakolaki et al., 2021). Específicamente, la solución acuosa presenta los microorganismos vivos en alimentos fermentados donde es difícil mantener su viabilidad durante el almacenamiento ya que la bioactividad de las bacterias continúa y existen pérdidas de la cadena de frío por el transporte a distintos lugares. En cambio, los pulverizados obtienen la forma de polvo con microcápsulas del probiótico vivo al disminuir el contenido de agua con el fin de mantener una viabilidad prolongada durante el almacenamiento dependiendo de las temperaturas utilizadas. Por tanto, la solución prometedoras y en la que se profundizará en el siguiente trabajo son los métodos de microencapsulación de cepas probióticas vivas, manteniendo las concentraciones mínimas y controlando la liberación de éstas, aun cuando en el procesamiento, el almacenamiento y la digestión gastrointestinal existe una pérdida de la viabilidad de las bacterias probióticas (Liu et al., 2019).

La microencapsulación según el método de secado puede ser de dos tipos, microencapsulación a baja temperatura y a alta temperatura. Como método de baja temperatura está la liofilización, siendo esta la técnica más usada con micropartículas entre 1-100 μ m. Es un método conveniente para la preservación de bacterias que minimiza las pérdidas de viabilidad y funcionalidad, permite el almacenamiento a largo plazo e incluye tres pasos, (i) la congelación de la suspensión celular concentrada y protegida por la adición de una solución protectora a la suspensión bacteriana que evita la deshidratación de las células probióticas durante el proceso, (ii) el secado primario por sublimación para eliminar el hielo, y (iii) el secado secundario por desorción para eliminar el agua no congelada, para después pulverizar de forma manual (Fonseca et al., 2015).

Entre las técnicas basadas en alta temperatura está el secado por atomización como la técnica más efectiva en microencapsulación de probióticos de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias con micropartículas de menor tamaño entre 2-25 μ m. Esta técnica consiste en atomizar una emulsión o suspensión de microorganismos a encapsular y un material polimérico dentro de una cámara con un gas caliente, generalmente aire, el cual promueve la evaporación del agua, logrando que los microorganismos queden atrapados dentro del material encapsulante dando lugar a la formación de micropartículas(De Araújo et al., 2015).

El uso de agentes crioprotectores aumenta la supervivencia de los microorganismos después del secado y durante el almacenamiento debido a

que minimizan el estrés mecánico, oxidativo y osmótico al que pueden ser sometidos (Broeckx et al., 2016). Entre los más utilizados se encuentran la maltodextrina, la sacarosa y sus combinaciones (Lieu et al., 2017). El efecto protector final depende de la capacidad de absorción de los azúcares por parte de la cepa probiótica para mejorar la resistencia celular a los procesos de secado (Alonso, 2016; Broeckx et al., 2016). Los prebióticos como la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) aumentan la estabilidad y la integridad de la membrana a través de interacciones directas con esta, lo que conduce a una mayor fluidez de la membrana y una disminución de la porosidad de las microcápsulas después de procesos como la liofilización. Se ha demostrado que los prebióticos no se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal (estómago), por lo que llegan de forma segura al intestino, donde son fermentados por la microbiota intestinal beneficiosa, potenciando selectivamente su crecimiento y bioactividad (Cassani et al., 2020).

En el caso de la liofilización se debe considerar las características de cada cepa, su tolerancia a niveles de estrés, la formación de cristales en el proceso y aumento en la osmolaridad. De hecho, se observó una buena resistencia al proceso de liofilización en tres cepas de *Lactobacillus*, manteniendo el recuento de células bacterianas, alrededor de 9,03 Log UFC/g usando FOS después de los 90 días de almacenamiento (da Silva Guedes et al., 2019). Para el secado por atomización es importante establecer la presión de atomización, el flujo de alimentación y las condiciones de almacenamiento que incluye la actividad del agua y la temperatura. Se obtuvieron mejores efectos protectores cuando se usó maltodextrina en combinación con otros agentes

encapsulantes en el secado por atomización de la cepa *Lactobacillus casei* VTCC AS 186, con una viabilidad de 10,53 Log UFC/g después del proceso (Lieu et al., 2017).

3.5. Normativa chilena para producción y comercialización

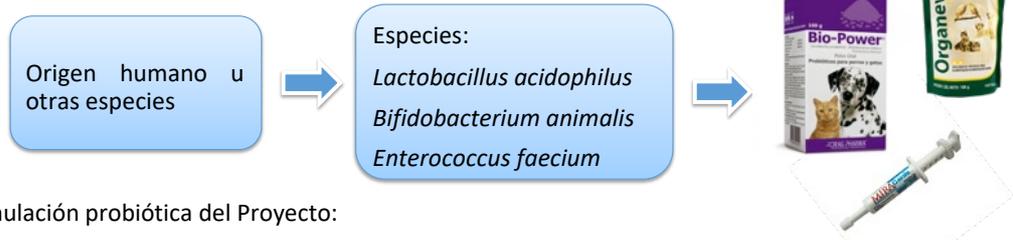
En la normativa chilena la formulación probiótica que se propone es considerada como suplemento y aditivos autorizados para la elaboración de alimentos para animales según lo indica el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Parte del Reglamento de Alimentos para Animales describe como un microorganismo a *Lactobacillus sp.*, y como misceláneos a la inulina y al FOS que serán utilizados en la microencapsulación del probiótico (RESOLUCION 1992; RESOLUCION 5324). De esta manera, la formulación cumpliría en un principio con los requerimientos de la Monografía de Proceso de Producción para la aprobación del producto (Guía para elaborar y presentar monografías de proceso, 2010; RESOLUCION 5025; RESOLUCION 7113). Considerando los antecedentes anteriormente descritos, se propone como desafío tecnológico lo siguiente: desarrollar nuevas formulaciones probióticas, basada en multicepas aisladas de leche canina y leche porcina, probadas por separado y en combinación, y que encapsuladas por un método de secado por temperatura, mantiene la viabilidad de los microorganismos durante el proceso productivo, el almacenamiento y al momento de la ingesta en perros con diarrea aguda.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El tratamiento más común en el caso de una enfermedad gastrointestinal en perros está basado en la aplicación de antibióticos y en paralelo con la administración de probióticos para evitar la disbiosis que genera el consumo del primero. Parte de las especies presentes en los productos comerciales como BIOPOWER, Miracanis y Organew son *Lactobacillus acidophilus* provenientes del intestino y canal vaginal de mamíferos. Estos son utilizados porque metabolizan la lactosa y la transforman en ácido láctico. También está la cepa *Bifidobacterium animalis* que se puede encontrar en intestino grueso de mamíferos y que potencia la inmunidad innata y adquirida. Por último, está la cepa *Enterococcus faecium*, un microorganismo aislado del intestino humano y utilizado en cerdos jóvenes para prevenir problemas diarreicos después del destete. Todas estas cepas de origen humano u otras especies, que se les administran a perros con enfermedades gastrointestinales. Además, el formato de consumo de BIOPOWER y Organew es pulverizado y en cambio, Miracanis viene en formato de pasta, que debido a la humedad presente pierde viabilidad celular, también es la primera opción recetada al momento de la administración por el menor costo en comparación a los otros dos. Debido a esto, es que se buscó utilizar especies BAL desde muestras de leche canina, en primera instancia, y también especies BAL de leche porcina para obtener una formulación pulverizada a partir de dos métodos de encapsulación y comprobar el efecto multicepa (Fig. 1). Con este producto biotecnológico, el mercado del cuidado de las mascotas tendrá un producto de calidad, específico y formulado con materiales encapsulantes de

prebióticos. Además, cumplirá con el objetivo de modular el sistema inmune, lo que contribuiría a enfrentar de manera más efectiva las enfermedades gastrointestinales en perros.

Formulación probiótica actualmente en uso:



Formulación probiótica del Proyecto:



Fig. 1. Fórmulas probióticas usadas en perros y la solución propuesta por el proyecto.

5. HIPÓTESIS

Una formulación probiótica microencapsulada de tres cepas de *Lactobacillus* sp., aisladas de leche canina y de leche porcina, administrada por vía oral, modula positivamente sobre marcadores de respuesta inmune en modelos murinos y caninos *in vitro* e *in vivo*.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Desarrollar un prototipo probiótico basado en tres cepas de *Lactobacillus* sp. aisladas de leche canina y leche porcina que mantenga la viabilidad, estabilidad y modulación sobre marcadores de respuesta inmune en modelos celulares caninos y en ensayos *in vivo* en ratones y perros.

6.2 Objetivos Específicos:

I.- Definir las condiciones de cultivo discontinuo de tres cepas probióticas *Lactobacillus* sp., mediante el análisis por métodos directos e indirectos de crecimiento microbiano.

II.- Estandarizar procedimientos de microencapsulación basados en liofilización y secado por atomización en base a lograr una estabilidad de la formulación de al menos seis meses.

III.- Estudiar las propiedades probióticas de las cepas *Lactobacillus* sp. formuladas en ensayos de adhesión e inmuno-estimulación sobre marcadores de respuesta inmune *in vitro*.

IV.- Evaluar el efecto modulador sobre marcadores de respuesta del sistema inmune en modelos murinos y caninos, tratados con la formulación probiótica prototipo analizando la expresión de los marcadores moleculares como los

receptores de reconocimiento de patrones y las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Estandarización de las condiciones de trabajo con las cepas *Lactobacillus sp.*

7.1.1. Caracterización de cepas aisladas de leche canina.

Como inicio del presente proyecto, se trabajó con dos cepas probióticas caninas, una cepa de calostro de leche canina (TUCO-16) y una cepa de leche canina (TUCO-17), previamente aisladas y parcialmente caracterizadas por la Dra. Sandra Quilodrán V. en el Cepario del Departamento de Patología y Medicina Preventiva, de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad de Concepción, sede Chillán). Estas cepas fueron aisladas directamente desde leche canina en medio De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Alemania), un medio selectivo para la detección de cepas *Lactobacillus sp.* de cualquier muestra, a 37°C por 48 h en condiciones de microaerobiosis y sembradas en agar MRS. De la misma manera, se analizó las propiedades de una cepa de leche porcina (TUCO-4) por presentar características preliminares inmunomoduladoras. Los criterios de selección de las cepas consideraron su coloración y forma, colonias blancas con bordes lisos, respuesta a la tinción de Gram como Gram positivas y resultado de la prueba de catalasa negativa. La Dra. Quilodrán facilitó las cepas para el estudio como parte de un proyecto de colaboración conjunto, y forma parte del grupo asesor de la presente tesis (ANEXO 1: Caracterización de cepas probióticas en Facultad de Ciencias Veterinarias).

7.1.2. Cultivo y preparación de muestras

Las cepas aisladas y caracterizadas se cultivaron en 300mL de medio MRS, con 30mL del pre-inóculo generado anteriormente, por 24 h en un agitador orbital (Lab companion SI-300, EE. UU.), y se tomaron muestras cada 4 h para los análisis directo e indirecto del crecimiento celular en el tiempo.

7.1.3. Determinación de la producción de biomasa

La cantidad de biomasa obtenida en el cultivo se determinó a partir del peso seco. Se tomaron muestras de 5 mL de cultivo y se centrifugaron por 5 min. El sobrenadante se almacenó para determinar la concentración de glucosa consumida. El precipitado se resuspendió en agua estéril para ser depositado en platillos de aluminio en una balanza infrarroja de secado (Radwag, Radom, Polonia) a 90°C hasta peso constante. Esto se repitió para cada tiempo de incubación y se transformó a la cantidad de biomasa en g/L de cultivo. Este es un método directo para cuantificar el crecimiento celular según el tiempo de cultivo. Debido a que nuestro cultivo es de un sólo microorganismo presente en el medio, tiene la ventaja de representar la biomasa de forma válida.

7.1.4. Medición de la densidad óptica

La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó en el espectrofotómetro UV-Vis Model UV-2505 (LaboMed, Inc., Los Ángeles, EE.UU.) a 600nm utilizando cubetas de vidrio de 1 mm de espesor. Las muestras se midieron de manera directa o en diluciones de 1:10 y 1:50 con agua destilada para cada tiempo de incubación según corresponda. Como blanco se utilizó el medio de cultivo sin inocular y en la dilución correspondiente de acuerdo con la muestra. Es un

método indirecto para cuantificar el número de células bacterianas presentes, ya que la cantidad de luz dispersada es proporcional a las suspensiones bacterianas siendo la principal ventaja la inmediatez del resultado en que va el crecimiento de la cepa.

7.1.5. Determinación de concentración de glucosa consumida

Para la cuantificación de glucosa se utilizó un método basado en la presencia del reactivo de Antrona con ácido sulfúrico. En este método, la glucosa no consumida por el cultivo experimenta deshidratación convirtiéndose en furufural o hidroximetilfurfural. Estos productos pueden condensarse con aminas aromáticas como la Antrona, produciendo compuestos coloreados. La intensidad de color desarrollado durante la condensación va a estar en función de la concentración de glucosa presente en la muestra de cultivo medido en espectrofotómetros (Dreywood, 1946). Se preparó la curva de calibración con un patrón de concentración conocida de glucosa y 6 puntos (Tabla 1). Para las muestras se realizó diluciones de 1:1000 para $t = 0$; 1: 500 para los $t = 4$, 8 y 12 h; 1:100 para $t = 16$, 20 y 24 h. Se adicionaron 2 mL de las diluciones a cada tubo de ensayo más 4 mL de Antrona al 0,2%. Se midió la absorbancia de las muestras a 625nm. Este es un método que nos permite corroborar que la fase estacionaria se produce por el agotamiento de los nutrientes del medio y no por motivos externos.

Tabla 1. Curva de calibración de glucosa.

Tubo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de solución patrón (mL)	Volumen de agua (mL)
1	0	0	2
2	10	0,2	1,8
3	20	0,4	1,6
4	30	0,6	1,4
5	40	0,8	1,2
6	50	1,0	1,0

7.1.6. Determinación de viabilidad celular

Se realizaron de forma exploratoria diluciones seriadas de 1:10 de cada muestra con agua peptonada, resuspendiendo constantemente, y se sembraron todas las diluciones hasta la estandarización del cultivo. Una vez estandarizado, se sembraron tres diluciones seguidas en placas con agar MRS por duplicado de cada muestra. Se pusieron controles negativos de placas abiertas con agar MRS para la cabina de flujo laminar y la zona del mechero Bunsen. Se sembraron las muestras hasta las 12 h de cultivo, posterior a la estandarización de cada muestra. En este punto se agregó un refuerzo de glucosa para una concentración final de 20g/L y se prolongó la incubación por 12 h más con las mismas condiciones y tomas de muestras cada 4 h. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h y posteriormente se realizó el recuento en placa hasta una dilución de 30 a 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para dejar expresado el valor como el Log UFC/mL. Este es un método directo para la cuantificación del número de bacterias vivas, debido a que los métodos anteriores no distinguen entre bacterias vivas y muertas. Cada célula viable se dividirá dando colonias visibles teniendo en cuenta las diluciones sembradas.

7.2. Métodos de microencapsulación de biomasa

Las cepas se cultivaron de forma independiente en un fermentador Winpact FS-06 (One Fermentation System, Saratoga, EE.UU.) con un volumen final de 10 L de medio, en condiciones controladas por 12 h a 37°C, pH 5.0, agitación de 100rpm y aire de 2LPM. Transcurrido el tiempo de cultivo se tomó una muestra para realizar el recuento celular y el resto del medio de cultivo con las células bacterianas se recolectó para realizar el proceso de microencapsulación por los métodos de liofilización y secado por atomización. Para ambos procesos se utilizó las siguientes composiciones de prototipo y agentes encapsulantes: maltodextrina – FOS (12,5% - 12,5%); maltodextrina – inulina (12,5% - 12,5%) y FOS – inulina (8% - 8%).

7.2.1. Liofilización

El medio de cultivo se centrifugó a 2370 x g a 4°C y la mezcla de liofilización se preparó usando los distintos agentes encapsulantes en agua estéril, con % p/v que varían según la biomasa generada. La biomasa obtenida se resuspendió en la mezcla de liofilización. Posteriormente, la mezcla se traspasó a recipientes de fondo plano de manera en que quede una capa fina de mezcla en cada uno. Los recipientes fueron congelados a -80°C por 18-20 h. Transcurrido el tiempo de congelación, las muestras fueron liofilizadas en el equipo Freeze Dryer Model BK-FD12PT (Biobase bioindustry, Shandong, China), posteriormente se analizó la viabilidad celular de la misma manera que en cultivo para el producto obtenido, calculando el rendimiento del método de liofilización por cada formulación (Fonseca et al., 2015).

7.2.2. Secado por atomización

El medio de cultivo se centrifugó a 2370 x g a 4°C. La biomasa obtenida se resuspendió en la mezcla de secado por atomización y se aplicó en el equipo Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza) con distintos parámetros de temperatura de entrada de 120-140°C; temperatura de salida 68- 75°C; aspiración al 50-70%; flujo de la bomba al 5-10% y flujo de muestra 40-50 mm³ (De Araújo et al., 2015).

7.2.3. Morfología de microencapsulados

Se analizó la morfología de los microencapsulados con mayor rendimiento por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, JEOL JSM 6010 PLUS/LA, EE.UU.) a diferentes aumentos.

