



Desarrollo de formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas del género *Lactobacillus* spp. aisladas previamente desde leche canina.

Hernández Balladares, Karolay Abigail

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Dra. Ramos Gómez Thelvia Isabel PhD.

04 de septiembre del 2023

Hoja de resultados de la herramienta de análisis Urkund



Hernández_Karolay_Documentofinal....

Scan details

Scan time: September 1th, 2023 at 21:4 UTC Total Pages: 48 Total Words: 11752

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.7%	85
Minor Changes	0%	1
Paraphrased	4.1%	480
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
 ● AI text
 ● Human text

🔍 Plagiarism Results: (19)

🌐 [munoz_vazquez_mariatfg.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/687917/...) 1.2%

<https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/687917/...>

María Muñoz Vázquez

RELACIÓN ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL, SALUD Y ALIMENTACIÓN EN
 RECÍEN NACIDOS RELATIONSHIP BETWEEN GUT MICROBIOTA, HEALTH AND...

🌐 [28915975.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/49018/28915...) 1.2%

<https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/49018/28915...>

UNIVERSIDAD DE GRANADA FACULTAD DE FARMACIA DEPARTAMENTO DE
 MICROBIOLOGÍA TESIS DOCTORAL ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO D...

🌐 [TUTORES:](https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/39...) 0.8%

<https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/39...>

a0

UNIVERSIDAD DE OVIEDO MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
 ALIMENTARIA "Respuesta del sistema inmune a bacterias probióticas"...

THELVIA
 ISABEL
 RAMOS
 GOMEZ

Firmado digitalmente por
 THELVIA ISABEL
 RAMOS GOMEZ
 Fecha:
 2023.09.01
 16:11:05 -05'00'



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas del género *Lactobacillus* spp. aisladas previamente desde leche canina”** fue realizado en su totalidad por la señorita **Karolay Abigail Hernández Balladares**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de agosto de 2023

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GOMEZ

Firmado
digitalmente por
THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha: 2023.09.01
15:57:47 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD.

C.I.: 1753960028



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Hernández Balladares Karolay Abigail**, con cédula de ciudadanía No 1752572923, declaro que el contenido, ideas y criterios del presente trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas del género *Lactobacillus* spp. aisladas previamente desde leche canina”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 30 de agosto de 2023

Karolay Abigail Hernández Balladares

C.I.: 1752572923



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Karolay Abigail Hernández Balladares, con cédula de ciudadanía No 1752572923, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas del género *Lactobacillus* spp. aisladas previamente desde leche canina”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de agosto de 2023

A handwritten signature in blue ink that reads 'Karolay'.

Karolay Abigail Hernández Balladares

C.C.: 1752572923

Dedicatoria

Dedico este trabajo como muestra de reconocimiento y agradecimiento.

A ustedes, la luz de mi vida, que tanto me han alentado y sacrificado por mí, con quienes comparto el vínculo más grande de amor fraternal: mis queridos padres.

A mis hermanas y mi hermano, por ayudarme cuando lo necesitaba y por ser la base de mi formación personal y profesional.

A mis sobrinas y mis sobrinos, por brindar tantas alegrías a mi vida. Desde que llegaron a mi vida no me he querido separar de ustedes.

A todos los que son queridos para mí.

A mi propio corazón valiente.

Karolay Abigail Hernández Balladares

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi gratitud a Dios por otorgarme la fuerza para sobrevivir a este camino llamado vida y también la valentía necesaria para superar todas las adversidades.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por el valioso conocimiento que obtuve a lo largo de estos años, ya que ha sido la piedra angular de mi carrera profesional. En especial a la Dra. Thelvia Ramos por ser mi directora de tesis, su apoyo fue fundamental para cumplir con este trabajo.

A la Universidad de Concepción, Chile, y en especial, al Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos (LBB) por permitirme realizar mi proyecto de titulación. De manera particular, al Dr. Jorge Toledo por la valiosa oportunidad de formar parte del laboratorio.

A mi tutor, Bq. Felipe Sandoval por su apoyo incondicional a lo largo de este proyecto. Su paciencia, empatía y actitud positiva fueron fundamentales durante mi estancia en la UdeC. Su increíble capacidad para resolver mis dudas ha marcado una diferencia significativa en mi vida y en el logro exitoso de esta tesis.

A mis estimados profes, Kari e Ing. Rafa, por su inquebrantable respaldo tanto en el ámbito académico como en el emocional a lo largo de mi trayectoria educativa. Los valoro enormemente y los considero no solo como guías, sino también como amigos de confianza.

A mis amados padres, Pepito y Margarita, por siempre confiar en mis sueños y permitirme seguir adelante durante todos estos años. Cada logro alcanzado se debe a su inquebrantable apoyo y trabajo. Su amor y confianza me dieron las alas para soñar y alcanzar mis metas.

A mis hermanos, Patty, Richi y Ambar, quienes siempre me han cuidado y protegido. Gracias por darme esperanzas en los días en los que no podía más. Su compañía y ayuda en cada noche de desvelo me permitieron seguir adelante.

A mis adorables sobrinos, quienes han brindado alegría a mis días y han sido una fuente constante de inspiración. Deseo llenar su vida de mucha paz y felicidad.

A Martha, quien hizo que mi tiempo lejos de casa sea más llevadero. Gracias por estar a mi lado cuando lo necesité, por cuidarme y por animarme a conocer Concepción. Los recuerdos en el laboratorio, los dulces y las risas compartidas quedarán grabados en mi corazón.

A todos mis queridos amigos, Jesús, Caro, Nadin, Uwe les agradezco por acompañarme en los momentos difíciles y por formar parte de mi vida universitaria. Trabajar con ustedes ha sido realmente increíble, aprendí mucho de cada uno.

Al team cáncer, mi Yerkito, María Paz, Marce, Javi y Félix, les agradezco por sacarme de la rutina cuando ya no podía más. Su amor, comprensión y ternura han sido un faro de luz en mi vida. Gracias por brindarme su compañía y tantos momentos inolvidables.

A mis queridos ecuatorianos, Carlita, Santy, Carlitos y Fer, les agradezco su cercanía y amistad, que me recordaron siempre el calor del hogar. Valoraré su cariño, apoyo y también, las comidas caseras compartidas.

A todos los que formaron parte de esta gran aventura, Brian, Estefi, Leo, Matheus, Thays y Mary, quiero expresar mi sincero agradecimiento por su apoyo inquebrantable a lo largo de este camino. En especial, a la Sra. Nancy, por cuidarme como una hija en la lejanía de mi casa.

Por último, pero no menos importante, a mí mismo, por la dedicación, esfuerzo y perseverancia que he puesto en cada paso de este viaje. Quiero agradecerme por no renunciar.

If you want it all, lay it on the line.

Karolay Abigail Hernández Balladares

Contenido

Listado de abreviaturas	15
Resumen	16
Abstract	17
Capítulo I: Introducción	18
Formulación del problema y antecedentes	18
Justificación e importancia.....	21
Objetivos.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Hipótesis	25
Capítulo II: Fundamentación teórica	26
Fundamentos de la microbiota intestinal canina.....	26
Canis lupus familiaris.....	26
Composición del microbioma canino	27
Metabolismo de los nutrientes en canes	29
Sistema inmunológico gastrointestinal en los canes	30
Enfermedades gastrointestinales en los canes	32
Probiótico.....	34
Definición	34
Historia.....	34

	10
Desarrollo de cepas probióticas	37
Identificación y caracterización de cepas probióticas en canes	37
Tecnologías de microencapsulación	39
Materiales de encapsulación.....	40
Mecanismo de acción de los probióticos	40
Capítulo III: Materiales y métodos	43
Materiales	43
Cepas bacterianas	43
Medio de cultivo para bacterias ácido-lácticas (BAL)	43
BAM R11 (Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water).....	44
Antrona 0.2% en ácido sulfúrico concentrado.....	44
Solución patrón de glucosa 100 mg/L.	44
Líneas celulares	44
Medio de cultivo celular.....	44
Metodología.....	45
Cinética de crecimiento de las cepas <i>Lactobacillus</i> spp.....	45
Preparación del cultivo bacteriano.....	45
Densidad óptica.....	46
Viabilidad celular.....	46
Determinación de biomasa	46

	11
Determinación del contenido de glucosa	47
Curva de estandarización DO vs UFC/mL.....	49
Encapsulación de las cepas probióticas.....	49
Liofilización (Secado por congelación).....	49
Viabilidad y estabilidad celular.	50
Caracterización biológica mediante ensayos <i>in vitro</i>	51
Ensayo de viabilidad celular	51
Ensayo de inmunomodulación en células DH82.....	52
Análisis estadístico	53
Capítulo IV: Resultados	55
Cinética de crecimiento de las cepas probióticas	55
Densidad óptica.....	55
Biomasa viable (UFC/mL)	57
Observación macroscópica.....	58
Correlación de UFC/mL y la DO _{600 nm}	58
Producción de biomasa (g/L) y consumo de glucosa (g/L)	59
Viabilidad y estabilidad celular de las cepas encapsuladas	61
Caracterización biológica de las cepas probióticas liofilizadas mediante ensayos <i>in vitro</i>	63
Análisis de citotoxicidad por ensayo colorimétrico MTT	63
Expresión de citoquinas	64

Capítulo V: Discusión.....	66
Capítulo VI: Conclusiones	74
Capítulo VII: Recomendaciones	75
Referencias.....	76
Apéndices.....	119

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Funciones generalizadas de los principales filos de la microbiota intestinal del perro</i>	28
Tabla 2. <i>Estudios de la microbiota intestinal canina relacionados con enfermedades gastrointestinales</i> .	33
Tabla 3. <i>Cepas bacterianas de origen animal utilizadas por sus propiedades probióticas en caninos</i>	38
Tabla 4. <i>Cepas bacterianas de origen no canino utilizadas por sus propiedades probióticas en caninos</i> ..	38
Tabla 5. <i>Composición del medio de cultivo para Lactobacilos. GranuCult™ de Man, Rogosa and Sharpe</i> .	43
Tabla 6. <i>Datos para la preparación de la curva de calibración de glucosa</i>	48
Tabla 7. <i>Preparación de las muestras obtenidas a partir del sobrenadante de los cultivos microbianos</i> ..	48
Tabla 8. <i>Cepas caninas liofilizadas con mejor rendimiento según el material de encapsulación</i>	49
Tabla 9. <i>Secuencias de partidores usados en RT-qPCR para la especie Canis lupus familiaris</i>	53
Tabla 10. <i>Condiciones utilizadas en el equipo para RT-qPCR</i>	53
Tabla 11. <i>Estructura morfológica de las colonias de las cepas de Lactobacillus spp. en agar MRS</i>	58
Tabla 12. <i>Condiciones iniciales de $DO_{600\text{ nm}}$, crecimiento microbiano y producción de biomasa a 16 h para la CEPA-16, CEPA-17 y TUCO-4</i>	61
Tabla 13. <i>Características de las microcápsulas post-liofilización para la CEPA-16, CEPA-17 y TUCO-4</i>	61
Tabla 14. <i>Recuento celular por siembra en agar MRS para análisis de estabilidad en tiempo real</i>	62
Tabla 15. <i>Recuento celular por siembra en agar MRS para análisis de estabilidad en condiciones aceleradas</i>	63

Índice de figuras

Figura 1. Sistema jerárquico de clasificación taxonómica de <i>Canis lupus familiaris</i>	26
Figura 2. Principales factores que influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal de los cachorros en crecimiento hasta la edad adulta	27
Figura 3. Interacciones entre los alimentos, el microbioma intestinal y las mascotas	29
Figura 4. Criterios de selección y propiedades requeridas en cepas probióticas	36
Figura 5. Vista esquemática de la interacción entre las células inmunitarias intestinales del huésped y los probióticos.	42
Figura 6. Representación esquemática de la prueba de cuantificación de glucosa consumida.	48
Figura 7. Curvas de crecimiento bacteriano de las tres cepas probióticas en medio MRS.	56
Figura 8. Concentración de células viables expresada en Log ₁₀ UFC/mL frente al tiempo. Curvas de crecimiento de la CEPA-16 (A), CEPA-17 (B) y TUCO-4 (C).	57
Figura 9. Correlación entre UFC/mL y la DO ₆₀₀ nm de la CEPA-16 (A), CEPA-17 (B) y TUCO-4 (C) en medio MRS.	59
Figura 10. Producción de biomasa (g/L) y consumo de glucosa (g/L) a lo largo del tiempo de la CEPA-16 (A), CEPA-17 (B) y TUCO-4 (C)	60
Figura 11. Tasas de viabilidad celular post-liofilización.	62
Figura 12. Estabilidad de las cepas liofilizadas durante 3 meses en almacenamiento a 25 y 37°C.	63
Figura 13. Ensayo de citotoxicidad en células caninas MDCK tratadas con las formulaciones probióticas microencapsuladas y los materiales de recubrimiento analizadas por MTT.	64
Figura 14. Expresión relativa de ARNm de citoquinas con relación a GAPDH en células DH82 tratadas con formulaciones probióticas.	65

Listado de abreviaturas

ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias Ácido-Lácticas
CMH II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
CPA	Células Presentadoras de Antígenos
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
MDCK	Células de riñón canino Madin-Darby
MKP1	Fosfatasa de la proteína cinasa activada por mitógenos tipo 1
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMAD	Patrones Moleculares Asociados a Daños
PMAP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción
TLRs	Receptores tipo toll
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

Resumen

La creciente popularidad de los canes como animales de compañía ha planteado desafíos relacionados con su salud, en particular con el equilibrio de su microbiota intestinal, que debe ser analizada desde su identidad biológica. Las alteraciones en la composición de la microbiota generan efectos adversos en la homeostasis de estos animales, siendo necesaria la investigación y aplicación de diversas estrategias terapéuticas, siendo los probióticos una de las más destacadas. El presente trabajo de investigación se dividió en tres etapas esenciales. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis exhaustivo de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas. Durante esta fase, se realizaron mediciones de la densidad óptica, la viabilidad celular, la biomasa seca y el contenido de glucosa a lo largo del proceso de crecimiento. La segunda etapa se centró en la encapsulación de las cepas probióticas mediante el proceso de liofilización, utilizando materiales de encapsulación específicos, en particular prebióticos. Esta estrategia se demuestra como un componente esencial para mejorar la supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento a largo plazo, garantizando su viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento. La tercera parte del estudio se enfocó en la caracterización biológica de las formulaciones probióticas microencapsuladas. Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para evaluar la viabilidad de estas formulaciones probióticas y su efecto inmunomodulador en líneas celulares MDCK y DH82, respectivamente. En conclusión, este estudio demostró que la liofilización de cepas de *Lactobacillus* spp. en fase estacionaria es una técnica viable para producir formulaciones probióticas con alta viabilidad y notable estabilidad durante el almacenamiento. A su vez, la caracterización biológica mostró un perfil prometedor en términos de seguridad y modulación de la respuesta inmunológica.

Palabras clave: cinética de crecimiento, liofilización, inmunomodulación

Abstract

The growing popularity of dogs as pets has posed challenges related to their health, particularly concerning the balance of their intestinal microbiota, which must be analyzed from their biological identity. Alterations in the microbiota composition have adverse effects on these animals' homeostasis, necessitating research and the application of various therapeutic strategies, with probiotics being one of the most prominent. This research was divided into three essential stages. Firstly, a comprehensive analysis of the growth kinetics of probiotic strains was conducted. During this phase, measurements of optical density, cell viability, dry biomass, and glucose content were taken throughout the growth process. The second stage focused on the encapsulation of probiotic strains through the lyophilization process, using specific encapsulation materials, particularly prebiotics. This strategy proved to be an essential component for enhancing the survival of probiotics during long-term storage, ensuring their viability and stability. The third part of the study centered on the biological characterization of microencapsulated probiotic formulations. *In vitro* assays were performed to assess the viability of these probiotic formulations and their immunomodulatory effect on MDCK and DH82 cell lines, respectively. In conclusion, this study demonstrated that the lyophilization of *Lactobacillus* spp. strains in stationary phase is a viable technique for producing probiotic formulations with high viability and remarkable stability during storage. Furthermore, biological characterization revealed a promising profile in terms of safety and modulation of the immune response.

Keywords: growth kinetics, lyophilization, immunomodulation

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema y antecedentes

Actualmente, la popularidad de los perros domésticos como animales de compañía es creciente, dada la influencia que ejercen en la vida de las personas (Grzeškowiak et al., 2015). En este contexto, surgen múltiples problemáticas asociadas a la salud de las mascotas, tales como el mantenimiento del equilibrio gastrointestinal, donde la microbiota juega un papel clave (Ley et al., 2008a). Con una población canina estimada en más de 500 millones en todo el planeta y teniendo en cuenta su relevancia en América Latina, ha surgido gran interés en explorar las especificidades del microbioma canino (Deschamps et al., 2022; López-Osorio et al., 2020; Y. Zhang et al., 2023). Aunque la domesticación ha aproximado a los perros con los seres humanos, estableciendo similitudes tanto intrínsecas como extrínsecas, no se descarta la necesidad de investigar la microbiota de los canes desde su propia identidad biológica (Hernandez et al., 2022). Se debe orientar el enfoque hacia el análisis de la microbiota intestinal del perro doméstico, *Canis lupus familiaris*, en lugar de considerarlo únicamente como un modelo de investigación, debido a su similitud con el sistema gastrointestinal humano (Grzeškowiak et al., 2015; Hernandez et al., 2022).

A pesar de que gran parte de la información acerca de la microbiota gastrointestinal canina proviene de estudios dirigidos a poblaciones humanas (García-Mazcorro & Minamoto, 2013), la comparación entre las comunidades microbianas de diferentes mamíferos ha revelado perfiles taxonómicos y funciones genéticas únicas (Karmacharya et al., 2019; Ley et al., 2008b). Cada especie se caracteriza por una notoria heterogeneidad en su diversidad y especialización microbiana (de Jonge et al., 2022; Dodd & Grueber, 2021; Levin et al., 2021). Además, se deben considerar ciertos parámetros fisicoquímicos y mecánicos que sustentan las funciones tróficas y protectoras en el sistema gastrointestinal (Deschamps et al., 2022; W. Lee & Hase, 2014).

La colonización del tracto gastrointestinal en los mamíferos por la microbiota intestinal es un proceso que se basa en la fisiología del hábitat y la promoción de su proliferación (Aggarwal et al., 2023; W. Lee & Hase, 2014). En equilibrio, el intestino alberga un rango de 10^{10} - 10^{14} células microbianas, aproximadamente 10 veces más que el propio número de células del huésped (Patel et al., 2018). Esta relación se desarrolla en un ambiente donde la mucosa intestinal permite la digestión y absorción de nutrientes obtenidos de la alimentación (Brown & Valiere, 2004). Además, proporciona una superficie para la interacción con enzimas digestivas que facilita la interacción entre los microorganismos colonizadores y las células inmunes en el epitelio intestinal (Hallen & Suhr, 2017; Hoegenauer et al., 2022; Moran et al., 2019). La importancia funcional de la microbiota intestinal en la salud del hospedante se asocia con su participación en procesos metabólicos, fisiológicos e inmunológicos que contribuyen a la homeostasis (Rampelli et al., 2021). Estos procesos internos abarcan desde la producción de metabolitos, que actúan como moléculas de señalización y sustratos para las reacciones metabólicas (Krautkramer et al., 2020), hasta la maduración del sistema inmunológico (Zheng et al., 2020) y la asimilación de nutrientes (Mondo et al., 2019).