7.3. Prueba de estabilidad de almacenamiento normal

Los probióticos microencapsulados por cada método se dispusieron en envases sellados al vacío con 2 g de microencapsulado y se almacenaron a 25°, 30° y 37°C para evaluar mensualmente la estabilidad de cada formato, durante seis meses. Los grupos con cepas liofilizadas fueron: TUCO-16/TUCO-17 en una mezcla con 1 g de cada una; luego TUCO-4 sola; Lote 1 con cepas caninas más inulina y FOS en cantidad suficiente para (c.s.p.) dejar el formulado en 7,5x10⁸ UFC/g como dosis final y Lote 2 con las 3 cepas más inulina y FOS en c.s.p. dejar el formulado en 7,5x10⁸ UFC/g como dosis final. Para TUCO-16 y TUCO-17 secadas por atomización, se almacenaron las preparaciones con mayores rendimientos de cada cepa.

La viabilidad celular de cada preparación microencapsulada se midió realizando diluciones seriadas en tubos de ensayo, mezclando una relación

1:10 de cultivo encapsulado en agua peptonada homogeneizado mediante agitador Vórtex VM-10 (witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Alemania). Las diluciones seriadas se prepararon agitando constantemente para evitar la sedimentación. Se sembró una placa en cuadrantes de todas las diluciones y se sembró las dos menores diluciones con colonias presentes en placas de agar MRS por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C por 48h y los resultados se expresaron como UFC/g según la Norma internacional UNE-EN ISO 7218 siguiente (ISO 7218, 2007).

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + (0.1 * n_2))d}$$

En que:

N = número total de UFC por gramo o mililitro de muestra;

ΣC = suma de colonias contadas en todas las placas seleccionadas de dos diluciones sucesivas;

V = volumen del inóculo agregado a cada placa en mL;

n_1 = número de placas seleccionadas en la primera dilución;

n_2 = número de placas seleccionadas en la segunda dilución;

d = factor de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada.

7.4. Prueba de estabilidad de almacenamiento acelerado

Cada formulación encapsulada se incubó en un baño termostático, a diferentes temperaturas y tiempos: a 50°C durante 24 h tomándose muestras cada 6 h; a 60°C durante 4 h tomándose muestras cada 1 h; a 70°C durante 20 min tomándose muestras cada 5 min. A partir de los recuentos de células viables obtenidos antes y después del almacenamiento a temperaturas de

50°, 60° y 70°C, se calcularon los valores de la tasa específica de degradación de una reacción de primer orden (k) según la fórmula siguiente.

$$k = \frac{\log\left(\frac{N_0}{N}\right)}{t}$$

Donde:

k = tasa específica de degradación (h⁻¹)

N₀ = es el número inicial de células (UFC/g);

N = es el número residual de células después de un período de tratamiento

t = es el tiempo de almacenamiento

El valor de k a 25°C del almacenamiento se calculó utilizando la misma ecuación con la estabilidad en almacenamiento normal para obtener las ecuaciones de tasa de degradación.

7.5. Ensayos *in vitro* e *in vivo*

7.5.1. Ensayo *in vitro*

Los efectos citotóxicos posibles de las bacterias probióticas fueron evaluados mediante tratamientos *in vitro* en células epiteliales renales de perro (línea MDCK). Para evaluar la viabilidad celular o la citotoxicidad se utilizó el ensayo de reducción de bromuro de 3(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazole (MTT) ROCHE Cell Proliferation Kit I (MTT), siguiendo lo propuesto por el fabricante (Widyarman et al., 2018). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos. Antes del ensayo de MTT, el cultivo se lavó con tampón fosfato salino (PBS) para eliminar las células no adherentes y se realizaron estimulaciones con las diferentes cepas liofilizadas (TUCO-16, TUCO-17 y TUCO-4) a diferentes formulaciones probióticas (M-FOS: maltodextrina- FOS,

M-I: maltodextrina-inulina, FOS-I: FOS-inulina) y a diferentes concentraciones (1×10^6 UFC/mL, 1×10^7 UFC/mL, 1×10^8 UFC/mL) durante 24 h. Se utilizó una concentración final de MTT de 0,5 mg/mL por pocillo como sustrato para la reacción colorimétrica y se incubó durante 3 h. Después de solubilizar los cristales con isopropanol, se midió la absorbancia a 560 nm y 620 nm. Las absorbancias se corrigieron restando la absorbancia medida a 620 nm y restando además para cada medición la absorbancia de fondo del medio de cultivo y la solución de MTT. La viabilidad celular se calculó según la fórmula siguiente.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia corregida tratamiento}}{\text{Absorbancia corregida control sin tratamiento}} \times 100$$

Por tanto, considerando que el control sin tratamiento parte con una viabilidad del 100%, los diferentes tratamientos presentarían un aumento de viabilidad (superior al 100%) o citotoxicidad (inferior al 100%).

Se determinó el porcentaje de bacterias adheridas a células epiteliales intestinales humanas (línea celular HT-29). Para ello, las células fueron estimuladas por 1 hora con distintas formulaciones de cada cepa liofilizada (M-FOS: maltodextrina- FOS, M-I: maltodextrina-inulina, FOS-I: FOS-inulina) siendo estas las bacterias agregadas, incluyendo controles sin formular y el control positivo del probiótico comercial BIOPOWER (CPB). Después de cada estimulación los cultivos celulares se lavaron con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y se tripsinizaron las células para obtener las bacterias adheridas. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de cada suspensión celular y se sembraron en placas de agar MRS por 48 horas para

el recuento de colonias. Todas las estimulaciones y siembras se realizaron por duplicado.

Se calculó el % de adhesión según la fórmula siguiente.

$$\% \text{ Adhesión} = \frac{\frac{\text{UFC}}{\text{ml}}_{\text{adheridas}}}{\frac{\text{UFC}}{\text{ml}}_{\text{agregadas}}} \times 100$$

Según estos ensayos *in vitro*, se eligió la formulación de cada cepa por separado para luego formular el prototipo final del probiótico.

7.5.2. Ensayo *in vivo*

En el ensayo con ratones como modelo animal comparativo, se utilizaron ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c, de 8 semanas de vida, provenientes del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los animales se distribuyeron en grupos de 10 individuos cada uno, seleccionando al azar los integrantes de cada grupo. A cada grupo se les administró una dosis de $2,5 \times 10^9$ UFC/g de cada formulación probiótica al día en el agua de bebida, conformados de la siguiente manera: Grupo control negativo con agua sin probióticos; Grupo con TUCO-16 liofilizada con maltodextrina-inulina; Grupo con TUCO-17 liofilizada con FOS-inulina; Grupo con TUCO-4 liofilizada con FOS-inulina, Grupo con la formulación completa que contiene las tres cepas (Mezcla) y Grupo sólo con los prebióticos de recubrimiento de maltodextrina, inulina y FOS (Recub). Esta cantidad fue disuelta en el agua de bebida de los ratones y fueron alimentados con su dieta habitual. El probiótico fue suministrado de forma continua por 14 días. Se sacrificaron 5 ratones por grupo al culminar el tratamiento con los probióticos (día 14 con tratamiento) y 5 ratones una semana después (día 21 post-tratamiento). De estos ratones se

tomaron muestras de intestino y bazo para posteriormente hacer análisis de RT-PCR, por lo que, una vez extraídos de los animales, se almacenaron en 1 ml de Trizol a -80°C hasta su uso, tomando como referencia estudios previamente realizados (Raheem et al., 2022).

La purificación del ARN se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron las muestras de ARN con el lector de microplacas Synergy HTX microplate reader (BioTek Instruments, EE. UU.), se verificó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa y se almacenaron las muestras a -80°C.

La expresión relativa de las citoquinas TNF- α , IL-10 e IFN- γ provenientes de las muestras de bazo e intestino se evaluó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR), así como la expresión de los Receptores TLR2, NOD1 y NOD2 provenientes de las muestras de intestino. En ambos casos, se analizaron las muestras de los días 14 (tratamiento) y 21 (post-tratamiento). La expresión de β -actina se utilizó como gen normalizador (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de partidores usados en RT-PCR para la especie *Mus musculus*.

Gen		Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	N° GenBank
TNF-α	Forward	CTGTAGCCACGTCGTAGC	98	NM_013693.3
	Reverse	TTTGAGATCCATGCCGTTG		
IFN-γ	Forward	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	92	NM_008337.4
	Reverse	TGGCTCTGCAGGATTTTCAT		
IL-10	Forward	ATTTGAATTCCTGGGTGAGAAG	75	NM_010548.2
	Reverse	CACAGGGGAGAAATCGATGACA		
TLR2	Forward	GGTGCGGACTGTTTCCTTCT	172	NM_011905.3
	Reverse	GAGCCAAAGAGCTCGTAGCA		
NOD1	Forward	TAAGGGTGAAGCCAAAGGGTC	99	NM_00117100 7.1
	Reverse	TTGACCACATGTGTCTCGCT		
NOD2	Forward	CATTCTGGAGGTTTGGCTTCCG	139	NM_145857.2
	Reverse	TACTCAGCCTCCAGAGTCCA		
β-actina	Forward	GATGTCACGCACGATTTCC	136	NM_007393.5
	Reverse	GGGCTATGCTCTCCCTCAC		

Para la síntesis de ADN complementario y el RT-PCR se utilizó el *kit* comercial Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, 1-Step (Agilent, EE. UU.) en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, EE. UU.). Los resultados fueron analizados usando el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

En perros (*Canis lupus familiaris*) se realizó el ensayo donde se incluyeron 5 pacientes por cada grupo de tratamiento, en un rango de edad de los animales entre 2 a 8 años, con buen ánimo, sin fiebre, sin vómitos o muy espaciados, y con diarrea. Se presentó un documento Consentimiento Informado a los dueños antes de iniciar el ensayo, como constancia de la voluntariedad de participación y el conocimiento del experimento a realizar (ANEXO 2: Consentimiento Informado). Los animales se seleccionaron para el ensayo de forma consecutiva, en la medida en que se presentaron a atención veterinaria y los dueños daban su consentimiento para el tratamiento, hasta completar la $n=6$ para cada grupo. Los grupos se dividieron como se observa en la Tabla 3, el primer grupo (G1) fue el tratamiento rutinario con antibiótico metronidazol; luego el grupo (G2) con formulación de las 3 cepas y con agentes protectores elegidos por mejor propiedad en $7,5 \times 10^7$ UFC/g; el grupo (G3) con formulación de las 3 cepas en $7,5 \times 10^8$ UFC/g; el grupo (G4) con control probiótico comercial BIOPOWER (CPB); el grupo (G5) con antibiótico metronidazol + $7,5 \times 10^7$ UFC/g; el grupo (G6) con metronidazol + $7,5 \times 10^8$ UFC/g y, por último, el grupo (G7) con metronidazol + probiótico comercial BIOPOWER como control positivo (Pignataro et al., 2021).

Se evaluaron las muestras fecales frescas para el análisis de escala visual de heces de Bristol por todo el tratamiento por medio de encuestas diarias para

registrar la disminución de la diarrea por la consistencia y la frecuencia de las heces. Para evaluar la activación del sistema inmune de los animales tratados y sus respectivos controles, se determinó el incremento o disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en muestras de 4 mL de sangre para los marcadores genéticos y 2 mL de sangre para perfil hepático y hemograma, para descartar falla hepática y patología de origen parasitario.

Tabla 3. Grupos de estudio para ensayo en perros.

Grupos	Nº	Tratamientos	Protector Gástrico	Duración
1	5	Metronidazol	Famotidina	10 días
2	5	Probiótico 7,5x10 ⁷ UFC/g*	Famotidina	10 días (límite de respuesta día 4)
3	5	Probiótico 7,5x10 ⁸ UFC/g*	Famotidina	10 días (límite de respuesta día 4)
4	5	Control probiótico comercial BIOPOWER (CPB)	Famotidina	10 días
5	5	Metronidazol + 7,5x10 ⁷ UFC/g*	Famotidina	10 días (7 días antibiótico)
6	5	Metronidazol + 7,5x10 ⁸ UFC/g*	Famotidina	10 días (4 días antibiótico)
7	5	Metronidazol + CPB	Famotidina	10 días (4 días antibiótico)

*Formulación probiótica: TUCO-16 con maltodextrina-inulina, TUCO-17 con FOS-inulina y TUCO-4 con FOS-inulina.

A partir de muestras de sangre tomadas en los días 0, 5 y 10 de tratamiento, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes caninos. Se utilizó el medio de separación de linfocitos LSM (Corning), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y las células aisladas por muestra se resuspendieron en 1 mL del reactivo Trizol (Invitrogen). Posteriormente, se realizó la purificación de ARN, su cuantificación y el análisis de su integridad mediante electroforesis en gel de

agarosa. Luego, a partir de las muestras de ARN, se realizaron ensayos de qRT-PCR para el análisis de la expresión de las siguientes citoquinas: IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10. Para la síntesis de ADN complementario y el RT-PCR se utilizó el mismo kit y equipo explicado anteriormente en el ensayo en ratones. Se utilizó la expresión de Antizima 1 de ornitina descarboxilasa (OAZ1) como gen normalizador (Tabla 4). Los resultados fueron analizados usando el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Tabla 4. Secuencias de partidores usados en RT-PCR para la especie *Canis lupus familiaris*.

Gen		Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	N° GenBank
TNF-α canino	Forward	TAGCAAACCCCGAAGCTGAG	118	NM_00100324 4.4
	Reverse	TACAACCCATCTGACGGCAC		
IL-8 canino	Forward	TGTCCTTTCTGCAGCTCTCTG	138	NM_00100320 0.1
	Reverse	GGGCCACTGTCAATCACTCT		
IL-6 canino	Forward	GGGAAAGCAGTAGCCATCAC	78	NM_00100330 1.1
	Reverse	CAGGACCCAGCTATGAACT		
IL-1β canino	Forward	GAAAGCCCACCCTACAGCTA	195	NM_00103797 1.1
	Reverse	GGCCACCTCTGGTATTTCTCT		
IL-10 canino	Forward	GGTTGCCAGCCCTGTCCGG	146	NM_00100307 7.1
	Reverse	GCGTCGCAGCCTCAGTCTCA		
OAZ1 canino	Forward	TGGGCGAGGGAATAGTCAGA	148	NM_00112723 4.1
	Reverse	AATGTGTTTGGAGCCCGTGA		

7.6. Análisis estadístico

Se combinaron y utilizaron los siguientes programas para el análisis de datos estadísticos: software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.) y Excel (Microsoft 365). La significación estadística de los resultados se evaluó usando ANOVA unidireccional, ANOVA bidireccional y la prueba de comparación múltiple de Dunnett. El nivel de significación estadística se definió como $p < 0,05$ (Strompfová et al., 2018).

8. RESULTADOS

8.1 Condiciones de cultivo cepas probióticas

8.1.1. Producción de biomasa

La cantidad de biomasa obtenida en los cultivos de cepas caninas, según el peso seco, nos permitió definir el comienzo de la fase estacionaria a partir de las 12 h de cultivo. El máximo de biomasa obtenida para la cepa TUCO-16 fue de 3,84 g/L y para la cepa TUCO-17 fue de 3,51 g/L (Fig. 2a y 2b). En cambio, para la cepa porcina TUCO-4 la fase estacionaria comenzó desde las 20 h y con una producción de biomasa menor, con un máximo de 2,1 g/L (Fig. 2c).

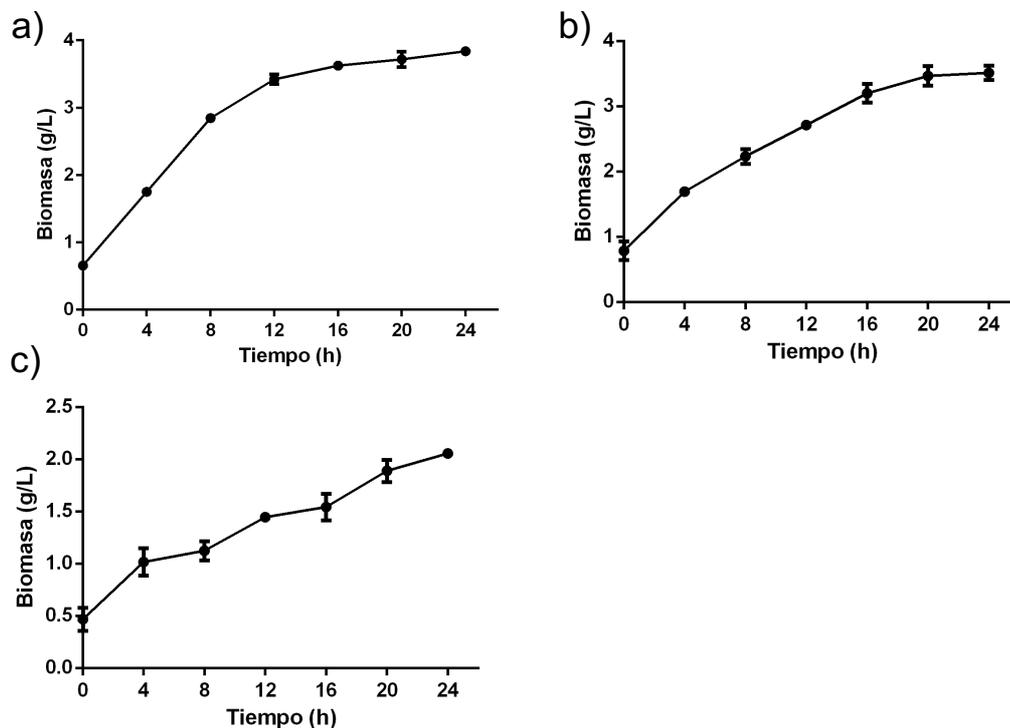


Fig. 2. Producción de biomasa en g/L de cepas canina y porcina. Medición de peso seco a diferentes tiempos (t)= 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h. a) TUCO-16, b) TUCO-17 y c) TUCO-4.