Diversos autores afirman que la microbiota intestinal del can está compuesta por bacterias (Lau, 2023), arqueas (Hoegenauer et al., 2022), hongos (Hallen & Suhr, 2017), protozoos (Guzzo et al., 2022) y virus (Lecuit & Eloit, 2017). Mediante análisis metagenómicos se ha establecido que las bacterias son el grupo predominante y metabólicamente activo en el sistema gastrointestinal canino, representando un 98% del total de microorganismos presentes (Swanson et al., 2011). La distribución de la microbiota en el tracto gastrointestinal no es uniforme, ya que cada región presenta condiciones que influyen en la prevalencia y distribución de ciertas especies. Algunos de estos factores son la acidez gástrica, el perfil de ácidos biliares y la disponibilidad de oxígeno (Suchodolski et al., 2008). La diversidad bacteriana aumenta gradualmente desde el duodeno hasta el colon (Hernandez et al., 2022). Predominan los filos Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroides y Actinobacteria, aunque la prevalencia y abundancia de estos

filos varia en diferentes estudios (Coelho et al., 2018; Middelbos et al., 2010; Scarsella et al., 2020). La modificación de dicha comunidad microbiana se ha asociado con una serie de enfermedades, tanto sistémicas como localizadas, ya que puede actuar como un componente bidireccional, siendo el objetivo de las enfermedades o el factor desencadenante (Pilla & Suchodolski, 2021).

A medida que se profundiza en el estudio de la microbiota canina, se hace evidente que el desequilibrio en la composición de la microbiota, conocido como disbiosis, puede tener implicancias en la salud, debido a la desregulación de las actividades metabólicas, generando un impacto negativo en el bienestar del huésped (AlShawaqfeh et al., 2017; Degruittola et al., 2016; Pilla & Suchodolski, 2021). Este fenómeno no es aislado, sino más bien una condición influenciada por gran variedad de elementos internos y externos (Trujillo et al., 2022). Entre estos factores se encuentran la edad (Kubinyi et al., 2020; Masuoka et al., 2017), el sexo (Scarsella et al., 2022), la genética (Swanson & Schook, 2006), la dieta (Pilla & Suchodolski, 2021), el uso de fármacos (Bottero et al., 2022; Dandrieux et al., 2019), los componentes ambientales (Garrigues et al., 2022) e incluso, las interacciones sociales con los seres humanos (Stenger, 2023). La complejidad de estas interacciones simbióticas se manifiesta mediante las relaciones que van desde el comensalismo (Hooper & Gordon, 2001) y el mutualismo (Bäckhed et al., 2005), hasta el parasitismo (Schachter et al., 2020) y la patogenicidad (Davoodi & Foley, 2019).

La disbiosis intestinal, y su vínculo con diversas enfermedades, ha establecido una fuerte iniciativa para la búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas al restablecimiento de la microbiota (Hou et al., 2022; Markowiak-Kopeć & Ślizewska, 2020). Entre estos enfoques terapéuticos, se destaca el uso de antibióticos, que puede desencadenar resistencia antibiótica y la eliminación tanto de microorganismos patógenos como benéficos (Beaudoin et al., 2023; Bottero et al., 2022; Suchodolski, 2016). El trasplante de microbiota fecal facilita la transmisión de organismos patogénicos y la alteración impredecible de la microbiota (Flores, 2022; Tuniyazi et al., 2022). La modulación dietética, corresponde a una estrategia altamente individualizada (Perini et al., 2023; Rhimi et al., 2022). La administración de

probióticos, a pesar de su potencial benéfico, se ve limitada por los efectos variados en cada especie, enfatizando la necesidad de establecer tratamientos ajustados a las características de cada entidad biológica (Bastos et al., 2023; Colombo & Arena, 2016; Pelton, 2020; Schmitz & Suchodolski, 2016).

Estudios recientes indican que los probióticos poseen efectos beneficiosos en caninos con afecciones gastrointestinales, como la diarrea (Gómez-Gallego et al., 2016), el tránsito intestinal alterado (Tolbert et al., 2022) y la colitis ulcerosa (Ishii et al., 2022). La inhibición del crecimiento de patógenos ocurre a partir de diversos mecanismos como la competencia por nutrientes y sitios de adhesión en el epitelio intestinal, que corresponde a la actividad antagonista que permite la competencia entre los microorganismos probióticos y patógeno (Choi et al., 2018). Además, numerosas bacterias probióticas generan compuestos antimicrobianos, como ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y peróxido de hidrógeno, así como otros metabolitos, como las bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Hernández-González et al., 2021). Los probióticos pueden estimular la producción de citoquinas antiinflamatorias y reducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias, para la modulación de las vías de señalización inmunitaria (Fernández-Lázaro et al., 2023; Kwok et al., 2022).

En la actualidad, las cepas probióticas más estudiadas y comercializadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Salgado et al., 2019), aunque se han analizado otros microorganismos, como levaduras (Staniszewski & Kordowska-Wiater, 2021) y bacterias no lácticas (Ramos et al., 2022). De entre estos, el género *Lactobacillus*, bacterias grampositivas, destaca debido a su presencia natural en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y a su capacidad para mantener la homeostasis de funciones tróficas y protectoras en el huésped (Dempsey & Corr, 2022; W. Lee & Hase, 2014).

Justificación e importancia

Los canes son parte integral de las familias y la responsabilidad de garantizar su bienestar se transforma en un enfoque prioritario (Sivamaruthi et al., 2021). El estudio de la microbiota intestinal

canina y el potencial que tienen los probióticos en esta especie se encuentra en constante evolución (Bhogaju & Nahashon, 2022; Reid et al., 2003).

El desarrollo de probióticos para canes ha surgido como una herramienta prometedora, siendo considerado un tratamiento adyuvante en la prevención y el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Hou et al., 2022; Zuo & Siew, 2018). Los probióticos son microorganismos vivos beneficiosos en la salud del huésped, que al ser administrados en cantidades adecuadas facilitan el equilibrio microbiano en el sistema digestivo (FAO & WHO, 2001). Estos microorganismos beneficiosos ejercen sus efectos mediante mecanismos como la producción de péptidos antimicrobianos (Hernández-González et al., 2021), ácidos grasos (Hutchinson et al., 2020; Markowiak-Kopeć & Śliżewska, 2020) y la modulación de respuestas inmunitarias, que contribuyen en la estabilización de la microbiota alterada fortaleciendo la barrera intestinal y reduciendo la inflamación (Cayra et al., 2017; Pagnini et al., 2010; Pelton, 2020; Salavati, 2022).

La eficacia de los probióticos está influenciada por factores como las características de la cepa, la población de estudio, la dosis administrada e incluso, la fuente de los microorganismos (Kechagia et al., 2013; Kunes & Kvetina, 2016). En paralelo, es indispensable analizar la estabilidad y conservación de la actividad biológica de los probióticos después de someterse a procesos tecnológicos (Plaza-Díaz et al., 2018; Rajam & Subramanian, 2022). A pesar de su potencial terapéutico, el conocimiento actual sobre la microbiota intestinal canina es limitado (Cuscó et al., 2022), lo que ha llevado a la adopción de probióticos diseñados para humanos en la práctica veterinaria (Grzeškowiak et al., 2015). Esta adaptación se origina en la escasa información disponible sobre probióticos provenientes de fuentes caninas, impulsando así la necesidad de explorar alternativas dirigidas de manera objetiva (Martín et al., 2010).

En los últimos años, se ha reconocido a la leche materna canina como una fuente prometedora de bacterias probióticas (Lee et al., 2022; Martín et al., 2010), permitiendo el aislamiento de cepas

microbianas (Fernández et al., 2019). Es relevante destacar que la leche materna canina constituye una buena fuente de *Lactobacillus* y es responsable de la transmisión vertical de madre a cachorros, protegiéndolo de enfermedades infecciosas (Ge et al., 2021; Li et al., 2022; Matsumiya et al., 2002; Singh et al., 2023). Durante el periodo de lactancia, los cachorros adquieren nutrientes y protección contra enfermedades infecciosas debido a la acción combinada de los factores presentes en el calostro y la leche (Ge et al., 2021; Martín et al., 2010).

A pesar de estos avances, el análisis de la leche canina se ha centrado principalmente en estudios microbiológicos con el objetivo de aislar agentes causantes de enfermedades como la mastitis lactacional (Ververidis et al., 2007), la septicemia en neonatos (Schäfer et al., 2003), la enterocolitis necrosante (Reid et al., 2003) y la gastroenteritis (Montague et al., 2022). En este contexto, se han demostrado una alta incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales (Hill et al., 2014; Suchodolski, 2016), trastornos metabólicos (Durack & Lynch, 2019) y enfermedades autoinmunes (Miyachi et al., 2022). Esta conexión entre la leche materna y la transmisión de microorganismos mejorados en el sistema digestivo de los cachorros subraya la relevancia de los probióticos aislados de leche materna canina en el contexto del desarrollo temprano de la microbiota y la salud gastrointestinal en los perros (Jiménez et al., 2021; Martin et al., 2016; Zwitterink et al., 2017).

Se debe tener en cuenta que la supervivencia de los probióticos en condiciones intestinales tales como un pH ácido, la presencia de sales biliares y la degradación enzimática, es un aspecto determinante para su eficacia (Plaza-Díaz et al., 2019). Deben formularse probióticos que aseguren la ingesta de una cantidad adecuada de producto o concentración de consumo en el rango de 10^8 - 10^9 UFC/g, y en el intestino grueso mantengan la eficacia terapéutica en el intervalo de 10^6 - 10^7 UFC/g, considerando la disminución de la viabilidad celular durante el tránsito intestinal (Rajam & Subramanian, 2022).

Con el objetivo de fortalecer la resistencia de los microorganismos probióticos, se han desarrollado estrategias de encapsulación como la pulverización, liofilización, extrusión, emulsificación,

entre otras técnicas que permiten capturar las células en el material encapsulación (Burgain et al., 2011; F. J. Rodrigues et al., 2020). Sin embargo, el secado por liofilización y pulverización han demostrado eficacia en la obtención de formulaciones comerciales (Burgain et al., 2011; Rajam & Subramanian, 2022). Estudios previos han señalado que la liofilización mejora la viabilidad de los probióticos debido a la aplicación de bajas temperaturas en la encapsulación de bioactivos sensibles al calor (Misra et al., 2023).

La investigación en el ámbito de los animales de compañía, en lo que respecta a la respuesta de la microbiota intestinal canina, hasta el momento ha sido limitada (Kelley et al., 2009; Morelli et al., 2022). Esta falta de información plantea un desafío, ya que la mayoría de las cepas probióticas comerciales para perros no tienen un origen canino, y en muchos casos, los productos se identifican solo por género y especie, sin especificar la cepa en particular (Kelley et al., 2009; Schmitz & Suchodolski, 2016). Resulta fundamental abordar este vacío de conocimiento, a través del desarrollo de formulaciones probióticas basadas en cepas aisladas a partir de leche canina, debido a que, el manejo de información precisa permitiría a los veterinarios seleccionar cada producto probiótico con miras a atender condiciones médicas particulares, en virtud de los efectos que exhibe cada cepa probiótica (Ibnou-Zekri et al., 2003). Por tal motivo el propósito de este trabajo investigativo es desarrollar formulaciones probióticas basadas en cepas previamente aisladas a partir de calostro y leche canina.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas del género *Lactobacillus* spp. aisladas previamente desde leche canina.

Objetivos específicos

Evaluar la viabilidad de las formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas de *Lactobacillus* spp. encapsuladas por liofilización.

Analizar los efectos citotóxicos de las formulaciones probióticas encapsuladas en la línea celular MDCK mediante el ensayo colorimétrico MTT.

Cuantificar la expresión de citoquinas proinflamatorias y de regulación negativa en células DH82 tratadas con las formulaciones probióticas encapsuladas mediante RT-qPCR.

Hipótesis

Las formulaciones con propiedades probióticas encapsuladas modulan positivamente la respuesta inmune en la línea celular DH82 de macrófagos caninos.

Capítulo II: Fundamentación teórica

Fundamentos de la microbiota intestinal canina

Canis lupus familiaris

El perro doméstico (*Canis lupus familiaris* L., 1758) miembro de la familia Canidae (Ostrander & Wayne, 2001), se encuentra dentro del orden Carnívora, lo que indica la adaptación evolutiva de su tracto gastrointestinal a una dieta predominante carnívora (Schmitt et al., 2015). En términos de taxonomía (Figura 1), desde 1993 se ha clasificado como *Canis lupus familiaris*, aunque todavía se utiliza comúnmente *Canis familiaris* (Perri, 2014). Esta especie abarca alrededor de 800 razas con variaciones de tamaño y morfología (Quiñonez et al., 2021). A pesar de que los perros exhiban una amplia gama de características, según análisis genéticos y paleontológicos se considera que su ancestro salvaje es el lobo (*Canis lupus*) (Fornai et al., 2023). Además, los perros representan el primer caso de domesticación, proceso que data de al menos 15.000 años atrás (Regan, 2016).

Figura 1.

Sistema jerárquico de clasificación taxonómica de *Canis lupus familiaris*



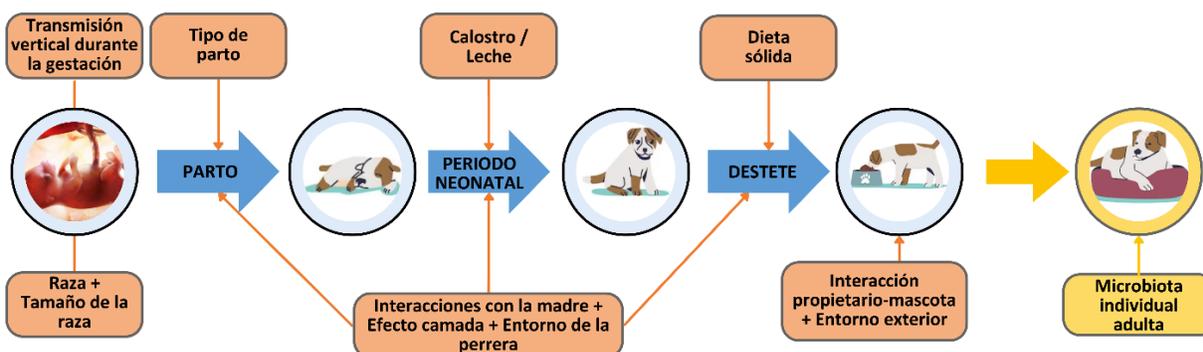
Nota: Adaptado de Ostrander & Wayne (2001); Schoch et al. (2020)

Composición del microbioma canino

El microbioma intestinal canino es una comunidad microbiana compleja, coloniza su hábitat en el entorno del tracto gastrointestinal canino (Z. Huang et al., 2020). Se destaca la importancia de estos microorganismos en la salud y bienestar de los perros (Sivamaruthi et al., 2021), siendo su filogenia el resultado de la interacción entre múltiples factores, incluyendo la genética, la dieta y las condiciones ambientales (Coelho et al., 2018; Ericsson, 2019). Es visible que la microbiota intestinal de los cachorros sufre cambios dinámicos en sus primeros años de vida, influidos por la transmisión vertical (Rota et al., 2021), tipo de nacimiento (Dominguez-Bello et al., 2010) y la dieta temprana (Figura 2) (Kajdič et al., 2021; Zakošek Pipan et al., 2020). Estos factores establecen patrones de colonización microbiana que afectarán la salud y el desarrollo de los perros a largo plazo (Blake et al., 2020; Tal et al., 2021).

Figura 2.

Principales factores que influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal de los cachorros en crecimiento hasta la edad adulta



Nota: Adaptado de Garrigues et al. (2022)

Durante la domesticación los perros evolucionaron de una dieta carnívora estricta a una omnívora más rica en fibra y almidón (Botigué et al., 2017). Estos cambios ecológicos han influido en la composición microbiana intestinal entre los canes domesticados y sus contrapartes salvajes (Reese et al., 2021). Sin embargo, se ha planteado la existencia de una microbiota central que, mediante el análisis de muestras fecales, ha revelado la presencia de ciertas especies bacterianas en perros sanos (Hand et al.,

2013). Las abundancias de los diferentes taxones experimentan variaciones a lo largo del sistema digestivo (Honneffer et al., 2017), también, durante el crecimiento de los cachorros, ya que el tracto gastrointestinal gana fuerza y resistencia frente a las amenazas ambientales (Guard et al., 2017). Es posible manejar un perfil bacteriano base compuesto por cinco filos principales: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, y Actinobacteria (Tabla 1) (Garrigues et al., 2022).

Tabla 1.

Funciones generalizadas de los principales filos de la microbiota intestinal del perro

Filo	Géneros principales	Funciones generalizadas en el intestino	Referencias
Firmicutes	<i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Ruminococcus</i>	Intervienen en la producción de metabolitos como ácidos biliares secundarios, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a través de la fermentación de carbohidratos.	(Handl et al., 2011; Rivera et al., 2016)
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Prevotella</i>	Tienen funciones similares a las de Firmicutes, consumiendo fibras dietéticas y polisacáridos complejos para generar metabolitos como ácidos biliares, butirato, vitaminas y AGCC.	(Renzi et al., 2015; Wexler & Goodman, 2017)
Proteobacteria	<i>Escherichia</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Proteo</i>	Su función principal parece ser mantener un ambiente anaeróbico en el intestino, algunas proteobacterias pueden inducir disbiosis, especialmente en presencia de patógenos.	(Moon et al., 2018)
Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i> , <i>Cetobacterium</i> , <i>Streptobacillus</i>	A pesar de que su función en perros aún no está completamente descrita, se ha observado en perros obesos. Además, parecen estar involucradas en la degradación de proteínas y aminoácidos.	(Chun et al., 2020; Doron et al., 2014)
Actinobacteria	<i>Bifidobacteria</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Collinsella</i>	Participan en la degradación de oligosacáridos de la leche para producir lactato y acetato. También se asocian con la producción de AGCC como fuente energética, por su presencia en canes obesos.	(Alipour et al., 2018; I. W. You & Kim, 2021)