8.1.2. Densidad óptica

A partir de los valores de densidad óptica, medida como la variación de absorbancia en el tiempo, se corroboró que las tres cepas alcanzan la fase estacionaria del crecimiento a las 12 h de cultivo, como se mencionaba antes. La cepa TUCO-16 tuvo una absorbancia de 7,3 a las 12h (Fig. 3a), mientras que para la cepa TUCO-17 de 7,7 (Fig. 3b) y para TUCO-4 fue de 2,8, un valor inferior a la mitad de lo obtenido para las dos cepas caninas (Fig. 3c).

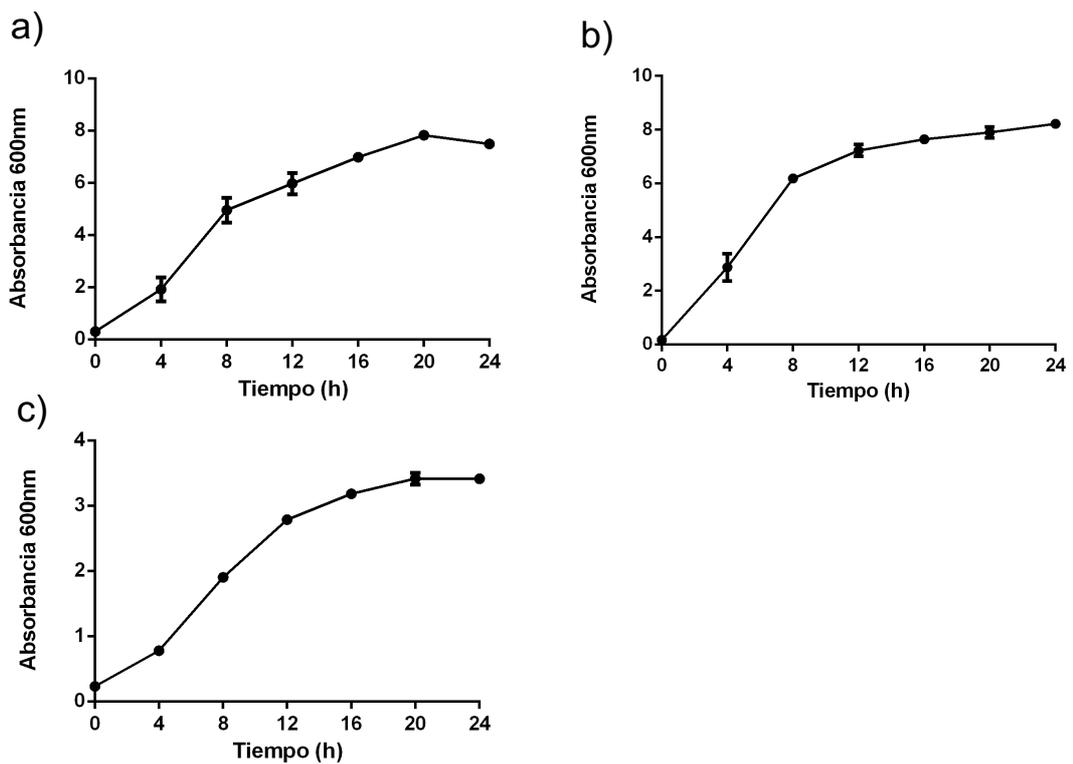


Fig. 3. Curvas de crecimiento de las cepas probióticas derivada de leche canina y porcina crecidas en medio de cultivo MRS. Se grafica la absorbancia de las muestras en diferentes tiempos (t): 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h a 600nm. a) TUCO-16 b) TUCO-17 y c) TUCO-4.

8.1.3. Consumo de glucosa

Durante el cultivo de las cepas caninas se observó un consumo de glucosa del 80% a las 12 h de cultivo (Fig. 4a y 4b). Posteriormente, la concentración de glucosa se mantiene constante hasta las 24 h de cultivo. Estos resultados indican que no hubo aumento de biomasa y que sólo ocurrió un recambio celular. Para el caso de la cepa TUCO-4, el consumo de glucosa a las 12 h de cultivo es de aproximadamente el 60%, y después disminuye progresivamente hasta las 24 h de cultivo (Fig. 4c).

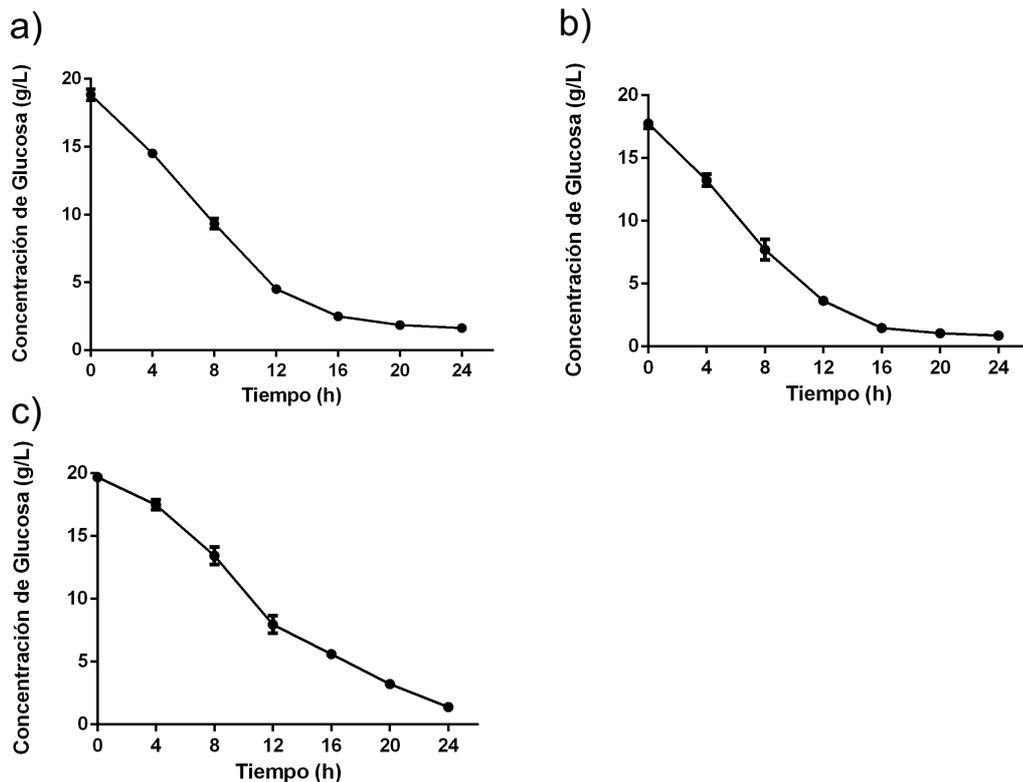


Fig. 4. Curso temporal del consumo de glucosa en el tiempo en los cultivos de las cepas probióticas crecidas en medio líquido MRS. La absorbancia en cada tiempo de muestreo se analizó a 625nm. (t)= 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h. a) TUCO-16, b) TUCO-17 y c) TUCO-4.

8.1.4. Viabilidad celular

Los resultados de producción de biomasa, densidad óptica y consumo de glucosa nos permiten definir que el tiempo ideal del desarrollo de las tres cepas es a las 12 h de cultivo en medio líquido MRS. Además, se evaluó prolongar el crecimiento bacteriano unas 12 h más con un refuerzo nutricional de glucosa a una concentración final de 20 g/L. Al comienzo de la fase estacionaria la viabilidad de la cepa TUCO-16 es de 9,79 Log UFC/mL y después del refuerzo, se incrementa 9,98 Log UFC/mL a las 16 h de cultivo (Fig. 5a). Para la cepa TUCO-17 a las 12 h la viabilidad es de 9,49 Log UFC/mL y posterior al refuerzo es de 9,56 UFC/mL. (Fig. 5b)

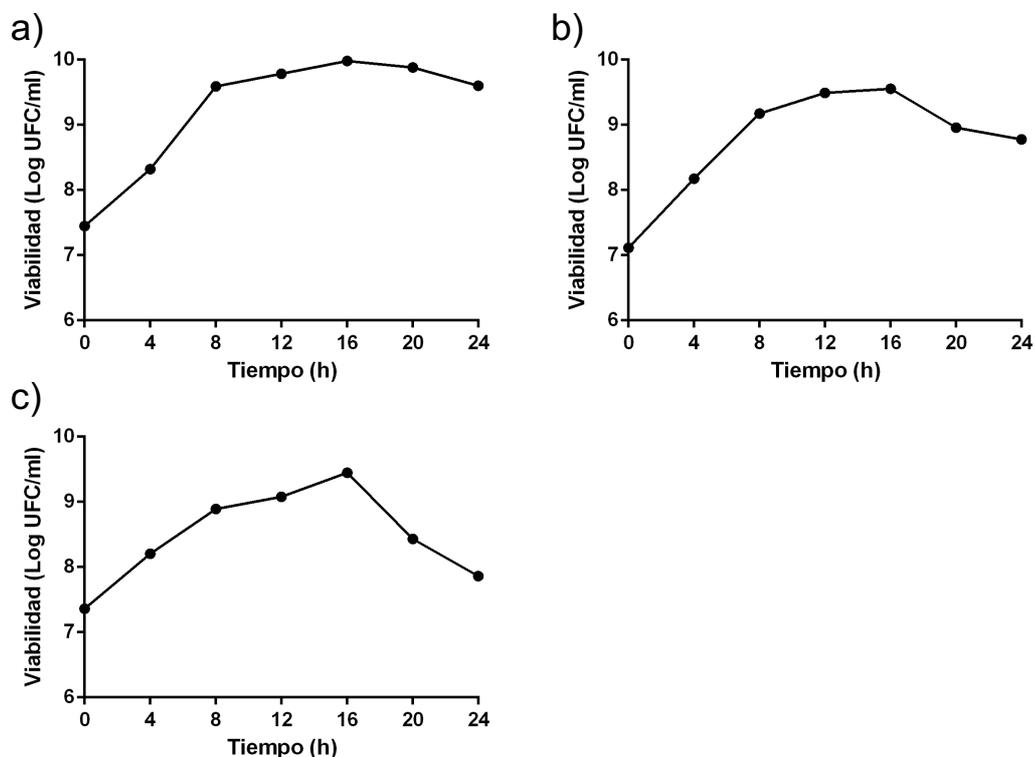


Fig. 5. Evaluación de la viabilidad celular de las cepas probióticas cultivadas con refuerzo nutricional a las 12h. Los cultivos se incubaron hasta las 12h y posteriormente se agregó un refuerzo de glucosa. Se tomaron muestras en diferentes tiempos (t)= 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h. a) TUCO-16, b) TUCO-17 y c) TUCO-4.

Por último, la viabilidad de la cepa TUCO-4 es de 9,08 Log UFC/mL antes del refuerzo y llegó hasta 9,45 UFC/mL a las 16 h de cultivo, para finalmente decaer dos órdenes de viabilidad celular (Fig. 5c). Como el aumento de viabilidad con el refuerzo de glucosa no es significativo, consideramos mantener el cultivo de cada cepa hasta las 12-16h de cultivo para los ensayos siguientes.

8.2 Microencapsulación de biomasa

La viabilidad celular de cada fermentación fue de $4,7 \times 10^9$ UFC/mL para TUCO-16; de $2,2 \times 10^9$ UFC/mL para TUCO-17 y de $9,3 \times 10^8$ UFC/mL para TUCO-4.

8.2.1. Microencapsulados por liofilización

Las cepas liofilizadas se obtuvieron con un rendimiento promedio del 90,9%, siendo similares los rendimientos entre las mezclas de cada cepa. Es por esto que, para el análisis de morfología se eligieron los liofilizados con mayor viabilidad ya que los rendimientos no tienen diferencias significativas entre ellos. Todas las cepas liofilizadas reconstituidas tuvieron una viabilidad superior a 1×10^9 UFC/g. Los candidatos liofilizados fueron TUCO-16 recubiertas con la mezcla de maltodextrina-inulina y para TUCO-17 y TUCO-4 la mezcla de recubrimiento seleccionada fue FOS-inulina (Tabla 5).

Tabla 5. Viabilidad celular y rendimiento de cepas caninas y porcina liofilizadas.

Mezcla	TUCO-16		TUCO-17		TUCO-4	
	Viabilidad (UFC/g)	Rendimiento (%)	Viabilidad (UFC/g)	Rendimiento (%)	Viabilidad (UFC/g)	Rendimiento (%)
M - FOS	5,4x10 ⁹	82,7	1,4x10 ⁹	94,4	--	--
M - I	9,1x10 ⁹	95,5	1,0x10 ⁹	90,7	1,2x10 ⁹	87,2
FOS - I	8,6x10 ⁹	95,7	5,8x10 ⁹	92,7	1,5x10 ⁹	88,4

(--): no quedó el liofilizado, M – FOS: maltodextrina-FOS, M – I: maltodextrina-inulina; FOS – I: FOS-inulina.

Con respecto a la morfología, se observó que las microcápsulas de todas las muestras varían en tamaños de 5-10 μm , de superficie lisa y forma esférica irregular. No se observa la presencia de bacterias libres (Fig. 6). De igual manera, se distinguió que en la formulación de maltodextrina-inulina las microcápsulas presentan fisuras (Fig. 6a).

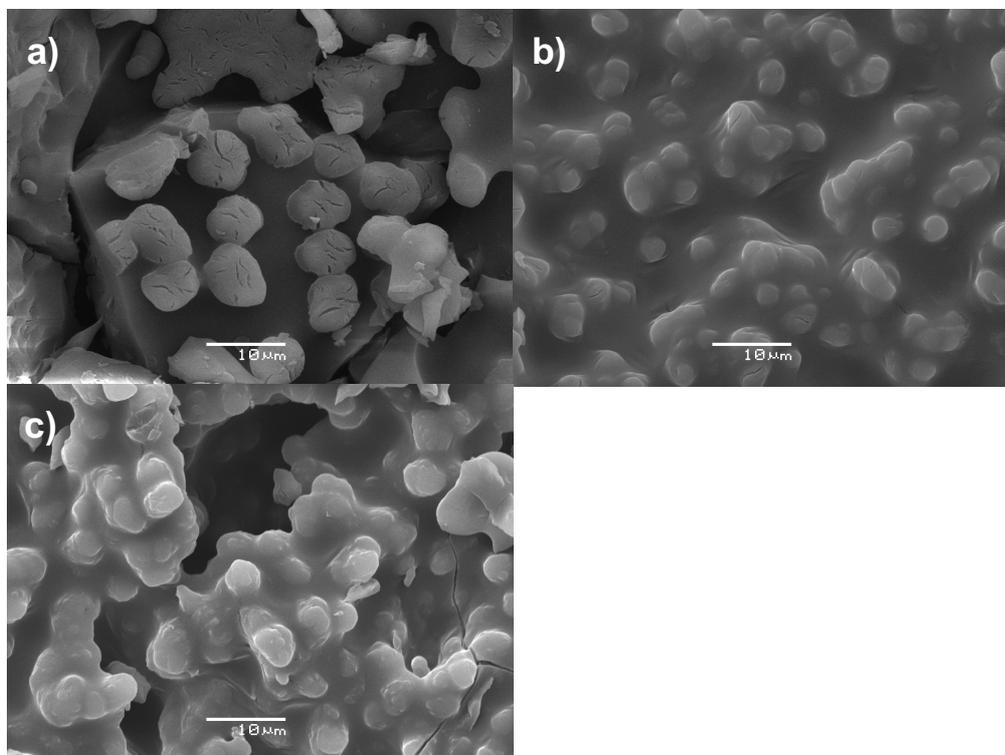


Fig. 6. Evaluación de las preparaciones microencapsuladas por liofilización mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). a) TUCO-16 recubierta con maltodextrina-inulina (M-I), b) TUCO-17 recubierta con FOS-inulina (F-I), c) TUCO-4 recubierta con FOS-inulina (F-I).

8.2.2. Microencapsulados en secado por atomización

En la medida en que se variaron los parámetros en el equipo (Mini Spray Dryer B-290), principalmente las temperaturas de entrada y salida, se obtuvieron distintos rendimientos de proceso. Se destaca que los rendimientos más altos fueron para la cepa TUCO-16 con 60,7% y la cepa TUCO-17 con 60,6% ambas con la combinación FOS-I (Tabla 6). Además, la viabilidad no superó de 1×10^8 UFC/g lo que es limitante considerando la pérdida que habrá en el almacenamiento del producto y lo esperado al momento de la ingesta del probiótico.