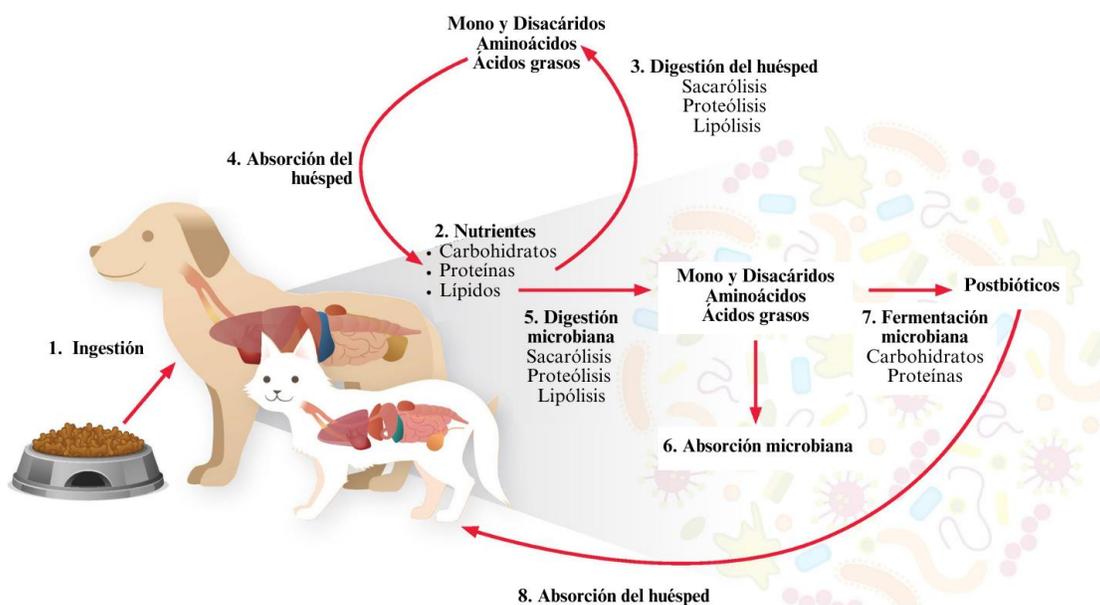
Nota: Adaptado de Garrigues et al. (2022)

Metabolismo de los nutrientes en canes

La relación entre la composición de la dieta canina y la microbiota intestinal es de vital importancia en la fisiología digestiva (Blake & Suchodolski, 2016). Diferentes especies bacterianas desempeñan funciones específicas en este proceso, fermentando diversos tipos de fibra y carbohidratos, mientras que otras se destacan por su capacidad proteolítica (Pilla & Suchodolski, 2021). Es relevante considerar que los cambios en la dieta que afecten la disponibilidad de estos sustratos en el intestino pueden inducir alteraciones temporales en el microbioma (Leeming et al., 2019). Además, el metabolismo energético es esencial para la generación de energía (ATP, adenosín trifosfato) a partir de nutrientes e implica diversos procesos como la respiración aeróbica (presencia de oxígeno), la respiración anaeróbica (fermentación) y el metabolismo de ácidos grasos y los aminoácidos (J. Wang et al., 2022). Aunque el enfoque se basa en el metabolismo de los macronutrientes, en relación a la microbiota del huésped, es relevante enfatizar que también desempeña un papel sustancial el metabolismo del carbono y la disponibilidad de vitaminas (Figura 3) (Krautkramer et al., 2020).

Figura 3.

Interacciones entre los alimentos, el microbioma intestinal y las mascotas



Nota: Adaptado de Wernimont et al. (2020).

Sistema inmunológico gastrointestinal en los canes

El sistema inmunitario está compuesto por un conjunto de células, sustancias químicas y procesos que funcionan para proteger el tracto intestinal de antígenos extraños (Marshall et al., 2018). El intestino no debe ser considerado como un solo órgano uniforme, sino como una colección de segmentos anatómicos funcionalmente especializados (Mowat & Agace, 2014). Según lo descrito por Day (2011), el intestino contiene tres compartimentos inmunológicos distintos: las estructuras linfoides organizadas, la lámina intestinal propia y el compartimento epitelial.

Estructuras linfoides organizadas. El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) corresponde a una fuente masiva de células T y B que migran a los sitios efectoros para inducir respuestas inmunitarias (Donaldson et al., 2015). Este tejido abarca sitios inductivos esenciales para activar las respuestas inmunológicas como los ganglios mesentéricos y otras estructuras linfoides, como las placas de Peyer (Bernier-Latmani & Petrova, 2017; Mysore et al., 2023; Nikolakis et al., 2022). La colaboración entre estos tejidos y el epitelio asociado a folículos que contiene células especializadas (M) es fundamental para llevar a cabo el transporte, procesamiento y presentación de antígenos extraños, así como la inducción local y la expansión de linfocitos efectoros específicos de antígeno (Mörbe et al., 2021; Ou et al., 2022; Zhao et al., 2018). Tras la activación, estos linfocitos específicos experimentan un ciclo de recirculación y reclutamiento, que los devuelve a la lámina propia intestinal a través de la interacción entre receptores intestinales (P. Li et al., 2022; Stokes & Waly, 2006; Warren & Yates, 2020).

Lámina intestinal propia. Es rica en linfocitos individuales dispersos, células plasmáticas y células presentadoras de antígenos (CPA) como macrófagos y células dendríticas, además de eosinófilos y mastocitos ocasionales (Maheshwari, 2022). La lámina propia se considera el principal sitio efector de las células inmunitarias intestinales (Newberry & Gustafsson, 2016), y se ha sugerido que los microorganismos comensales desempeñan un papel importante en la activación y reclutamiento de linfocitos T (células efectoras) en este compartimento (Day, 2011; La Fata et al., 2018).

Compartimento epitelial (tejido linfoide asociado al intestino). Constituye el componente inmunitario más grande del cuerpo, en virtud de la dimensión del tejido compuesto por células epiteliales intestinales (enterocitos, células de Paneth, células caliciformes, células enteroendocrinas) y linfocitos intraepiteliales (Laukoetter et al., 2008; Vitale et al., 2016). Los enterocitos se consideraban únicamente células absorbentes, estableciendo una barrera física entre el lumen intestinal y la lámina propia (Ristivojević et al., 2021; Silva-Sanchez & Randall, 2020). Dado que constituyen la fracción celular más predominante (80% del total de células epiteliales) (Demers-Mathieu, 2022), estos enterocitos poseen la capacidad de expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II) y actúan como células presentadoras de antígenos (CPA), capaces de activar linfocitos T CD4+ (Brabec et al., 2022).

Estos tres compartimentos permiten una respuesta inmunológica coordinada y eficaz en el intestino, donde la inmunidad innata y adaptativa trabajan en conjunto para mantener la integridad y la protección del sistema gastrointestinal (Feng & Elson, 2011). Una amplia gama de señales exógenas (patrones moleculares asociados a patógenos, PMAP) y endógenas (patrones moleculares asociados a daños, PMAD) pueden activar las células endoteliales y las células dendríticas, al unirse a los receptores tipo toll (TLR) (Goulopoulou et al., 2016).

La inflamación de los tejidos se produce por la acción conjunta de las células inmunitarias innatas y adaptativas (Ito et al., 2013). Las células inmunitarias innatas activadas contribuyen a la inflamación de los tejidos mediante la secreción de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yang et al., 2014). Junto con estas respuestas innatas, se da la infiltración de células inmunitarias adaptativas que transmiten respuestas inmunitarias específicas de antígeno (L. Sun et al., 2020). Después del contacto directo con las células presentadoras de antígeno (CPA), las células T auxiliares CD4+ se diferencian en células efectoras T auxiliares (Th), Th1 y Th2 (C. Dong & Flavell, 2000; Zhu & Zhu, 2020).

Las células Th1 median una respuesta inmunitaria celular a partir de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-2) capaces de estimular macrófagos, células NK y células T citotóxicas CD8+ contra patógenos intracelulares (Fajgenbaum & June, 2020). Mientras que las células Th2 suelen sintetizar citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10) o pluripotenciales (IL-6) que favorecen la activación de células B y regulan las respuestas inmunitarias humorales (Kaiko et al., 2008; Ridyard et al., 2002). A partir de estudios moleculares, se ha caracterizado la expresión del ARNm que codifica una serie de citoquinas y quimiocinas en la mucosa intestinal canina, profundizando en la comprensión de estos procesos (Konstantinidis et al., 2021). Esta interacción entre células inmunitarias innatas y adaptativas, junto con la producción de mediadores proinflamatorios y reguladores, contribuyen a la regulación y mantenimiento de respuestas inmunitarias y homeostasis de tejidos (Iwasaki & Medzhitov, 2015; L. Sun et al., 2020).

Enfermedades gastrointestinales en los canes

El desequilibrio de la microbiota intestinal canina se asocia con trastornos gastrointestinales (Guard et al., 2015), enfermedades metabólicas (Degruttola et al., 2016) y enfermedades autoinmunes (Garrigues et al., 2022; Larsen et al., 2010). La prevalencia de estas patologías se atribuye a la mayor densidad de tejido inmunológico en el tracto gastrointestinal en comparación con otras regiones del cuerpo (Eissa et al., 2019; Soontarak et al., 2019). Además, la expresión clínica de cada enfermedad está influenciada por una serie de factores condicionales, entre los cuales destaca la alteración de la microbiota como un elemento clave (Drossman, 2016). La disbiosis puede aparecer como cambios en la composición de bacterias presentes en el lumen o adheridas a la mucosa y el deterioro de la función de la microbiota, resultando en vías metabólicas alteradas (Tabla 2 (Degruttola et al., 2016; Ziese & Suchodolski, 2021).

Tabla 2.

Estudios de la microbiota intestinal canina relacionados con enfermedades gastrointestinales

Filo	Alteraciones de las enfermedades gastrointestinales	
IBD	Microbioma	↑ Fusobacteria, <i>Faecalibacterium</i> spp. ↑ Gammaproteobacteria ↓ Erysipelotrichia, Clostridia, Bacteroidia
	Metabolitos fecales:	↑ 3-hidroxiisovalerilcarnitina + isovalerilcarnitina / leucina ↓ Acilcarnitinas de cadena corta a carnitina libre
	Metabolitos séricos:	↑ Valina ↓ Cirtulina, folato ↑ 3-hidroxi butirato, ácido hexurónico, ribosa, lactona de ácido glucónico
CE	Microbioma	↑ <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> ↓ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Blautia</i> spp., <i>Clostridium hiranonis</i> , <i>Faecalibacterium</i> spp., <i>Turicibacter</i> spp.
	Metabolitos fecales:	↑ SCFA totales ↑ acetato, propionato
NHD	Microbioma	↓ Ruminococcaceae, <i>Blautia</i> spp.
AHD	Microbioma	↑ <i>Sutterella</i> , <i>Clostridium perfringes</i> ↓ <i>Blautia</i> , Ruminococcaceae, <i>Faecalibacterium</i> , <i>Turibacter</i> spp. ↓ Ruminococcaceae
	Metabolitos fecales:	↑ Calprotectina, S100A12, Inhibidor de α 1-proteinasa
AD	Microbioma	↑ <i>Clostridium</i> ↓ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Faecalibacterium</i> , Ruminococcaceae
	Metabolitos fecales:	↓ ácido propiónico
	Metabolitos séricos:	↓ Ácido quinurénico, proporciones de quinurénico a triptófano

Nota: ↑: aumento ↓: disminución; EI: enfermedad inflamatoria intestinal; EC: enteropatía crónica;

DNH: diarrea aguda no hemorrágica; DHA: diarrea aguda hemorrágica; DA: diarrea aguda (tanto DNH como DHA combinadas). Adaptado de Huang et al. (2020)

Los tipos de tratamiento que se utilizan para las enfermedades gastrointestinales en canes incluyen: uso de medicamentos, modulación dietética y trasplante de microbiota fecal. El uso de medicamentos, principalmente antibióticos actúa reduciendo la carga bacteriana total mediante la supresión de la estimulación inmunitaria y la conversión de metabolitos tóxicos (Minamoto et al., 2014; Suchodolski et al., 2012). Este tratamiento provoca a largo plazo cambios en la composición de la

microbiota y riesgo de resistencia a los antimicrobianos (Ziese & Suchodolski, 2021). La modificación de la dieta reduce el almacenamiento de sustrato no digerible en el lumen intestinal (Bresciani et al., 2018; S. Wang et al., 2019). Este procedimiento es individualizado y puede presentar efectos secundarios en el caso de hipersensibilidad alimentaria o de alimentos difíciles de digerir (Ziese & Suchodolski, 2021). A su vez, la reconstrucción de la composición microbiana mediante el trasplante de microbiota fecal puede incurrir en infecciones, diarrea, flatulencia, distensión abdominal, fiebre y vómito (Kao et al., 2017; F. Zhang et al., 2018).

Las prácticas estándar actuales a menudo sufren de inestabilidad metabólica y dan como consecuencia, resultados terapéuticos insatisfactorios (Cao et al., 2023). El uso de probióticos ha ganado notoriedad, ya que, según las cepas utilizadas y la dosis, pueden mejorar la función de barrera intestinal, actuar como inmunomoduladores e incluso, ser agentes antimicrobianos (La Fata et al., 2018; Salavati, 2022).

Probiótico

Definición

Según la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados de manera adecuada ejercen una influencia positiva sobre la salud del organismo (Hill et al., 2014). Son microorganismos viables que permiten equilibrar la microbiota intestinal y promover el bienestar del huésped (Das et al., 2022; Gilliland, 2003; Purdel et al., 2023). Etimológicamente, la expresión “probiótico” se compone de la preposición latina pro (“para”) y el adjetivo griego βιωτικός (biotico, “biótico”), derivado del sustantivo, βίος (bios, “vida”) (Aspri et al., 2020; Cuervo-Zanatta et al., 2021; Hamilton-Miller et al., 2003).

Historia

A lo largo de los años, la fermentación se ha considerado un método para la conservación de alimentos debido a que la actividad metabólica de los microorganismos que resulta en la generación de

ácidos orgánicos, alcoholes, bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos (Marco et al., 2021). En este contexto, los organismos asociados a este proceso superan a los posibles patógenos, favoreciendo la seguridad y estabilidad de los alimentos (Anyogu et al., 2021). Esta circunstancia, ha facilitado la presencia natural de probióticos en alimentos sometidos a fermentación como el yogur, el pan, el queso, el chucrut y el kimchi (Rezac et al., 2018; Shah et al., 2023). Se presume incluso que, durante la revolución neolítica, la transición de las comunidades de cazadores-recolectores hacia comunidades agrícolas sedentarias estuvo acompañada por la incorporación de alimentos y bebidas fermentadas (Dominy, 2015; Sibbesson, 2019). A su vez, en épocas históricas antiguas, como en las culturas griegas y romanas, se consideró los beneficios derivados del consumo de estos alimentos fermentados (Tortora et al., 2010).

Para 1905, se aisló el primer microorganismo capaz de transformar la leche en yogur mediante fermentación, este recibió el nombre de *Lactobacillus bulgaricus*, debido a su presencia en yogures originarios de Bulgaria (Stoilova, 2011). Sin embargo, fue Metchnikoff (1907) quien estableció la relación entre los microbios de alimentos fermentados y su influencia en la modificación de la microbiota del cuerpo humano, sugiriendo que aportaba beneficios en términos de longevidad (Brown & Valiere, 2004). Recién en 1965, se acuñó el término “probióticos” para representar las sustancias que un organismo secreta para estimular el crecimiento de otro (Anukam & Reid, 2007; Kemgang et al., 2014). Tras nueve años, Parker (1974) postuló la definición de probióticos como agentes que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. Quince años después, Fuller (1989) propuso que los probióticos eran suplementos microbianos que ejercen efectos beneficiosos al mejorar el equilibrio microbiano del huésped. Posteriormente, Salminen y colaboradores (1998) los describieron como alimentos que contienen bacterias vivas con beneficios para la salud.

La creciente popularidad de los probióticos impulsó a la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) a adoptar una

definición consensuada de los probióticos, según la cual son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped (FAO/WHO, 2006). Esta definición ampliamente aceptada y utilizada abarca todas las aplicaciones de los microorganismos vivos en este contexto (Anukam & Reid, 2007). Para que un microorganismo sea reconocido como probiótico, es indispensable que cuente con ciertos parámetros básicos: seguridad, funcionalidad y utilidad tecnológica (Figura 4) (Kunes & Kvetina, 2016; Markowiak & Ślizewska, 2018).

Figura 4.

Criterios de selección y propiedades requeridas en cepas probióticas



Nota. Adaptado de Kunes & Kvetina (2016); Markowiak & Ślizewska (2018).

Desarrollo de cepas probióticas

Identificación y caracterización de cepas probióticas en canes

La similitud estructural y funcional entre el microbioma canino y humano ha posibilitado la obtención de terapias en ambos grupos, ya que los estudios en perros pueden prever resultados en humanos u otras especies, y viceversa (Coelho et al., 2018; Ericsson, 2019; Hernandez et al., 2022). A medida que se intensifica el análisis de probióticos específicos para canes, resulta importante la selección minuciosa de cepas que cumplan con criterios, como la capacidad de establecer una interacción beneficiosa con el huésped canino (Fathima et al., 2022; Van Immerseel et al., 2004). En el campo de la salud y nutrición animal, ha sido de gran interés el uso de técnicas para la identificación y caracterización de cepas, que incluyen la evaluación de sus propiedades metabólicas y su capacidad para modular la respuesta inmune (Pickard et al., 2017). Sin embargo, en la actualidad aún se discuten las propiedades inmunomoduladoras de los probióticos, y este aspecto se explora a través de diversos modelos de investigación, como líneas celulares, modelos animales e incluso, modelos matemáticos (Jakubczyk et al., 2020; Rehman et al., 2012). En las tablas 3 y 4 se muestran distintas cepas bacterianas tanto de origen canino como no canino que se utilizan como probióticos para caninos (Lee et al., 2022a).

Dado que los microorganismos probióticos son altamente susceptibles a las condiciones del entorno, la evaluación de su estabilidad es una etapa esencial para establecer los parámetros necesarios en cuanto a su producción y almacenamiento (Manojlović et al., 2010; Zuidam & Nedović, 2010). La eficiencia de los probióticos está sujeta a una variedad de factores, incluyendo el género, la especie, el biotipo de la cepa, la formulación, el estrés ambiental (oxidación, reducción, temperatura, humedad, pH, presión osmótica y niveles de oxígeno) y estabilidad en fluidos biológicos (Baral et al., 2021). Es esencial someter una cepa probiótica a pruebas exhaustivas que abarquen las condiciones de crecimiento durante la fermentación, condiciones de recolección y las condiciones de congelación (Ranadheera et al., 2017; G. Q. Wang et al., 2020).

Tabla 3.