Tabla 6. Viabilidad celular y rendimiento a distintos parámetros de secado por atomización de cepas caninas.

Mezcla	Cepa	T _{inlet} (°C)	T _{outlet} (°C)	Aspiración (%)	Bomba (%)	Flujo (mm ³)	Viabilidad (UFC/g)	Rendimiento (%)
FOS - I	TUCO-17	140	75	50	5	40-50	$2,5 \times 10^7$	40
FOS - I	TUCO-17	140	75	50	10	40-50	$1,1 \times 10^7$	10
FOS - I	TUCO-17	130	72	70	10	40-50	$3,7 \times 10^8$	35
FOS - I	TUCO-17	120	70	70	10	40-50	$5,6 \times 10^7$	55,3
FOS - I	TUCO-17	120	70	70	10	40-50	$6,5 \times 10^8$	60,6
M - I	TUCO-17	120	70	70	10	40-50	$5,6 \times 10^7$	59,4
FOS - I	TUCO-16	120	70	70	7	40-50	$6,7 \times 10^9$	53,9
FOS - I	TUCO-16	120	70	75	10	40-50	$1,15 \times 10^9$	54,4
FOS - I	TUCO-16	120	68-70	70	10	40-50	$4,1 \times 10^8$	60,5
FOS - I	TUCO-16	120	70	70	10	40-50	$7,5 \times 10^8$	60,7
M - FOS	TUCO-16	120	70	70	10	40-50	$7,6 \times 10^8$	58,5

Los microencapsulados de las cepas TUCO-16 y TUCO-17 con alto rendimiento, observados en SEM, presentaron una superficie sin fisuras mecánicas y con presencia de concavidades. Los tamaños varían de 1-5 μm y se aprecia una forma esférica, más que las microcápsulas liofilizadas (Fig. 7).

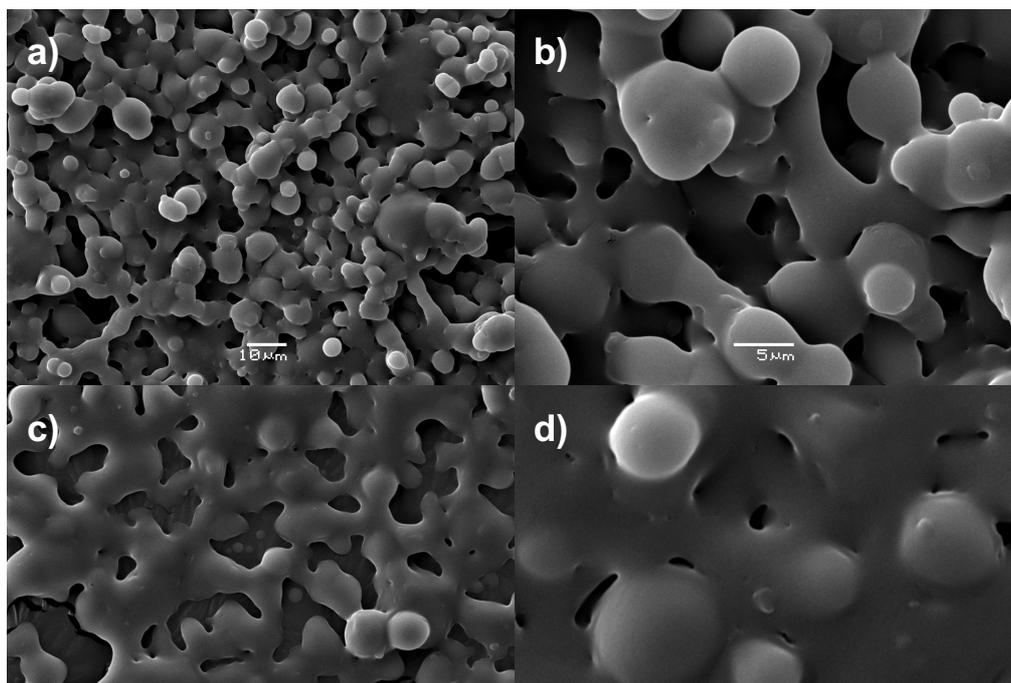


Fig. 7. Evaluación de las preparaciones microencapsuladas en secado por atomización mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). a) y b) TUCO-16 con recubierta con FOS-inulina (FOS-I); c) y d) TUCO-17 recubierta con FOS-inulina (FOS-I).

8.3. Estabilidad en almacenamiento normal

Los microencapsulados por ambos métodos, se envasaron en cantidades de 1 g en sachet al vacío, y se almacenaron a 25°C para comprobar la estabilidad de las preparaciones en relación con cada técnica utilizada, asumiendo que el producto final se guardará en lugar fresco y seco. De igual manera se probaron temperaturas de 30°C y 37°C, para evaluar la resistencia de las microcápsulas y las combinaciones de cepas a condiciones más extremas de almacenamiento y transporte. Se obtuvo que las preparaciones de cepas TUCO-16/TUCO-17 liofilizadas y almacenadas a 25°C durante seis meses disminuyeron en 2,36 Log y en el caso de la cepa TUCO-4 disminuyó 3,38 Log, con una viabilidad celular final de los sachet de $2,5 \times 10^8$ UFC/g.

En cambio, el Lote 1 correspondiente a la formulación de las 2 cepas caninas liofilizadas a la dosis final, disminuyó en 3,64 Log y el Lote 2 que tiene las 3 cepas liofilizadas a la dosis final disminuyó en 4,62 Log (Fig. 8a). De este último se sugiere que la mayor pérdida de viabilidad se asocia a que esta formulación, al contener mayor variedad de cepas, genera mayor bioactividad.

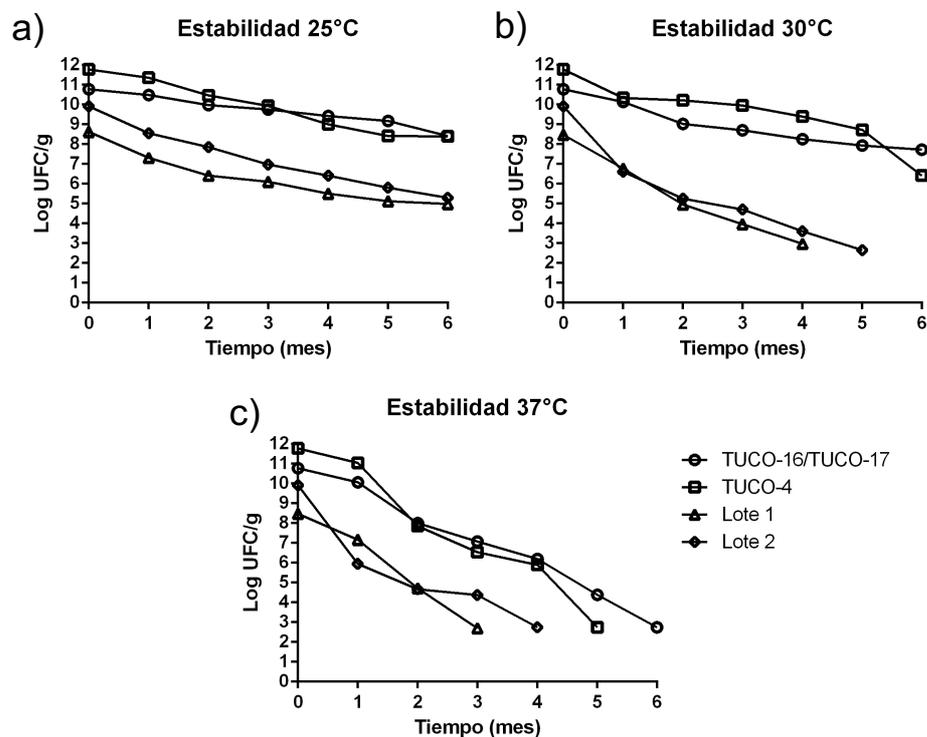


Fig. 8. Evaluación mensual de la estabilidad de cepas caninas y porcina liofilizadas y almacenadas a diferentes temperaturas. a) Estabilidad a 25°C, b) Estabilidad a 30°C y c) Estabilidad a 37°C. Lote 1: cepas caninas + FOS/inulina en concentración $7,5 \times 10^8$ UFC/g; Lote 2: cepas caninas + cepa porcina + FOS/inulina en concentración $7,5 \times 10^8$ UFC/g.

En la evaluación de estabilidad a 30°C, la mezcla de cepas caninas liofilizadas y la cepa porcina liofilizada individualmente, mantienen la viabilidad celular hasta el sexto mes con una disminución de viabilidad de 3,05 Log y 5,36 Log respectivamente. En cambio, los lotes formulados que contienen las tres cepas pierden viabilidad al cuarto y quinto mes, a esto se debe que las curvas

de estabilidad estén truncadas (Fig. 8b). Lo mismo ocurre con la estabilidad a 37°C, sólo la combinación TUCO-16/TUCO-17 entregó una mínima viabilidad entre 30-300 colonias por placa al final del ensayo. La cepa TUCO-4 y los lotes pierden la viabilidad el tercer mes (Fig. 8c).

La estabilidad de los microencapsulados con secado por atomización se probó hasta tres meses a causa de la cantidad limitada para realizar el ensayo. Se hizo la comparación con el resto de las formulaciones liofilizadas por la misma duración de tiempo y la mezcla de TUCO-16/TUCO-17 liofilizada tiene menor pérdida de viabilidad lo que se reafirma con la ANOVA bidireccional. Le sigue la cepa TUCO-16 secada por atomización y la cepa TUCO-4 liofilizada (Tabla 7). Se destaca de forma negativa la TUCO-17 secada por atomización porque presentó la mínima viabilidad celular desde el primer mes, se sospecha error humano en el proceso de vacío en los sachets ya que estas microcápsulas no tienen diferencia en los agentes encapsulantes con la TUCO-16. Para las 30° y 37°C, la estabilidad se mantiene en los microencapsulados principalmente liofilizados.

Tabla 7. Estabilidad de las preparaciones microencapsuladas con técnicas de liofilizado y secado por atomización al tercer mes de almacenamiento a diferentes temperaturas.

Estabilidad al tercer mes (Log)	25°C	30°C	37°C
TUCO-16 (SA)	1,82	5,15	6,93
TUCO-17 (SA)	7,03	7,54	6,18
TUCO-16/TUCO-17 (L)	1,02	2,07	3,70
TUCO-4 (L)	1,84	1,82	5,25
Lote 1 (L)	2,52	4,66	6,93
Lote 2 (L)	2,94	5,21	5,54

SA: Secado por atomización, L: Liofilizado

8.4. Estudio de estabilidad acelerada

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada a temperaturas superiores a 50°C. Se evaluó como las microcápsulas obtenidas por liofilización soportan altas temperaturas y se observó como la cepa TUCO-4 es la que presenta menor tasa de degradación específica al presentar una pendiente menor según las líneas de regresión calculadas a temperatura de 50°C. Le sigue en estabilidad acelerada, la mezcla de TUCO-16/TUCO-17 y, por último, el Lote 3 del probiótico formulado con las 3 cepas (Fig. 9). De igual manera se realizaron los ensayos a 60°C y 70°C, pero perdieron viabilidad celular a estas temperaturas a estabilidad acelerada.

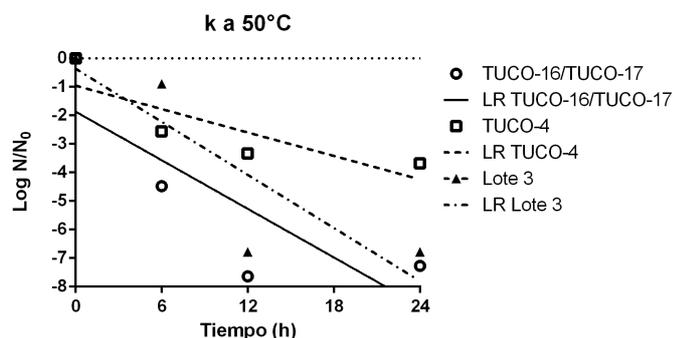


Fig. 9. Evaluación de la estabilidad acelerada durante el almacenamiento de cepas caninas, cepa porcina y probiótico formulado a 50°C. Expresado según valores logarítmicos de la tasa específica de degradación $\text{Log } N/N_0$ frente al tiempo de almacenamiento a 50°C por 24 h. LR: Línea de regresión, Lote 3: cepas caninas + cepa porcina + FOS/inulina en c.s.p concentración $7,5 \times 10^8$ UFC/g.

También se calculó la tasa de degradación específica a un k a 25°C usando los datos de la estabilidad normal, donde TUCO-16/TUCO-17 liofilizado tuvo un k_{25} de 0,37; le sigue el Lote 1 liofilizado y TUCO-16 secado por atomización, con la misma tasa de degradación de 0,58; y finalmente está TUCO-4 con una tasa de degradación de 0,62 (Fig. 10). Entonces, la temperatura de

almacenamiento fue un parámetro crucial que afectó la supervivencia de las cepas, con mayor implicancia sobre los lotes que contienen las 3 cepas que sobre las microcápsulas de cepas individuales.

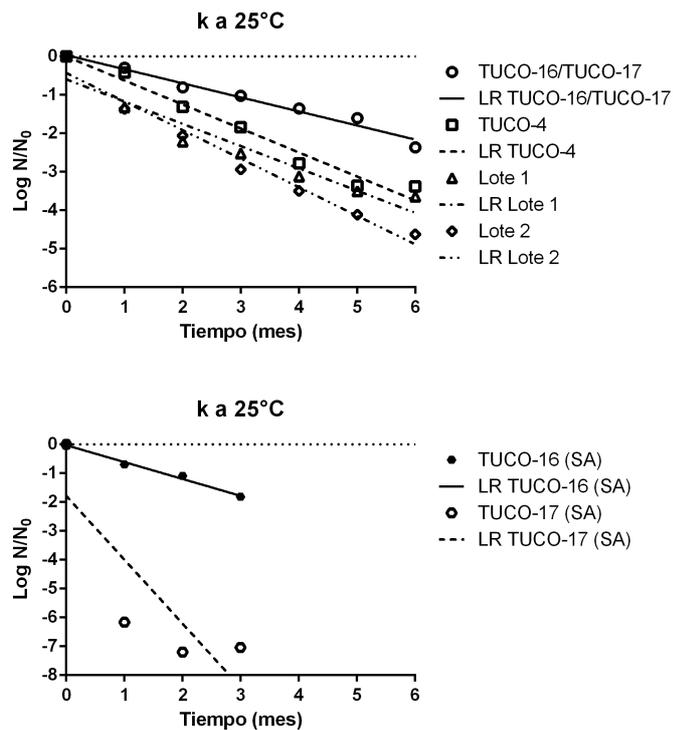


Fig. 10. Evaluación de la estabilidad acelerada durante el almacenamiento de cepas caninas, cepa porcina y probióticos formulados a 25°C. Expresado según valores logarítmicos de la tasa específica de degradación $\text{Log } N/N_0$ frente al tiempo de almacenamiento a 50°C por 24 h. LR: Línea de regresión; Lote 3: cepas caninas + cepa porcina + FOS/inulina en concentración $7,5 \times 10^8$ UFC/g; SA: Secado por atomización.

8.5. Pruebas *in vitro*: Ensayo de Viabilidad celular y Adhesión.

Las pruebas *in vitro* fueron realizadas con las cepas liofilizadas y los tres tipos de mezclas para agentes encapsulantes debido a que la técnica por liofilización presentó mayor rendimiento, por lo que no continuamos evaluando las preparaciones obtenidas mediante secado por atomización. Durante la evaluación de citotoxicidad celular en células caninas (línea MDCK), se observó que sólo la cepa TUCO-16 formulada en maltodextrina-FOS indujo

una citotoxicidad significativa a la mayor dosis administrada, con la dosis más concentrada de la preparación recubierta con maltodextrina-inulina, la viabilidad celular alcanzó un 90%, aunque esta citotoxicidad no resultó significativa. Para la cepa TUCO-4, con ambas formulaciones evaluadas la viabilidad disminuyó a la mayor dosis de tratamiento, aunque esta citotoxicidad sólo resultó significativa para la formulación FOS-inulina. En todos los otros tratamientos, incluyendo al control positivo BIOPOWER (PCB), la estimulación con las preparaciones probióticas incrementó significativamente la viabilidad de las células caninas tratadas (Fig. 11).

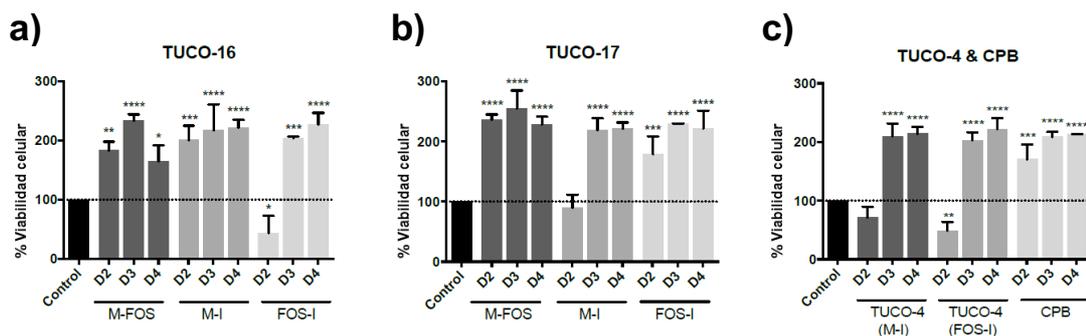


Fig. 11. Ensayo de viabilidad en células caninas MDCK tratadas con las preparaciones probióticas y analizadas mediante MTT. Se evaluó la viabilidad de las células caninas con respecto a los tratamientos con distintas formulaciones y concentraciones de la (a) TUCO-16, (b) TUCO-17, y (c) TUCO-4 y control probiótico BIOPOWER (CPB). La viabilidad del control negativo sin tratamiento es del 100%, por lo que la viabilidad menor al 100% indica citotoxicidad y mayor al 100% indica aumento de la viabilidad o estimulación de la proliferación. M-FOS: maltodextrina-FOS, M-I: maltodextrina-inulina, FOS-I: FOS-inulina. D2: 1×10^8 UFC/mL, D3: 1×10^7 UFC/mL, D4: 1×10^6 UFC/mL. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

En los ensayos de adhesión a células intestinales (línea HT29) el control positivo BIOPOWER presentó una adhesión cercana al 1%, mientras que la adhesión de las formulaciones para cada cepa en general aumentó en comparación a la adhesión de la cepa sin formular. Para la TUCO-16, la formulación maltodextrina-inulina aumentó significativamente la adhesión en

comparación a la cepa sin formular. Para la TUCO-17, las formulaciones maltodextrina-FOS y FOS-inulina aumentaron significativamente la adhesión con respecto a la cepa control sin formular. La formulación FOS-inulina fue la que presentó un mayor porcentaje de adhesión, mayor al 90%. Para la cepa TUCO-4, sólo la formulación FOS-inulina presentó un aumento significativo de la adhesión con respecto a la cepa sin formular (Fig. 12).

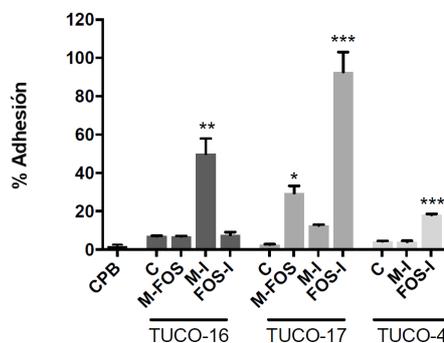


Fig. 12. Ensayo de adhesión a células epiteliales intestinales HT-29. Se evaluó la adhesión de las diferentes cepas probióticas y sus formulaciones a la línea celular epitelial intestinal HT-29. C: cepa de control no formulada, M-FOS: maltodextrina-FOS, M-I: maltodextrina-inulina, FOS-I: FOS-inulina, CPB: control probiótico comercial BIOPOWER. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

8.6. Pruebas *in vivo*: Ensayo en ratones y perros.

La evaluación de expresión relativa de citoquinas en el intestino de ratón mostró que la expresión de TNF- α esta significativamente disminuida en todos los tratamientos con respecto al control tanto para el grupo del día 14 (tratamiento) como del día 21 (post-tratamiento) (Fig. 13a). La expresión relativa de IL-10 no varió significativamente en los grupos de tratamiento o post-tratamiento (Fig. 13b). Se observaron resultados similares a TNF- α con la expresión de IFN- γ , donde se observó una disminución significativa de la expresión relativa o cambios no significativos para diferentes grupos. Cabe

destacar que los tratamientos con la cepa TUCO-16 redujeron significativamente la expresión de IFN- γ tanto en los grupos de tratamiento como post-tratamiento (Fig. 13c).

En cuanto al bazo, la expresión relativa de TNF- α disminuyó significativamente en todos los tratamientos al día 14. Por otro lado, para los grupos de post-tratamiento, sólo TUCO-4 indujo un cambio significativo en la expresión de esta citocina, que fue un aumento de 2,3 veces (Fig. 14a). Con respecto a la expresión relativa de IL-10, no se observaron cambios significativos para todos los grupos de tratamiento y post-tratamiento (Fig. 14b). Finalmente, los análisis de expresión relativa de IFN- γ demostraron que, para los grupos de tratamiento, sólo TUCO-16 indujo un cambio significativo, que fue una disminución en la expresión. Por otro lado, para los grupos de post-tratamiento, sólo TUCO-17 indujo un cambio significativo en la expresión de IFN- γ , que fue un aumento de 1,5 veces (Fig. 14c).

Con respecto a la expresión relativa de los receptores de reconocimiento de patrones en el intestino, no se observaron aumentos significativos de ningún receptor evaluado para todos los grupos de estudio en la condición posterior al tratamiento (Fig. 15). Por otro lado, la expresión relativa de TLR2 sólo aumentó significativamente (2,11 veces) en el grupo de tratamiento con TUCO-17 (Fig. 15a). La expresión relativa de NOD1, sólo en el grupo de tratamiento con TUCO-4 indujo un aumento significativo (3,22 veces) de este receptor (Fig. 15b). Finalmente, no se observaron cambios significativos en la expresión de NOD2 en ningún grupo de tratamiento (Fig. 15c).

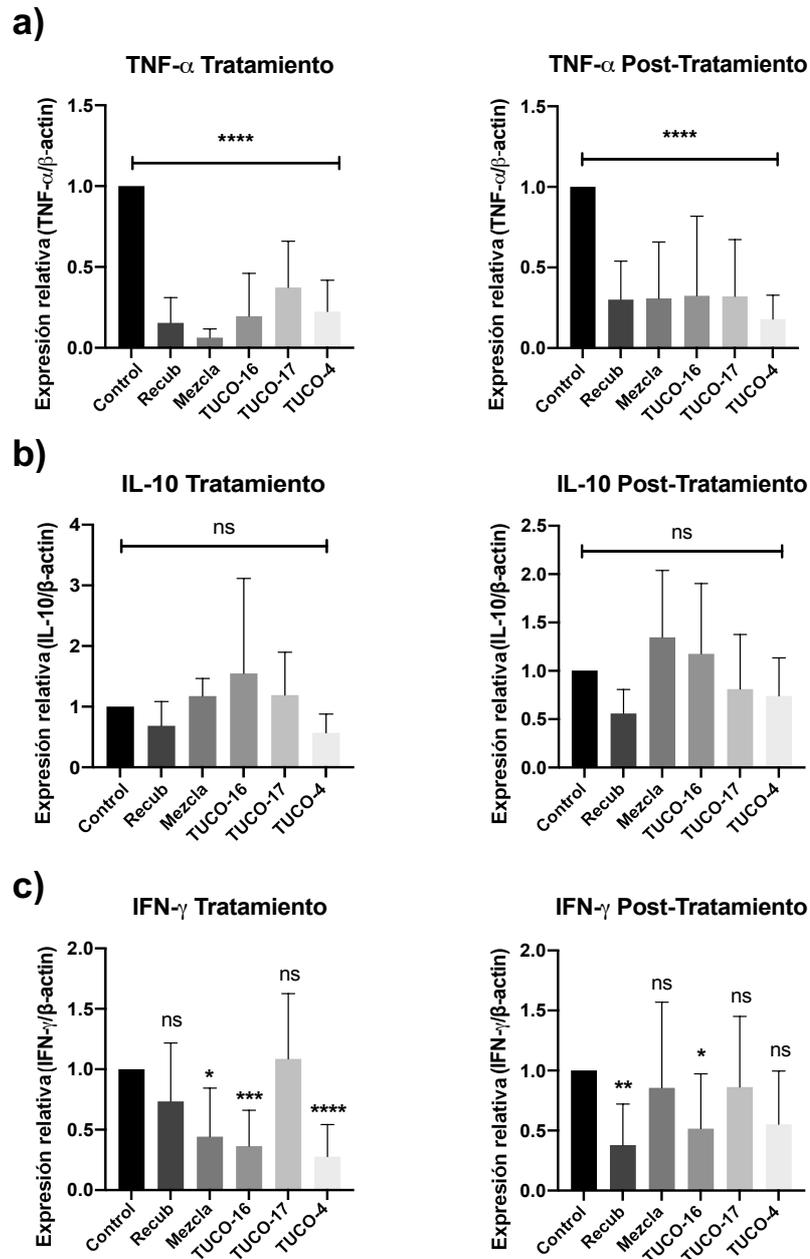


Fig. 13. Expresión relativa de citoquinas en intestino de ratones tratados con las cepas probióticas en estudio. Expresión relativa de TNF- α (a), IL-10 (b) e IFN- γ (c) en muestras de intestino de ratón, tanto para el día 14 de tratamiento (Tratamiento) como para el día 21 del ensayo (Post-tratamiento, una semana después de terminar las administraciones de probióticos y controles). La expresión relativa se calculó para la expresión del gen normalizador de β -actina. N= 5 animales. Los análisis estadísticos se realizaron comparando cada condición con el respectivo control negativo sin tratamiento (ANOVA unidireccional, método de comparación múltiple de Dunnett). * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; **** = P < 0,0001; ns = no significativo.

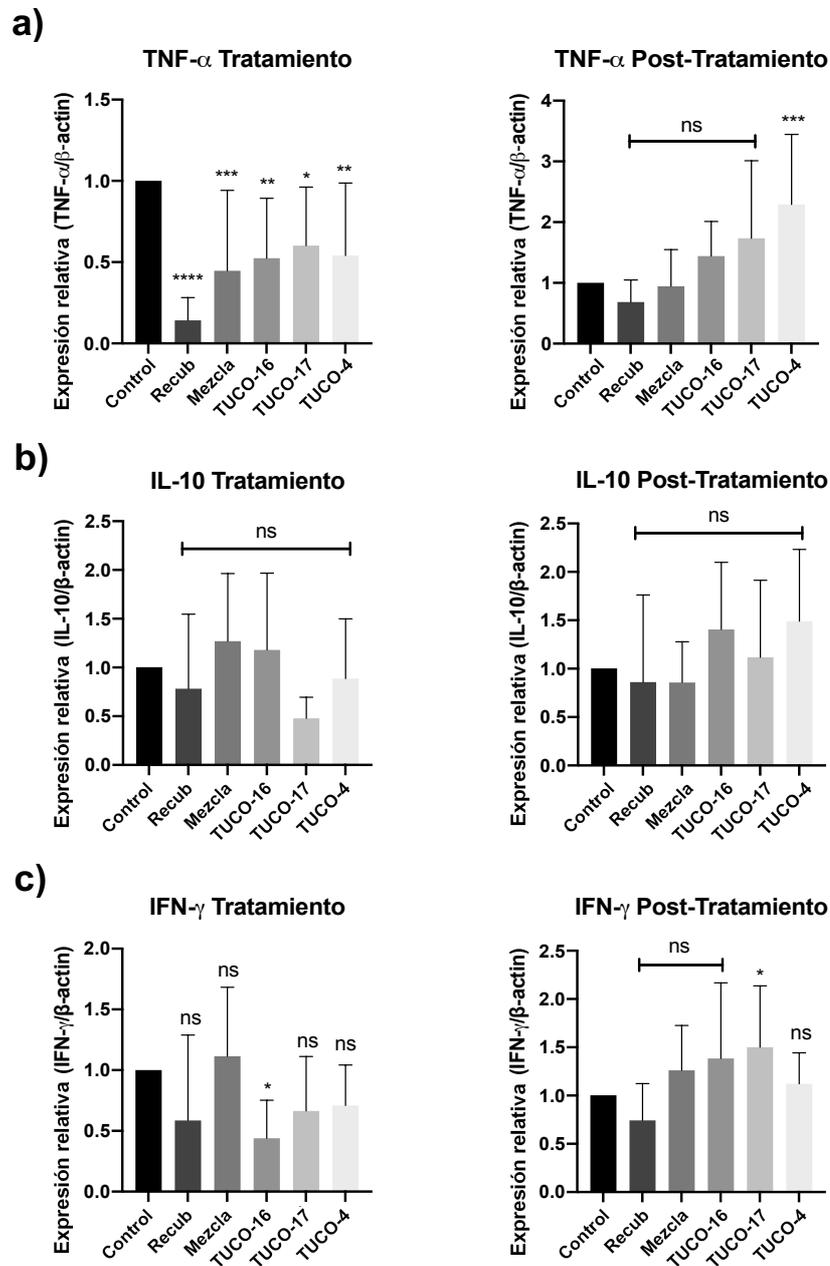


Fig. 14. Expresión relativa de citoquinas en bazo de ratones tratados con las cepas probióticas en estudio. Expresión relativa de TNF- α (a), IL-10 (b) e IFN- γ (c) en muestras de bazo de ratón, tanto para el día 14 de tratamiento (Tratamiento) como para el día 21 del ensayo (Post-tratamiento, una semana después de terminar las administraciones de probióticos y controles). La expresión relativa se calculó para la expresión del gen normalizador de β -actina. N= 5 animales. Los análisis estadísticos se realizaron comparando cada condición con el respectivo control negativo sin tratamiento (ANOVA unidireccional, método de comparación múltiple de Dunnett). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$; ns = no significativo.

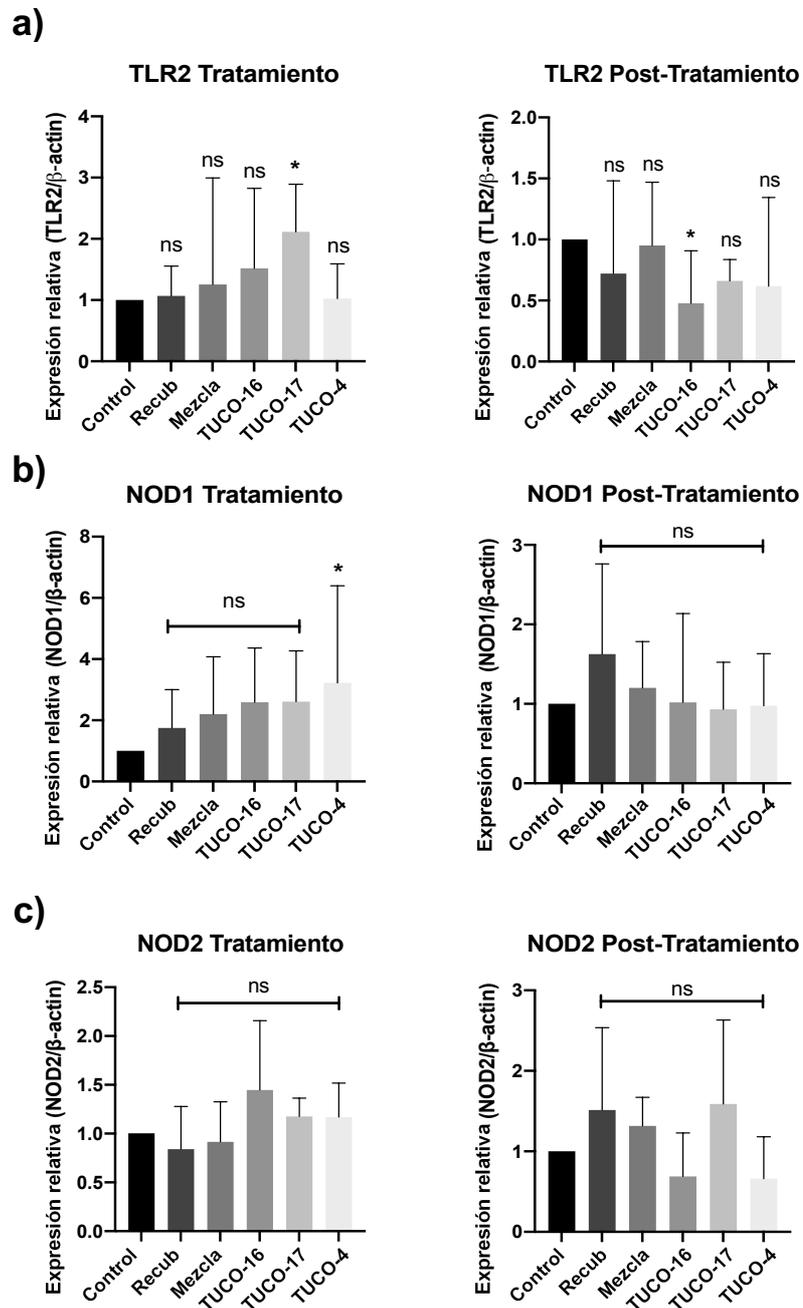


Fig. 15. Expresión relativa de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) en el intestino de ratones tratados con las cepas probióticas en estudio. Expresión relativa de TLR2 (a), NOD1 (b) y NOD2 (c) en muestras de intestino de ratón, tanto para el día 14 de tratamiento (Tratamiento) como para el día 21 del ensayo (Post-tratamiento, una semana después de completar las administraciones de probióticos y controles). La expresión relativa se calculó para la expresión del gen normalizador de β -actina. N= 5 animales. Los análisis estadísticos se realizaron comparando cada condición con el respectivo control negativo sin tratamiento (ANOVA unidireccional, método de comparación múltiple de Dunnett). * = $P < 0,05$; ns = no significativo.