Cepas bacterianas de origen animal utilizadas por sus propiedades probióticas en caninos

Cepas bacterianas	Fuente	Evaluación de	Resultado	Referencia
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CPN23	Canina	Digestibilidad de los nutrientes y de los metabolitos fermentativos fecales	Aumento de la digestibilidad de la fibra bruta. Aumento de las concentraciones de AGCC en las heces. Reducción de la concentración de amoníaco fecal.	(S. Kumar et al., 2017)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CCM 7421	Canina	Muestras de sangre y composición del microbioma fecal	Aumento de la población de bacterias lácticas y disminución de géneros bacterianos gramnegativos. Modulación de las heces líquidas a una consistencia normal (perros con diarrea)	(Strompfová et al., 2017)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CPN23	Canina	Perfil de la muestra de sangre	Disminución del nivel plasmático de glucosa y colesterol.	(S. Kumar et al., 2016)

Nota: Adaptado de Lee et al. (2022)

Tabla 4.

Cepas bacterianas de origen no canino utilizadas por sus propiedades probióticas en caninos

Cepas bacterianas	Fuente	Evaluación de	Resultado	Referencia
<i>Lactobacillus acidophilus</i> D2/CSL	Tracto gastrointestinal (GI) de un pollo adulto sano	Estado nutricional y fecal	Puntuación de la condición corporal superior a la del grupo de control. Efecto positivo en la consistencia fecal.	(Marelli et al., 2020)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Heces de un bebé sano amamantado	Efecto de la administración de metronidazol con <i>Enterococcus faecium</i> SF68 para tratar la diarrea	La terapia dual que administra metronidazol con <i>Enterococcus faecium</i> SF68 mejoró la salud de los perros con diarrea.	(Fenimore et al., 2017)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Heces de un bebé sano amamantado	Perfil de la muestra de sangre	La concentración media de colesterol disminuyó y la concentración de triglicéridos aumentó	(Lucena et al., 2019)

Nota: Adaptado de Lee et al. (2022)

Tecnologías de microencapsulación

La microencapsulación proporciona una protección completa y una notoria eficacia para que los probióticos superen los desafíos durante su procesamiento y su tránsito por el entorno gástrico (Coelho et al., 2018). Las prácticas bien desarrolladas y establecidas de microencapsulación involucran el secado por aspersión y la liofilización (Krokida, 2017).

Secado por aspersión. El proceso involucra la atomización de un líquido en forma de gotas, las cuales experimentan una rápida pérdida de humedad y se deshidratan al entrar en contacto con una corriente de gas caliente (Saleem et al., 2017). La viabilidad de los probióticos está influida por la temperatura del proceso y el tiempo de residencia, pero estos factores no se pueden alcanzar al mismo tiempo facilitando la supervivencia de microorganismos (Fu et al., 2018). Por ende, las altas temperaturas y velocidades de secado no permiten la adecuada encapsulación de sustancias bioactivas sensibles a la temperatura (D. Zhang et al., 2018).

Liofilización. También conocido como secado por congelación, es un método que comprende tres etapas: la congelación, que es el paso crítico para mantener la viabilidad bacteriana durante el proceso; la sublimación al vacío (secado primario) después de lo cual se eleva la temperatura para desorber el agua descongelada (secado secundario) (Merivaara et al., 2021). Los daños celulares producidos durante la congelación dependen netamente de la cinética de enfriamiento, y esta variable puede ser gestionada durante el tratamiento de la muestra, evitando el estrés intracelular por la pérdida de agua (Bodzen et al., 2021). La liofilización se define como un proceso que convierte la humedad de la muestra en hielo y permite que el agua se sublime de un estado sólido a un estado gaseoso en condiciones de vacío, para lograr el propósito de deshidratación, que es la tecnología de microencapsulación más utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica (W. Sun et al., 2023). Las ventajas de la liofilización son que se lleva a cabo a bajas temperaturas, se procesa al vacío y tiene una

alta capacidad de movimiento del agua, lo que puede evadir el daño por calor y evitar la toxicidad del oxígeno, lo que resulta en una vida útil más larga (Moayyedi et al., 2018).

Materiales de encapsulación

Para facilitar la supervivencia de las células durante el secado, es crucial el tratamiento previo de las células (Wessman et al., 2013). La formulación forma una matriz que incrusta las células y las protege de tensiones perjudiciales impuestas sobre los microorganismos durante el proceso (Grumet et al., 2020a). Diversos tipos de recubrimiento han sido empleados en el proceso de microencapsulación; sin embargo, los más destacados son las microcápsulas con revestimientos a base de carbohidratos y proteínas (Kowalska et al., 2022). Sin embargo, ha surgido un enfoque alternativo de coencapsulación de probióticos con prebióticos para mejorar su administración y liberación en el intestino huésped (Rashidinejad et al., 2020).

Prebióticos. Según Kumar y colaboradores (2018) son sustratos que resisten la hidrólisis y pueden adsorberse en el tracto gastrointestinal. Actúan como sustrato selectivo para la fermentación de bacterias benéficas induciendo de este modo cambios en la composición de la microflora colónica, con el objetivo de promover un ambiente intestinal más saludable, y proporcionando ventajas para la salud del huésped. Yeo & Liong (2010) describen el aumento de la viabilidad de las cepas probióticas y la producción de galactosidasa mediante la suplementación de fructooligosacáridos (FOS), inulina y maltrodextrina. Además, estos hidratos de carbono tienen la capacidad de actuar como criopreservantes (Oluwatosin et al., 2022).

Mecanismo de acción de los probióticos

A pesar del creciente uso de probióticos y prebióticos para caninos, se ha realizado un número limitado de investigaciones que evalúen la interacción compleja entre los microorganismos benéficos y las células del sistema gastrointestinal canino (Schmitz & Suchodolski, 2016). La comprensión de los

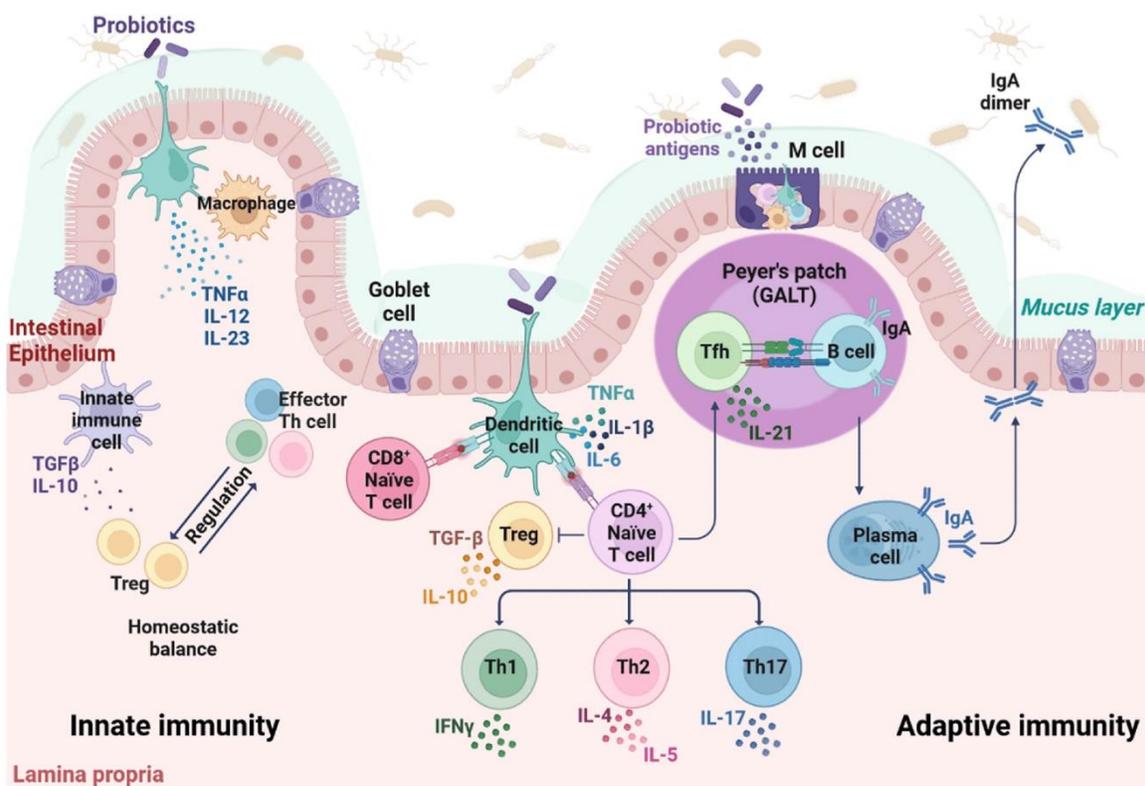
mecanismos de acción de los probióticos varía según la cepa y ha evolucionado mediante la exploración y análisis de múltiples especies (Plaza-Díaz et al., 2019).