Con respecto a los ensayos en perros, se trabajó con un N=5 en cada grupo, a excepción del grupo 5 de metronidazol y el probiótico a $7,5 \times 10^7$ UFC/g que tiene un N=4 porque se descartó un paciente por interrupción del tratamiento. Para evaluar el estado clínico de sintomatología durante el tratamiento de 10 días, cada tutor o tutora registró el comportamiento de las deposiciones fecales en base a la consistencia y frecuencia de heces según el sistema de puntajes previamente definido (Tabla 8 y 9). Los datos de las encuestas fueron obtenidos en la colaboración con la Universidad Técnica de Cotopaxi de Ecuador.

Tabla 8. Sistema de puntuación de consistencia de heces en encuestas diarias en ensayo en perros.

Escala Consistencia	Puntaje
Acuoso, sin textura	1
Textura y sin forma	2
Muy húmedas y blandas	3
Superficie húmeda	4
Firmes, pero no duras	5
Muy duras y secas	6

Tabla 9. Sistema de puntuación de frecuencia de heces en encuestas diarias en ensayo en perros.

Escala de frecuencia	Puntaje
1 vez	1
2 veces	2
3 veces	3
Más de 3 veces	4

Durante el ensayo se observó que los grupos con administración de probiótico en distintas concentraciones como el G2, mejoró la consistencia de las heces desde el día 6 y el G3 desde el día 7. En ambos casos de los grupos de tratamiento con probióticos, la consistencia final fue más firme en comparación con el grupo control G1 que sólo se le administró antibiótico

metronidazol (Fig. 16a-b). En el G4, el grupo del control del probiótico comercial, la consistencia de las heces mejoró progresivamente, con un puntaje mayor que G1 en el día 8 (Fig. 16c). En el caso de los grupos con el prototipo probiótico y con administración de antibióticos, la consistencia mejoró en los días 9 y 7, para G5 y G6 respectivamente, y también puntajes finales mayores en comparación al grupo control con sólo metronidazol (Fig. 16d-16e). Finalmente, para G7, el grupo del probiótico comercial y metronidazol, la consistencia de las deposiciones se mantuvieron constantes a lo largo del tratamiento, con una consistencia final mayor en comparación a G1 al día 10 del tratamiento (Fig. 16f). Es relevante destacar que el tratamiento con los probióticos formulados por sí solo mejoran la consistencia de las deposiciones en cuadros de diarrea en promedio al día 7.

La evaluación de frecuencia de las deposiciones mostró que, para todos los grupos, la frecuencia de las deposiciones es menor desde el día 1 con respecto al grupo control G1 (Fig. 17). Con G2, el grupo que se le administró sólo probiótico más un protector gástrico, se logró observar la menor frecuencia para el día 10 (Fig. 17a). La evolución de la frecuencia de deposiciones a lo largo de los tratamientos para los distintos grupos se mantuvo relativamente constante. Por lo tanto, los tratamientos con estos probióticos, ya sea solos o con antibiótico, contribuyen a disminuir la frecuencia diaria de deposiciones.

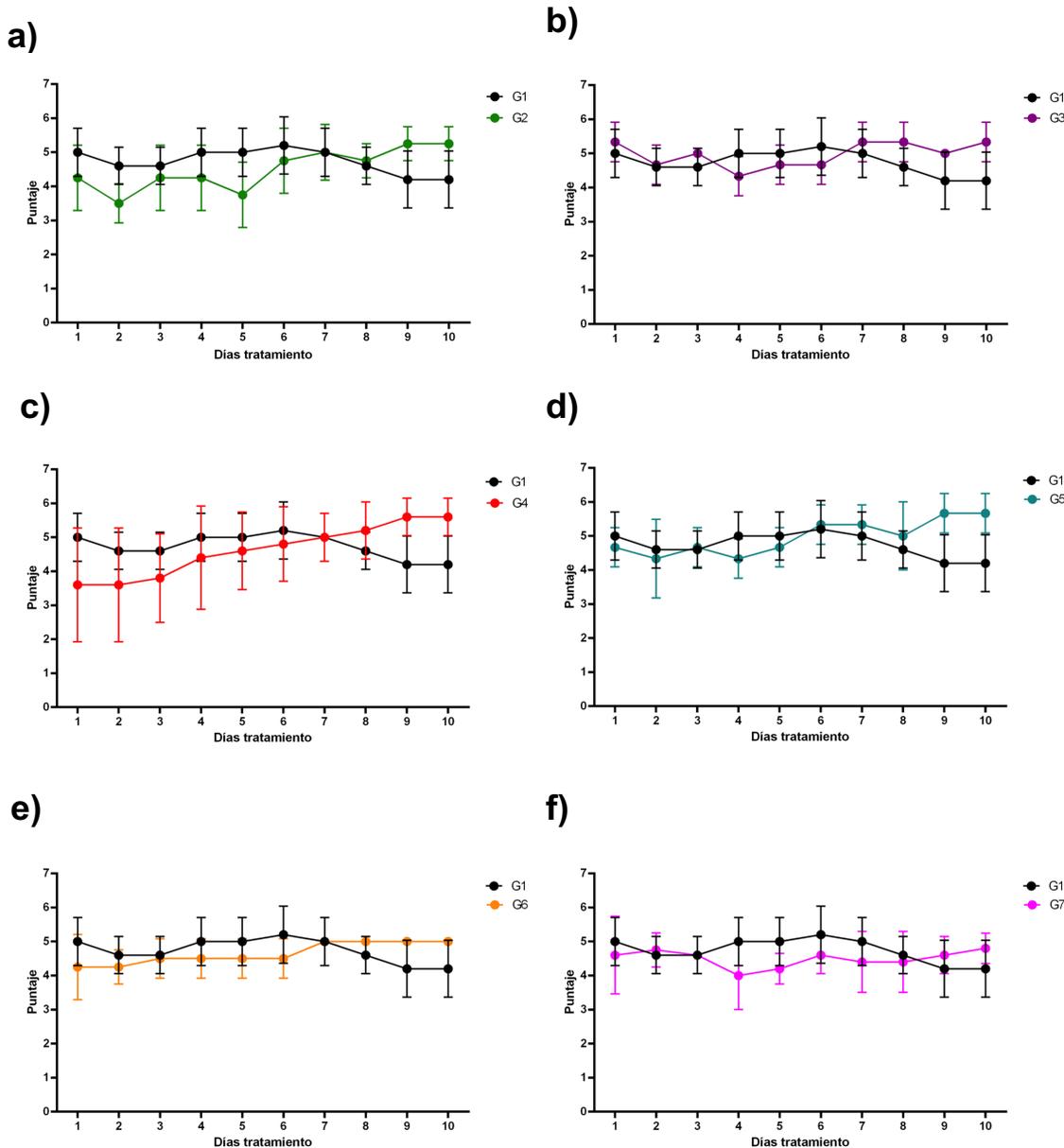


Fig. 16. Consistencia de las heces. Puntaje de acuerdo con la consistencia de las deposiciones, donde se compara el grupo control de tratamiento convencional G1 (metronidazol) con (a) G2 (Probiótico $7,5 \times 10^7$ UFC/g), (b) G3 (Probiótico $7,5 \times 10^8$ UFC/g) (c) G4 (Probiótico comercial) (d) G5 (Metronidazol + Probiótico $7,5 \times 10^7$ UFC/g) (e) G6 (Metronidazol + Probiótico $7,5 \times 10^8$ UFC/g) y (f) G7 (Metronidazol + Probiótico comercial) para los 10 días de tratamiento. Escala de puntaje: 1= acuoso, sin textura; 2= tienen textura; 3= muy húmedas y blandas; 4= superficie húmeda; 5= firmes, pero no duras; 6= muy duras y secas.

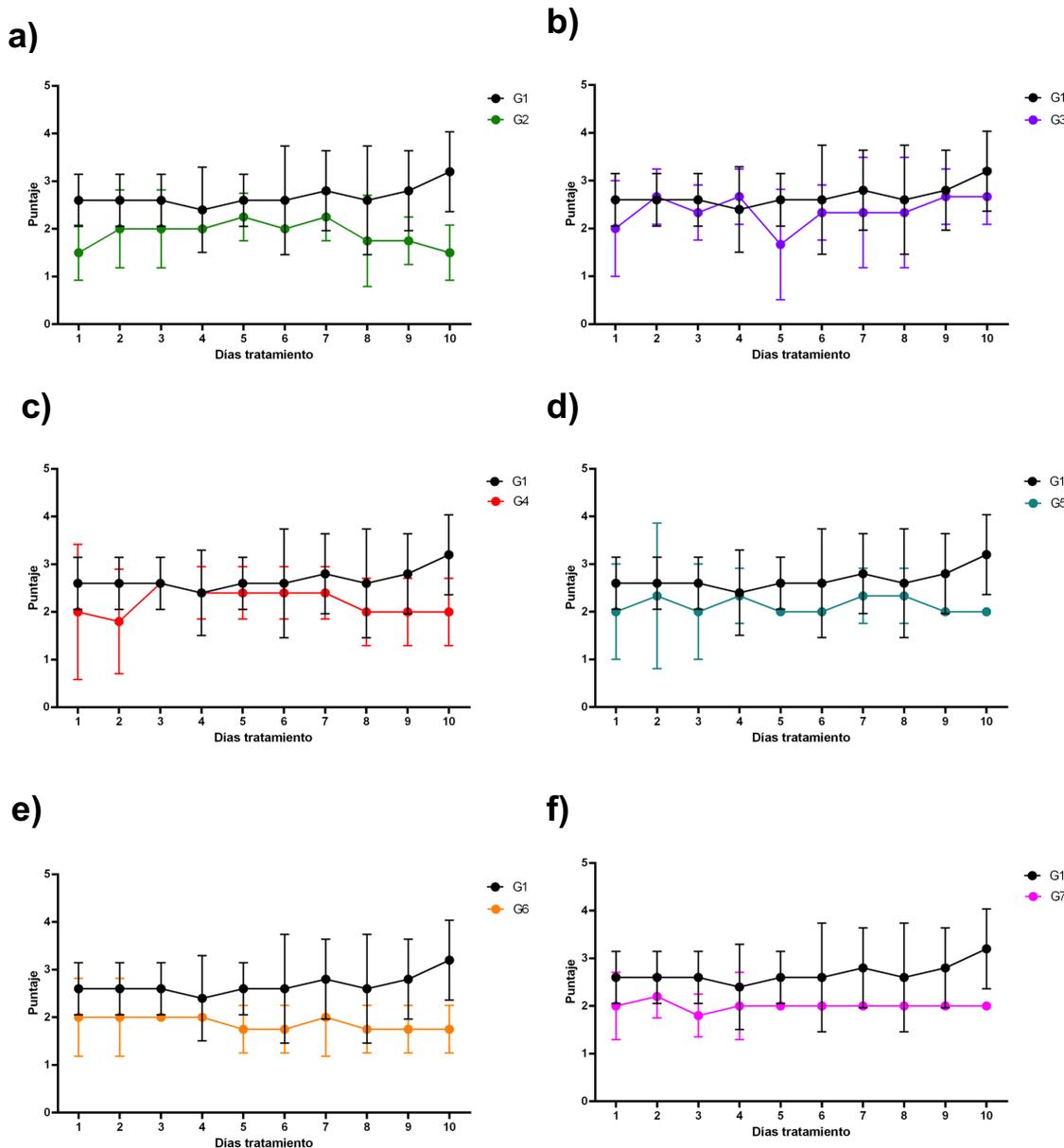


Fig. 17. Frecuencia diaria de deposiciones. Puntaje de acuerdo con la frecuencia de las deposiciones, donde se compara el grupo control de tratamiento convencional G1 (metronidazol) con (a) G2 (Probiótico $7,5 \times 10^7$ UFC/g), (b) G3 (Probiótico $7,5 \times 10^8$ UFC/g) (c) G4 (Probiótico comercial) (d) G5 (Metronidazol + Probiótico $7,5 \times 10^7$ UFC/g) (e) G6 (Metronidazol + Probiótico $7,5 \times 10^8$ UFC/g) y (f) G7 (Metronidazol + Probiótico comercial) para los 10 días de tratamiento. Escala de puntaje: 1= 1 vez al día; 2= 1-2 veces al día; 3= 2-3 veces al día; 4= >3 veces al día.

Por último, el efecto de la administración de la formulación probiótica sobre la expresión de marcadores inflamatorios son datos evaluados de forma preliminar, debido a un N=2 en G2 al momento de la entrega de esta tesis. Se obtuvo un aumento en la expresión relativa de citoquinas pro-inflamatorias en el día 5 de tratamiento. Específicamente la expresión aumentó para IL-6 de 4.4 veces, para IL-8 de 5.9 veces y para IL-1 β de 11.9 veces, mientras que la expresión de TNF- α no varió y la expresión de IL-10 disminuyó. Para el día 10 de tratamiento, las expresiones relativas de las citoquinas pro-inflamatorias disminuyeron con respecto al día 5, excepto para TNF- α cuya expresión no varió. Además, la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 aumentó en comparación con el día 5, con una inducción de 1.4 veces. Entonces, lo que se observó fue la modulación positiva en que induce una respuesta pro-inflamatoria al día 5 de tratamiento y finalmente, induce una mayor respuesta anti-inflamatoria para el día 10 de tratamiento (Fig. 18).

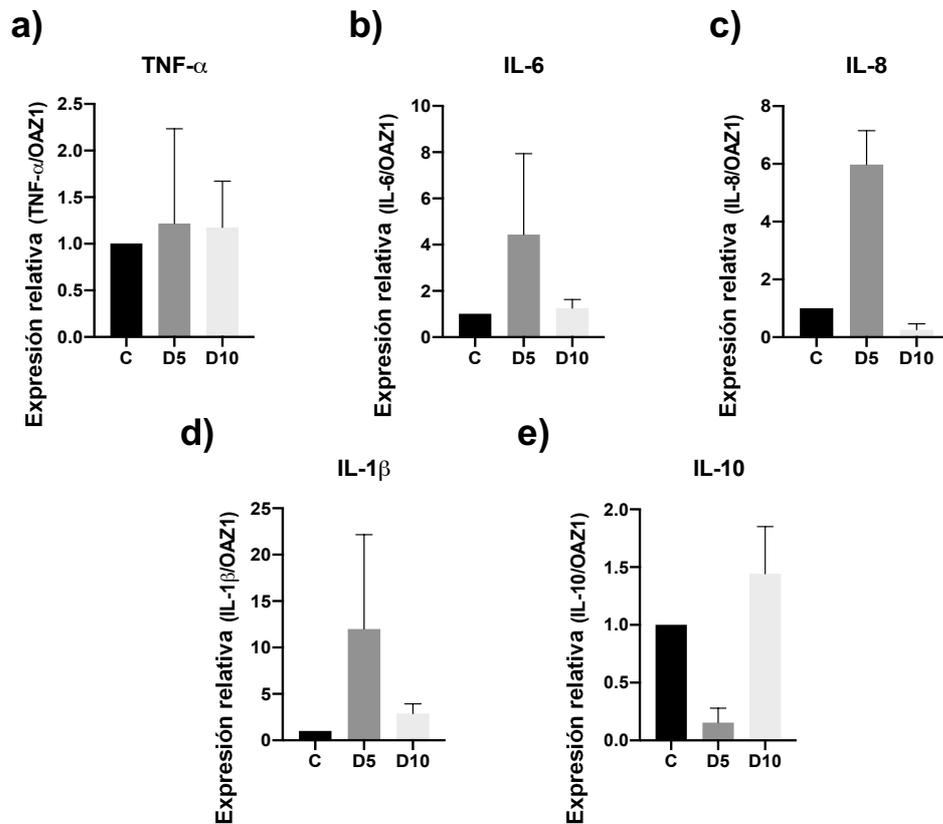


Fig. 18. Expresión relativa de marcadores inflamatorios en células mononucleares de sangre periférica de perros tratados con la formulación probiótica prototipo. Expresión relativa de los marcadores (a) TNF- α , (b) IL-6, (c) IL-8, (d) IL-1 β e (e) IL-10. La evaluación de expresión relativa consideró un N=2 (pacientes del grupo G2), para los días 5 (D5) y 10 (D10) de tratamiento. El cálculo de tasa de cambio consideró la expresión de OAZ1 como gen normalizador, y el día 0 de tratamiento como condición sin tratamiento o calibrador (C).

9. DISCUSIÓN

La administración de probióticos a la dieta de los animales de compañía ha ido en aumento con el objetivo principal de generar un efecto beneficioso sobre la microbiota gastrointestinal porque influye en el microambiente intestinal y ejerce un efecto directo sobre la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa (Anadón et al., 2019). Además, los probióticos caninos se seleccionan por la ausencia de actividad hemolítica, ausencia de genes de resistencia, producción de bacteriocina y ácido láctico. También deberían tener la capacidad de sobrevivir en condiciones gastrointestinales simuladas, pH bajo, sales biliares y adhesión a los tejidos epiteliales intestinales, efectos inhibidores del crecimiento de patógenos comunes y potencial inmunomodulador (Kumar et al., 2017; Kubašová et al., 2019; Hanifeh et al., 2021).