Para Mazziotta et al. (2023), los probióticos ejercen una función esencial en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del huésped, a través de la modulación de los principales agentes inmunitarios como las células dendríticas (CD), los macrófagos y los linfocitos B y T. Estas interacciones se producen predominantemente en la superficie entre las células inmunitarias intestinales del huésped y los probióticos. Estas interacciones tienen lugar principalmente en la interfaz de la barrera intestinal que abarca el epitelio intestinal y la lámina propia subyacente. El epitelio intestinal está envuelto por una capa de moco, secretada por células caliciformes, que separa la microbiota intestinal del epitelio. Tras su consumo, las bacterias probióticas se adhieren a las células epiteliales intestinales y desencadenan su activación a través de receptores de reconocimiento de patrones, lo que provoca la liberación de citoquinas, orquestando la inducción de células T reguladoras (Treg) que mantienen el equilibrio inmunitario en la mucosa intestinal. Las células Treg ejercen una influencia supresora sobre la respuesta inmunitaria, fundamental para limitar la reactividad excesiva. En particular, los enteros sitios especializados denominados micro células (Células M) facilitan la transferencia de antígenos intestinales a las células dendríticas, situadas estratégicamente por encima de la placa de Peyer en el epitelio dentro del lumen intestinal, las células dendríticas procesan los probióticos directamente en la lámina propia en este intrincado entorno, las células dendríticas intestinales preparan eficazmente a los linfocitos T CD8+/CD4+, dirigiendo las respuestas de los linfocitos T colaboradores hacia distintos patrones, incluidos los perfiles Th1, Th2, Th17 o reguladores. La respuesta Th1, caracterizada por la producción de Interferón ($\text{IFN-}\gamma$), gobierna la inmunidad mediada por células. Por su parte, la respuesta Th2, caracterizada por la secreción de interleucinas (IL-4 e IL-5), fomenta la inmunidad humoral. La vía Th17 se centra en la producción de IL-17, mientras que la inducción de Tregs conduce a la liberación de interleucina 10 (IL-10) o factor de crecimiento transformante ($\text{TGF-}\beta$). Además, los probióticos orquestan la maduración de las células B en

células plasmáticas productoras de inmunoglobulina (IgA) las citoquinas y quimiocina liberadas por las células epiteliales intestinales crean un micro entorno dentro de la lámina propia que fomenta la expansión clonal de las células BR responsables de la producción de IgA a continuación estas IgA atraviesan el epitelio sin cruzan en la capa mucosa y regulan la adhesión bacteriana a los tejidos del huésped (Figura 5). Estas estrategias subrayan la multifuncionalidad de los probióticos en la promoción de la salud gastrointestinal canina (R. P. Singh et al., 2022; Treeful, 2023).

Figura 5.

Vista esquemática de la interacción entre las células inmunitarias intestinales del huésped y los probióticos.



Nota: Obtenido de Mazziotta et al. (2023)

Capítulo III: Materiales y métodos

Materiales

Cepas bacterianas

Las tres cepas *Lactobacillus* spp. fueron aisladas previamente a partir del calostro de leche canino debido al trabajo conjunto entre la Universidad de Concepción, Chile y el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) de Tucumán, Argentina. Las cepas se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Fisiopatología, Universidad de Concepción, Chile donde se encontraban congeladas en una solución de glicerol al 30% (v/v) en un ultracongelador a -80°C.

Medio de cultivo para bacterias ácido-lácticas (BAL)

Se seleccionó el medio de cultivo selectivo para Lactobacilos: Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (MRS-Broth, Merck Millipore, Alemania) para las suspensiones líquidas y, el agar MRS (MRS-Agar, Merck Millipore, Alemania) con la misma composición (Tabla 5), suplementado con agar como agente solidificante.

Tabla 5.

Composición del medio de cultivo para Lactobacilos. GranuCult™ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

Especificada por ISO 15214		Agar GranuCult™ MRS (de MAN, ROGOSA y SHARPE) acc. Norma ISO 15214	
Digestión enzimática de caseína	10 g/L	Digestión enzimática de caseína	10 g/L
Extracto de carne	10 g/L	Extracto de carne	10 g/L
Extracto de levadura	4 g/L	Extracto de levadura	4 g/L
Glucosa	20 g/L	D (+)-Glucosa	20 g/L
Ortofosfato de di-potasio hidrógeno	2 g/L	Ortofosfato de di-potasio hidrógeno	2 g/L
Tween 80	1.08 g/L	Tween 80	1.08 g/L
Citrato de triamonio	2 g/L	Citrato de triamonio	2 g/L
Acetato de sodio	5 g/L	Acetato de sodio	5 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 g/L	Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 g/L
Sulfato de manganeso monohidrato	0.05 g/L	Sulfato de manganeso monohidrato	0.04 g/L
Agar	12-18 g/L	Agar-Agar	14 g/L
pH a 25 °C	5.6-5.9	pH a 25 °C	5.6-5.9

Nota. Adaptado de Busse (1995)

BAM R11 (Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water).

Se agregaron 34 g de KH_2PO_4 en 500 mL de agua destilada estéril y se ajusta a pH 7.2. Se almacenó en refrigeración a 4°C. Para la preparación del Buffer de Siembra, se diluyó 1.25 mL de la solución madre BAM-R11 anterior y se llevó a un volumen de 1 litro con agua destilada estéril.

Antrona 0.2% en ácido sulfúrico concentrado.

En 50 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , 95.5%) se disolvió 0.2 gramos de antrona (cetona aromática tricíclica) con agitación y aforar a 100 mL con el ácido. Almacenar a 4°C y en un envase oscuro.

Solución patrón de glucosa 100 mg/L.

Para el estándar se disolvió 0.1 gramos de D-(+)-Glucosa (Sigma-Aldrich, $\geq 95.5\%$ (GC)) en 50 mL de agua destilada y aforó a 1 litro. Almacenar en refrigeración.

Líneas celulares

Las líneas celulares MDCK y DH-82 se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Fisiopatología, Universidad de Concepción, Chile. Se almacenó las células a -80°C en medio de congelación.

MDCK. (*Canis lupus familiaris*, Madin-Darby Canine Kidney, células epiteliales renales caninas, ATCC-CCL-34, NBL-2).

DH82. (*Canis lupus familiaris*, Golden retriever, macrófagos caninos, ATCC-CCL-34, ATCC-CRL-3590).

Medio de cultivo celular

Para el cultivo celular se preparó medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (SBF) al 10%; Penicilina/Estreptomicina al 1% y L-glutamina 2mM. Para el almacenamiento de las células se utilizó medio DMEM suplementado con SBF al 20%, dimetilsulfóxido (DMSO) al 10, Penicilina/Estreptomicina al 1% y L-glutamina 2mM.

Metodología

El trabajo se dividió el proceso en tres etapas principales: la cinética de crecimiento de las cepas probióticas, la encapsulación de las cepas por liofilización y la caracterización biológica de las cepas encapsuladas. La cinética de crecimiento estableció un proceso dinámico de estas cepas en condiciones específicas de crecimiento. La encapsulación se exploró como una estrategia para mejorar la viabilidad de los probióticos a durante el almacenamiento de estos. Finalmente, la caracterización biológica a partir de ensayos *in vitro* permitió la evaluación de las interacciones entre las cepas probióticas y el entorno intestinal.

Objetivo 1. Evaluar la viabilidad de las formulaciones con propiedades probióticas basadas en cepas de *Lactobacillus* spp. encapsuladas por liofilización.

Cinética de crecimiento de las cepas *Lactobacillus* spp.

Preparación del cultivo bacteriano

Bajo condiciones asépticas, se preparó el preinóculo añadiendo 100 μ L de la muestra criopreservada en un tubo cónico (50 mL) con 30 mL de medio MRS. Se incubó en un agitador orbital (*TU-400 Orbital Shaker Incubator, MRC, Israel*) a 37°C y 150 rpm durante 16 h (Agregán-Pérez et al., 2021; Krzywonos & Eberhard, 2011). Se agregó el contenido del tubo en un matraz Erlenmeyer estéril con 270 mL de medio y se incubó a 37°C y 150 rpm durante 28 h (Zawistowska-Rojek et al., 2022).

Para los ensayos de la cinética de crecimiento, se tomaron muestras a intervalos de una hora hasta alcanzar la fase estacionaria y posteriormente, el muestreo fue cada 4 h. Todas las muestras fueron utilizadas en la medición de densidad óptica (DO_{600nm}). Mientras que, para las determinaciones de viabilidad por recuento de unidades formadoras de colonias por mL, biomasa mediante peso seco y contenido de glucosa por determinación de carbohidratos, se utilizaron las muestras recolectadas cada 4 h.

Densidad óptica

La medición de la densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro UV-visible (*Be/ Photonics, Modelo UV-M51, Italia*) a una longitud de onda (λ) de 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$). Las muestras y el medio MRS utilizado como blanco fueron diluidos en agua destilada para mantener una concentración adecuada dentro del rango de detección del equipo considerando valores netos de $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.2 y 0.8. Se graficó la curva de crecimiento con el tiempo como variable independiente y la densidad óptica como variable dependiente (Raheem et al., 2022).

Viabilidad celular

El recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) a partir de cultivo líquido permitió determinar la cantidad de microorganismos viables en una muestra (Gebre et al., 2023). A partir de las alícuotas tomadas se diluyeron 100 μL de la muestra en 900 μL de tampón fosfato estéril y se prepararon diluciones seriadas. Para cada dilución, se realizó la inoculación (100 μL) de placas de agar MRS por duplicado utilizando el método de siembra por extensión. Se incubó las placas a 37°C durante 48 h y para el conteo de microorganismos se consideró las placas donde se encontraba un recuento entre 30 y 300 colonias siguiendo el protocolo de Lanara (1981) descrito por Jurado-Gómez y colaboradores (2014).

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{No de colonias} \cdot \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra (mL)}}$$

Determinación de biomasa

El método de referencia para la biomasa fue la determinación gravimétrica del peso seco, que se define como la fracción insoluble del medio de cultivo tras la eliminación del agua (Wechselberger et al., 2013). Se recolectaron 5 mL de las muestras y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos (*Universal 320 R, Hettich, Alemania*). El sobrenadante se almacenó a 4°C para la determinación del contenido de glucosa en el medio, mientras que el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada. La suspensión se colocó en un platillo de aluminio adecuado a la balanza infrarroja de secado (RADWAG,

Radom, Poland) ajustada a 90°C hasta alcanzar un peso estable. La concentración de biomasa en g/L se calculó dividiendo la diferencia entre los pesos del platillo de aluminio (antes y después del secado) por el volumen de la muestra (E. Li & Mira De Orduña, 2010).