La caracterización previa de las cepas, como se demuestra en el Anexo 1, demuestra que las cepas de leche canina TUCO-16 y TUCO-17 presentaron resistencia al pH ácido, sales biliares y pancreatina y un efecto inhibitorio sobre las cepas patógenas. Los valores de autoagregación indican la capacidad de sedimentación de las cepas, característica relacionada con la colonización de células epiteliales. La coagregación está relacionada con la capacidad de eliminar bacterias como *E. coli* y *Salmonella*. Sin embargo, se coagregan menos que *L. casei* Shirota y control probiótico comercial BIOPOWER (CPB). No obstante, al contrastar los resultados de coagregación con los resultados de inhibición sobre patógenos, encontramos que las cepas potencialmente probióticas presentan halos de inhibición mayores a 2 cm

sobre las cepas patógenas. Los halos de inhibición de la cepa de leche porcina TUCO-4 fueron los más altos, por lo que se decidió incluir el efecto de la cepa porcina en los siguientes estudios para dilucidar una formulación multicepa que entregue la mayor propiedad benéfica posible. Sumado al interés en estudiar cerdos por ser una especie monogástrica y omnívora como modelo ideal para estudiar inmunología intestinal (Pabst, 2020). Los aislamientos del tracto intestinal de cerdos y heces de perros han mostrado una buena actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas multirresistentes y específicamente transmitidas por los alimentos; y excelentes propiedades probióticas (Lin et al., 2020). Por lo tanto, los probióticos de múltiples cepas podrían ser más beneficiosos debido a los efectos entre los aislados individuales y su sinergismo (Kwoji et al., 2021). Además, todas las cepas en evaluación y los controles resultaron negativos para hemólisis y actividad gelatinasa, con perfiles de resistencia y sensibilidad a antibióticos similares a los controles, lo que indica una presunta inocuidad de las cepas, reforzando su utilidad como probiótico.

En los ensayos que se desarrollaron en esta tesis, las cepas se formularon en base a un recubrimiento con prebióticos encapsulantes a través de dos métodos de recubrimiento, como liofilización y secado por aspersion de probióticos. Esto, principalmente, porque los prebióticos evaluados en este estudio ayudan a preservar la viabilidad celular durante el procesamiento, el almacenamiento y la digestión gastrointestinal (Liu et al., 2019). Se han utilizado como crioprotectores en procesos de liofilización, los conservantes de azúcar que pueden reemplazar el agua durante la deshidratación y la

formación de estructuras vítreas que ralentizan las interacciones moleculares dentro del citoplasma.

En base a los resultados obtenidos, el proceso de encapsulación seleccionado fue la liofilización principalmente por el rendimiento promedio de 90,9 % con una viabilidad superior a 1×10^9 UFC/g. Con respecto a las microcápsulas, y en específico a la comparación de las técnicas, podemos decir que, utilizando la técnica de liofilizado se obtuvo microcápsulas que resisten procesos de almacenamiento de hasta seis meses. La tasa de degradación de las cepas liofilizadas está dentro de los valores que podemos encontrar en la literatura, hasta con menor tasa de degradación específica (Lapsiri et al., 2012). Se demostró que cuanto más lisa es la superficie de las microcápsulas, más fuerte se comporta ésta frente a las condiciones destructivas, y cuanto más rugosa y porosa la superficie, resulta menos resistente (Martín et al., 2015; Šipailienė and Petraitytė, 2018). En cambio, las microcápsulas obtenidas por secado por atomización presentaron concavidades debido a la rápida evaporación del líquido atomizado, situación que se ha observado en estudios anteriores con *Lactobacillus* sp. En este caso haría que las partículas fueran más fuertes contra la fractura mecánica y la difusión de solutos, pero aun así se obtuvo baja viabilidad y bajo rendimiento en el proceso. La pérdida de viabilidad se explicaría por a las altas temperaturas de entrada y al estrés osmótico durante la deshidratación en este método de secado (Reyes et al., 2018; Misra et al., 2021).

En términos tecno-económicos la liofilización está restringida a altos costos de operación, que son hasta 50 veces más que el secado por atomización y

también por tiempos de procesos prolongados. Esto limita su aplicación a ingredientes termosensibles como células viables sensibles al calor (Rezvankehah et al., 2020). La ventaja principal del secado por atomización es su mayor escalabilidad y que se puede operar de forma continua, lo que requiere un control y ajuste adecuado de los parámetros del procesamiento para lograr la viabilidad deseada (Misra et al., 2021). Por motivos de la duración de esta tesis, no se profundizó en seguir modificando los parámetros y de igual manera sería relevante intentar con otros agentes encapsulantes porque se ha planteado que la modificación de medio y agentes reduciría el costo económico (Yudiasuti et al., 2022).

En los ensayos de citotoxicidad y adhesión a células epiteliales, solo una formulación a la concentración más alta (1×10^8 CFU/mL) mostró una citotoxicidad significativa en células caninas. Sin embargo, para todas las demás cepas, formulaciones y concentraciones, la viabilidad permaneció en el 100 % o aumentó hasta un 250 %. Se considera citotóxico si está por bajo del 70% (Oliveira-Alcântara et al., 2020). Precisamente la formulación maltodextrina-inulina no indujo citotoxicidad en todos los casos evaluados (diferentes cepas, diferentes concentraciones). En los ensayos de adhesión celular, la cepa que mostró mayor adhesión a las células epiteliales intestinales humanas fue la TUCO-17 con el recubrimiento de FOS-inulina, seguida de la cepa TUCO-16 con el recubrimiento de maltodextrina-inulina. Todas las cepas presentaron alta adherencia, a diferencia del control comercial. Esta característica de adhesión bacteriana a la mucosa intestinal es esencial para preferir cepas para el uso de probióticos debido a la

colonización efectiva y una mayor interacción con el epitelio del huésped y su sistema inmunológico. Debido a todo lo anterior es que se descartan formulaciones y se demuestra que las óptimas formulaciones son FOS-inulina para TUCO-17 y TUCO-4; y maltodextrina-inulina para TUCO-16, utilizando las concentraciones de 10^7 y 10^8 UFC (Alp and Kuleaşan, 2019; Hanifeh et al., 2021).

Con respecto al efecto probiótico *in vitro*, varios estudios sugieren la desregulación de marcadores de respuesta inmune innata inducida como TNF- α e IL-8 y receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como NOD-2 y TLR2 están en enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal canina (EII) (Peiravan et al., 2018; Konstantinidis et al., 2021) y Enteropatía crónica (EC) (Eissa et al., 2019), donde se demostró el efecto regulador de probióticos sobre todos estos factores (Xu et al., 2019b; Zhang et al., 2021; Raheem et al., 2022). En nuestro estudio, los probióticos mostraron una función inmunomoduladora preliminar *in vitro*, promoviendo un aumento significativo en la expresión de citoquinas proinflamatorias y receptores de reconocimiento de patrones. Los tratamientos con las diferentes formulaciones de probióticos y el recubrimiento de control redujeron significativamente la expresión de marcadores proinflamatorios en el intestino y el bazo de los ratones. Este efecto se observa durante el tratamiento con las formulaciones y también después de una semana de haber terminado los tratamientos. Por otro lado, los resultados de la expresión relativa de los RRP sugieren que el receptor TLR2 podría reconocer los patrones moleculares de TUCO-17 que son principalmente responsables de la respuesta anti-

inflamatoria, y el receptor NOD1 podría reconocer la cepa TUCO-4 encargada de una respuesta pro-inflamatoria, siendo la formulación multicepa una estrategia prometedora que puedan lograr tanto la memoria inmunológica como la tolerancia. Los resultados también sugieren que los receptores evaluados no estarían involucrados en el reconocimiento de TUCO-16, siendo el reconocimiento y activación de estos receptores sólo durante los días de tratamiento con los probióticos (Refeld et al., 2020; Fernández-García et al., 2021).

De forma preliminar, se plantea que los resultados del ensayo *in vivo* en perros que nos da una idea del potencial probiótico al mejorar la consistencia y frecuencia de las heces (resolviendo sintomatológicamente la diarrea desde el día 6 de tratamiento), induce una respuesta pro-inflamatoria al día 5 de tratamiento, y finalmente induce una mayor respuesta anti-inflamatoria para el día 10 de tratamiento. Las evidencias también sugieren que el uso de este formulado disminuye la diarrea sin el uso de antibióticos. Adicionalmente, los resultados sugieren que estos efectos ocurren tanto en los tratamientos con la formulación prototipo, como para los co-tratamientos con metronidazol a una concentración de $7,5 \times 10^7$ UFC/g (Rose et al., 2017; Pignataro et al., 2021).

10. CONCLUSIÓN

En conclusión, los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados demuestran el potencial probiótico de cepas aisladas de leche canina (TUCO-16 y TUCO-17) y porcina (TUCO-4) en un formulado probiótico combinado de las tres cepas como componentes activos a una concentración de $7,5 \times 10^7$ UFC/g, por la técnica de liofilización.

Este probiótico multicepa presenta efecto no citotóxico y adhesión al intestino, modula positivamente marcadores de la respuesta inmune pro-inflamatorios (IFN γ , TNF α , NOD1 y NOD2) y anti-inflamatorios (IL-10, TLR2). De forma preliminar disminuye la diarrea en presencia y ausencia de antibióticos. También mejora de la consistencia y frecuencia de heces en perros con enfermedades gastrointestinales.

11. GLOSARIO

AAGS - Signos gastrointestinales asociados a los antibióticos

BAL - Bacterias productoras de ácido láctico

CMI - Concentración mínima inhibitoria

CPB - Probiótico comercial BIOPOWER

EFSA - Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EII - Enfermedad inflamatoria intestinal canina

FOS - Fructooligosacáridos

IFN γ - Interferón gamma

IL-1 β - Interleuquina 1 beta

IL-6 - Interleuquina 6

IL-8 - Interleuquina 8

IL-10 - Interleuquina 10

NLR - Receptores tipo NOD

NOD - Dominio de oligomerización de nucleótido

RRP - Receptores de reconocimiento de patrones

OAZ1 - Antizima 1 de ornitina descarboxilasa

TLR - Receptores tipo Toll

TNF α - Factor de necrosis tumoral alfa

UFC – Unidad formadora de colonia

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, S. (2016). "Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures," in *Food Engineering Series* (Springer), 7–33. doi: 10.1007/978-3-319-42457-6_2.
- Alp, D., and Kuleaşan, H. (2019). Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World J Microbiol Biotechnol* 35. doi: 10.1007/s11274-019-2730-x.
- American Pet Products Association (APPA) (2023). Pet Industry Market Size, Trends & Ownership Statistics. Available at: https://www.americanpetproducts.org/press_industrytrends.asp
- Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., and Martínez, M. A. (2019). "Prebiotics and Probiotics in Feed and Animal Health," in *Nutraceuticals in Veterinary Medicine* (Springer International Publishing), 261–285. doi: 10.1007/978-3-030-04624-8_19.
- Australia, A. M. (2016). Pet ownership in Australia 2016. *Animal Medicines Australia: New South Wales, Australia*.
- Baffoni, L. (2018). "Probiotics and prebiotics for the health of companion animals," in *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety* (Springer International Publishing), 175–195. doi: 10.1007/978-3-319-71950-4_7.
- Broeckx, G., Vandenneuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S., and Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm* 505, 303–318. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002.
- Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., and Simal-Gandara, J. (2020). Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International* 129. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108852.
- Ciuca, L., Pepe, P., Bosco, A., Caccio, S. M., Maurelli, M. P., Sannella, A. R., et al. (2021). Effectiveness of Fenbendazole and Metronidazole Against Giardia Infection in Dogs Monitored for 50-Days in Home-Conditions. *Front Vet Sci* 8. doi: 10.3389/fvets.2021.626424.
- Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Belà, B., Gramenzi, A., Orpianesi, C., et al. (2019). Probiotic characterization of Lactobacillus isolates from canine faeces. *J Appl Microbiol* 126, 1245–1256. doi: 10.1111/jam.14197.
- da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., Tayse da Cruz Almeida, E., Tavares, J. F., Leite de Souza, E., et al. (2019). Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT* 116. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108496.

- Dandrieux, J. R. S. (2016). Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *Journal of Small Animal Practice* 57, 589–599. doi: 10.1111/jsap.12588.
- De Araújo, N. U., Adriana Gutiérrez Ramírez, L., Simón Ruiz Villadiego, O., and Inés Montoya Campuzano, O. (2015). TÉCNICAS PARA LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS Y EL IMPACTO EN SU FUNCIONALIDAD: UNA REVISIÓN.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(8), 499-499.
- Eissa, N., Kittana, H., Gomes-Neto, J. C., and Hussein, H. (2019). Mucosal immunity and gut microbiota in dogs with chronic enteropathy. *Res Vet Sci* 122, 156–164. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.019.
- Euromonitor International. (2019). Pet Care in Chile. Disponible en: <https://www.euromonitor.com/pet-care-in-chile/report>
- Euromonitor International. (2022). World Market for Pet Care. Disponible en: <https://www.euromonitor.com/world-market-for-pet-care/report>
- Fernández-García, V., González-Ramos, S., Martín-Sanz, P., Portillo, F. G. del, Laparra, J. M., and Boscá, L. (2021). NOD1 in the interplay between microbiota and gastrointestinal immune adaptations. *Pharmacol Res* 171. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105775.
- Fonseca, F., Cenard, S., and Passot, S. (2015). Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology* 1257, 477–488. doi: 10.1007/978-1-4939-2193-5_24.
- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., and Tzia, C. (2021). A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61, 1515–1536. doi: 10.1080/10408398.2020.1761773.
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., and Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34, 14–23. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.002.
- Guía para elaborar y presentar monografías de proceso de producción de productos destinado a la alimentación animal. Gobierno de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero. Vigencia 23 de agosto de 2010.
- Hanifeh, M., Spillmann, T., Huhtinen, M., Sclivagnotis, Y. S., Grönthal, T., and Hynönen, U. (2021). Ex-vivo adhesion of enterococcus faecalis and enterococcus faecium to the intestinal mucosa of healthy beagles. *Animals* 11. doi: 10.3390/ani11113283.
- Konstantinidis, A. O., Adamama-Moraitou, K. K., Pardali, D., Dovas, C. I., Brellou, G. D., Papadopoulos, T., et al. (2021). Colonic mucosal and cytobrush sample cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease and their correlation with disease activity, endoscopic and histopathologic score. *PLoS One* 16. doi: 10.1371/journal.pone.0245713.

- Kubašová, I., Lauková, A., Hamarová, L., Pristaš, P., and Strompfová, V. (2019). Evaluation of enterococci for potential probiotic utilization in dogs. *Folia Microbiol (Praha)* 64, 177–187. doi: 10.1007/s12223-018-0640-1.
- Kumar, S., Pattanaik, A. K., Sharma, S., Jadhav, S. E., Dutta, N., and Kumar, A. (2017). Probiotic Potential of a Lactobacillus Bacterium of Canine Faecal-Origin and Its Impact on Select Gut Health Indices and Immune Response of Dogs. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9, 262–277. doi: 10.1007/s12602-017-9256-z.
- Kwoji, I. D., Aiyegoro, O. A., Okpeku, M., and Adeleke, M. A. (2021). Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities. doi: 10.3390/biology.
- Langlois, D. K., Koenigshof, A. M., and Mani, R. (2020). Metronidazole treatment of acute diarrhea in dogs: A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *J Vet Intern Med* 34, 98–104. doi: 10.1111/jvim.15664.
- Lapsiri, W., Bhandari, B., and Wanchaitanawong, P. (2012). Viability of Lactobacillus plantarum TISTR 2075 in Different Protectants during Spray Drying and Storage. *Drying Technology* 30, 1407–1412. doi: 10.1080/07373937.2012.684226.
- Lieu, M. D., Dang, T. K. T., and Nguyen, T. H. (2017). Viability of microencapsulated lactobacillus casei in synbiotic mayonnaise. *Food Res* 1, 234–239. doi: 10.26656/fr.2017.6.103.
- Lin, C. F., Lin, M. Y., Lin, C. N., Chiou, M. T., Chen, J. W., Yang, K. C., et al. (2020). Potential probiotic of Lactobacillus strains isolated from the intestinal tracts of pigs and feces of dogs with antibacterial activity against multidrug-resistant pathogenic bacteria. *Arch Microbiol* 202, 1849–1860. doi: 10.1007/s00203-020-01908-w.
- Liu, H., Cui, S. W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., et al. (2019). Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59, 2863–2878. doi: 10.1080/10408398.2017.1377684.
- Liu, Y., Wang, J., and Wu, C. (2022). Modulation of Gut Microbiota and Immune System by Probiotics, Pre-biotics, and Post-biotics. *Front Nutr* 8. doi: 10.3389/fnut.2021.634897.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., and Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 27, 15–25. doi: 10.1016/j.ifset.2014.09.010.
- Martín, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernández, L., et al. (2010). Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *Veterinary Journal* 185, 193–198. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.04.014.

- Misra, S., Pandey, P., and Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends Food Sci Technol* 109, 340–351. doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.039.
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays Biochem* 60, 275–301. doi: 10.1042/EBC20160017.
- Oliveira-Alcântara, A. V., Abreu, A. A. S., Gonçalves, C., Fuciños, P., Cerqueira, M. A., Gama, F. M. P., et al. (2020). Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *LWT* 130. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109699.
- Peiravan, A., Bertolini, F., Rothschild, M. F., Simpson, K. W., Jergens, A. E., Allenspach, K., et al. (2018). Genome-wide association studies of inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *PLoS One* 13. doi: 10.1371/journal.pone.0200685.
- Pignataro, G., Di Prinzio, R., Crisi, P. E., Belà, B., Fusaro, I., Trevisan, C., et al. (2021). Comparison of the therapeutic effect of treatment with antibiotics or nutraceuticals on clinical activity and the fecal microbiome of dogs with acute diarrhea. *Animals* 11. doi: 10.3390/ani11061484.
- Pilla, R., and Suchodolski, J. S. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Front Vet Sci* 6. doi: 10.3389/fvets.2019.00498.
- Raheem, A., Wang, M., Zhang, J., Liang, L., Liang, R., Yin, Y., et al. (2022). The probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strain RW1 isolated from canine faeces. *J Appl Microbiol* 132, 2306–2322. doi: 10.1111/jam.15341.
- Refeld, A., Bogdanova, A., Prazdnova, E., Beskopylny, A., Olshevskaya, A., Maltseva, T., et al. (2020). Immunobiotics mechanisms of action and prospects of use in veterinary medicine. in *E3S Web of Conferences* (EDP Sciences). doi: 10.1051/e3sconf/202021006017.
- RESOLUCION 1992 EXENTA. Reglamento de Alimentos para Animales. Santiago, última versión 9 de mayo 2015.
- RESOLUCION 5025 EXENTA: Establece alcance del programa de aseguramiento de calidad en fábricas o elaboradoras de alimentos y suplementos para animales y fábricas de ingredientes de origen animal destinados a la alimentación animal. Santiago, 1 de septiembre de 2009.
- RESOLUCION 5324 EXENTA. Nómina de aditivos autorizados para la elaboración y fabricación de alimentos y suplementos para animales. Santiago, 9 de agosto de 2011
- RESOLUCION 7113 EXENTA de 2016, fija tiempos estandarizados para las actividades de control nacional de la industria de productos pecuarios que indica y deroga RESOLUCIÓN N° 2.388, de 2007, de la dirección nacional del SAG.

- Reyes, V., Chotiko, A., Chouljenko, A., and Sathivel, S. (2018). Viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 encapsulated with high maize starch, maltodextrin, and gum arabic. *LWT* 96, 642–647. doi: 10.1016/j.lwt.2018.06.017.
- Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., and Askari, G. (2020). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology* 38, 235–258. doi: 10.1080/07373937.2019.1653906.
- Rose, L., Rose, J., Gosling, S., and Holmes, M. (2017). Efficacy of a Probiotic-Prebiotic Supplement on Incidence of Diarrhea in a Dog Shelter: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Vet Intern Med* 31, 377–382. doi: 10.1111/jvim.14666.
- Schmitz, S., and Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Vet Med Sci* 2, 71–94. doi: 10.1002/vms3.17.
- Sfaciotte, R. A. P., Coronel, L. G., Osaki, S. C., and Wosiacki, S. R. (2015). Gram-positive bacterial resistant strains of interest in animal and public health. *Semina: Ciências Agrárias* 36, 2693–2712. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n4p2693.
- Shmalberg, J., Montalbano, C., Morelli, G., and Buckley, G. J. (2019). A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial of a probiotic or metronidazole for acute canine diarrhea. *Front Vet Sci* 6. doi: 10.3389/fvets.2019.00163.
- Singh, A. K., and Ramesh, A. (2009). Evaluation of a facile method of template DNA preparation for PCR-based detection and typing of lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 26, 504–513. doi: 10.1016/j.fm.2009.03.006.
- Šipailienė, A., and Petraitytė, S. (2018). Encapsulation of Probiotics: Proper Selection of the Probiotic Strain and the Influence of Encapsulation Technology and Materials on the Viability of Encapsulated Microorganisms. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10. doi: 10.1007/s12602-017-9347-x.
- Soontarak, S., Chow, L., Johnson, V., Coy, J., Webb, C., Wennogle, S., et al. (2019). Humoral immune responses against gut bacteria in dogs with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 14. doi: 10.1371/journal.pone.0220522.
- Soonthornsit, J., Ngamwongsatit, N., Sangsuriya, P., and Arya, N. (2021). The alterations of fecal microbiota in dogs with acute diarrhea, Thailand. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 51, 683–690. doi: 10.14456/tjvm.2021.82.
- Strengers, Y., Nicholls, L., and Maller, C. (2016). Curious energy consumers: Humans and nonhumans in assemblages of household practice. *Journal of Consumer Culture* 16, 761–780. doi: 10.1177/1469540514536194.

- Strompfová, V., Kubašová, I., Farbáková, J., Mađari, A., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., et al. (2018). Evaluation of Probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 Administration with Alginate in Dogs. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10, 577–588. doi: 10.1007/s12602-017-9370-y.
- Tizard, I. R., and Jones, S. W. (2018). The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 48, 307–322. doi: 10.1016/j.cvsm.2017.10.008.
- Vilson, Å., Ramadan, Z., Li, Q., Hedhammar, Å., Reynolds, A., Spears, J., et al. (2018). Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS One* 13. doi: 10.1371/journal.pone.0193507.
- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., MacLeay, J. M., et al. (2020). The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *Front Microbiol* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.01266.
- White, R., Atherly, T., Guard, B., Rossi, G., Wang, C., Mosher, C., et al. (2017). Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 8, 451–466. doi: 10.1080/19490976.2017.1334754.
- Whittemore, J. C., Moyers, T. D., and Price, J. M. (2019). Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *J Vet Intern Med* 33, 1619–1626. doi: 10.1111/jvim.15553.
- Widyarman, A. S., Drestia, A. M., Bachtiar, E. W., and Bachtiar, B. M. (2018). The anti-inflammatory effects of glycerol-supplemented probiotic *Lactobacillus reuteri* on infected epithelial cells in vitro. *Contemp Clin Dent* 9, 298–303. doi: 10.4103/ccd.ccd_53_18.
- Xu, H., Huang, W., Hou, Q., Kwok, L. Y., Laga, W., Wang, Y., et al. (2019a). Oral administration of compound probiotics improved canine feed intake, weight gain, immunity and intestinal microbiota. *Front Immunol* 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00666.
- Xu, H., Zhao, F., Hou, Q., Huang, W., Liu, Y., Zhang, H., et al. (2019b). Metagenomic analysis revealed beneficial effects of probiotics in improving the composition and function of the gut microbiota in dogs with diarrhoea. *Food Funct* 10, 2618–2629. doi: 10.1039/c9fo00087a.
- Yudiasuti, S. O. N., Kastaman, R., Sukarminah, E., and Mardawati, E. (2022). Value-added analysis of *Lactobacillus acidophilus* cell encapsulation using *Eucheuma cottonii* by freeze-drying and spray-drying. *Open Agric* 7, 300–310. doi: 10.1515/opag-2022-0081.
- Zhang, G., Raheem, A., Zhang, J., Yue, M., Yan, X., Wang, M., et al. (2021). Evaluation of probiotic and antimicrobial potential of canine derived-*Lactobacilli*. doi: 10.20944/preprints202107.0239.v1.

13. ANEXOS

ANEXO 1: Caracterización de cepas probióticas en Facultad de Ciencias Veterinarias.

Los siguientes resultados están en proceso de publicación. Las cepas fueron estudiadas en función de sus características macroscópicas y microscópicas según tinción de Gram, morfología de colonias y prueba de catalasa. También se examinaron sus características funcionales según la resistencia a sales biliares (Oxgall 0,5 y 5,0 % p/v), NaCl (2, 6 y 9,0 % p/v), pancreatina (0,5, 1,0 y 2,0 % p/v) y a ácido (pH 3). Se utilizaron como control positivo el aislamiento de la cepa *L. acidophilus* del probiótico comercial BIOPOWER (CPB) para mascotas y la cepa *Lacticaseibacillus casei* Shirota para consumo humano. Todas las cepas demostraron ser Gram positivas, morfología bacilar y negativo para la prueba de detección de catalasa. Las características funcionales de las cepas demostraron resistencia a las condiciones gástricas menos la cepa control SHIROTA que no presentó resistencia a sales biliares y en el caso de CPB, presentó características similares a las ya mencionadas (Tabla I).

La acción contra cepas patógenas se analizó en agar soft o agar semisólido según halos de inhibición. Los patógenos bacterianos utilizados en este estudio fueron *Clostridium perfringens* NCTC 13170, cepas de *E. coli* ATCC 25922, una cepa de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), un aislado de *Salmonella* sp. y *Salmonella* entérica ATCC 13076. Todas las cepas presentaron acción inhibitoria. Las cepas de origen canino mostraron una mayor acción de inhibición a patógenos que los controles. Se destaca la alta acción inhibitoria

de la cepa de origen porcino (TUCO-4) sobre todas las cepas de *E. coli* y *Salmonella* (Tabla II).

Tabla I. Características macroscópicas, microscópicas y resistencia de las cepas aisladas desde leche canina, leche porcina y cepas control.

Cepas	Características macroscópicas (colonia)	Morfo logía	Cata lasa	Sales biliares (% p/v)	NaCl (% p/v)	Pancrea tina (% p/v)	pH 3,0
TUCO-16	Blancas y bordes lisos	Bacilar	-	0,5 – 5,0	2,0 – 9,0	0,5 – 2,0	+
TUCO-17	Blancas y bordes lisos	Bacilar	-	0,5 – 5,0	2,0 – 9,0	0,5 – 2,0	+
TUCO-4	Perladas y bordes lisos	Bacilar	-	0,5 – 5,0	2,0 – 9,0	0,5 – 2,0	+
<i>L. casei</i> Shirota	Blancas y bordes lisos	Bacilar	-	NHD	2,0 – 9,0	0,5 – 2,0	+
<i>L. acidophilus</i> (CPB)	Perladas y bordes lisos	Bacilar	-	0,5 – 5,0	2,0 – 9,0	0,5 – 2,0	+

Tabla II. Promedio de los halos de inhibición (diámetros en mm) de las cepas aisladas desde leche canina, leche porcina y cepas control.

Cepas	<i>C. perfringens</i>	<i>E. coli</i> ATCC 13076	ETEC	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> entérica
TUCO-16	47,0 ± 2,4 _{bc}	27,7 ± 2,0 _{ab}	27,7 ± 2,7 _c	24,3 ± 2,0 _{ab}	26,3 ± 0,8 _b
TUCO-17	46,2 ± 2,4 _b	31,7 ± 2,5 _c	25,5 ± 0,8 _b	25,3 ± 1,6 _b	25,5 ± 2,3 _b
TUCO-4	36,0 ± 1,3 _a	48,5 ± 1,5 _d	34,5 ± 2,1 _d	38,7 ± 1,9 _c	38,3 ± 1,9 _c
<i>L. casei</i> Shirota	48,8 ± 1,0 _c	26,3 ± 0,5 _a	20,5 ± 0,8 _a	23,2 ± 0,8 _a	21,3 ± 0,8 _a
<i>L. acidophilus</i> (CPB)	46,7 ± 1,0 _{bc}	28,5 ± 1,4 _b	26,3 ± 0,8 _{bc}	24,8 ± 0,8 _{ab}	24,8 ± 1,3 _b

Las cepas se analizaron en cuanto a sus capacidades de autoagregación y coagregación. Estas características están relacionadas con la adherencia de las cepas, tanto en sus capacidades para formar biopelículas (autoagregación) como en la adherencia a bacterias patógenas (coagregación) para interrumpir la colonización de patógenos. A pesar de que no coagregan tanto como las cepas control, al contrastar los resultados de

coagregación con los resultados de inhibición sobre patógenos, encontramos que las cepas potencialmente probióticas presentaron altos halos de inhibición sobre las cepas patógenas mayores de 2 cm, a pesar de que la coagregación no es alta (Tabla III).

Tabla III. Promedio del porcentaje de autoagregación y coagregación de las cepas potencialmente probióticas seleccionadas.

Cepas	% autoagreg. en 24 h	% coagreg. en 24 h				
		<i>C. perfringens</i>	ETEC	<i>E. coli</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> sp.
TUCO-16	30,39	14,3	26,82	14,03	26,39	18,63
TUCO-17	30,39	13,0	29,72	18,75	29,54	22,02
TUCO-4	20,00	14,7	22,81	13,27	29,24	22,68
<i>L. casei</i> Shirota	33,64	55,3	34,28	31,41	34,11	30,00
<i>L. acidophilus</i> (CPB)	52,47	33,0	33,49	27,88	40,57	17,79

También se analizaron según inocuidad presuntiva, en agar sangre de cordero para observación de hemólisis, gelatinasa para la observación de licuefacción de gelatina por gelatinasas, y también, sus perfiles de resistencia/susceptibilidad a antibióticos, utilizando sensidiscos de amikacina, amoxicilina, ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina, metronidazol, penicilina, tetraciclina y vancomicina en agar MRS. Ninguna cepa seleccionada presentó halo de hemólisis en agar sangre de cordero. Todas las cepas resultaron negativas para la prueba de gelatinasas. En general, presentaron perfiles de resistencia muy parecidos a CPB y todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina, eritromicina, penicilina y tetraciclina.

TABLA IV.: Inocuidad presuntiva de las cepas aisladas.

Cepas	Hemólisis	Gelatinasas	Resistencia	Sensibilidad
TUCO-16	-	-	AK, CN, MTZ, VA	AMX, E, PEN, TC
TUCO-17	-	-	AK, CN, MTZ, VA	AMX, E, PEN, TC
TUCO-4	-	-	AK, CIP, CN, MTZ, VA	AMX, E, PEN, TC
<i>L. casei Shirota</i>	-	-	AK, CIP, CN, MTZ, VA	AMX, E, PEN, TC
<i>L. acidophilus</i> (CPB)	-	-	AK, CIP, CN, MTZ, VA	AMX, E, PEN, TC

(-): reacción negativa, AK: amikacina; AMX: amoxicilina; CIP: ciprofloxacino; CN: gentamicina; E: eritromicina; MTZ: metronidazol; PEN: Penicilina; TC: Tetraciclina; VA: vancomicina.

Las cepas seleccionadas, con morfología bacilar y catalasa negativas fueron identificadas mediante PCR convencional para la determinación de género *Lactobacillus* utilizando los primers LbG (forward: 5' AGAAGAGGACAGTGGAAC, y reverse: 5' TTACAAACTCTCATGGTGTG). El ADN fue extraído según las indicaciones del proveedor del kit comercial Mo bio. Como control positivo se utilizó al probiótico comercial *Lacticaseibacillus casei* Shirota y como control negativo se utilizó la cepa *S. Aureus* ATCC 29213 (Singh and Ramesh, 2009). La identificación dio que las cepas TUCO-4, TUCO-16 y TUCO-17 como cepas del género *Lactobacillus*.

ANEXO 2: Consentimiento Informado.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

POR EL PRESENTE DOCUMENTO YO,.....
AUTORIZO A REALIZAR EL PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO PARA DIARREA AGUDA CANINA MEDIANTE EL PROYECTO “FORMULACIÓN PROBIÓTICA DERIVADA DE CEPAS NATIVAS DE PERRO USADA COMO COMPLEMENTO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES DE MASCOTAS” QUE CONSISTE EN LA ADMINISTRACIÓN DE UN PROBIÓTICO EXPERIMENTAL POR 10 DÍAS CON CONTROLES Y TOMA DE MUESTRA DE SANGRE LOS DÍAS 0, 5 Y 10 DEL TRATAMIENTO. EL INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO ES PAULA BULDRES INZUNZA, CONTACTO +56972752149.

NOMBRE DEL PACIENTE:

RAZA..... SEXO.....

1. DECLARO QUE LOS MEDICOS TRATANTES ME HAN EXPLICADO COMPLETAMENTE LA NATURALEZA Y FIN DEL PROCEDIMIENTO. TAMBIEN ME HAN INFORMADO DE LOS BENEFICIOS, COMPLICACIONES Y RIESGOS QUE SE PUEDAN PRODUCIR.
2. SI DURANTE LA HOSPITALIZACION Y/O PROCEDIMIENTO SE PRESENTASEN IMPREVISTOS QUE PUSIERAN EN PELIGRO LA VIDA DE MI MASCOTA, CONSIENTO EN LA REALIZACION DE LOS TRATAMIENTOS Y/O PROCEDIMIENTOS ADICIONALES QUE EL MEDICO ESTIME CONVENIENTE.
3. FINALMENTE, YO CONFIRMO TENER CONOCIMIENTO DE TODO LO ANTERIORMENTE EXPUESTO Y ME COMPROMETO A SEGUIR LA RECOMENDACIONES DE CUIDADOS PRE Y POST-TRATAMIENTO QUE SE ME HAN EXPLICADO.

FIRMA PROPIETARIO Y/O RESPONSABLE

R.U.T.

FECHA: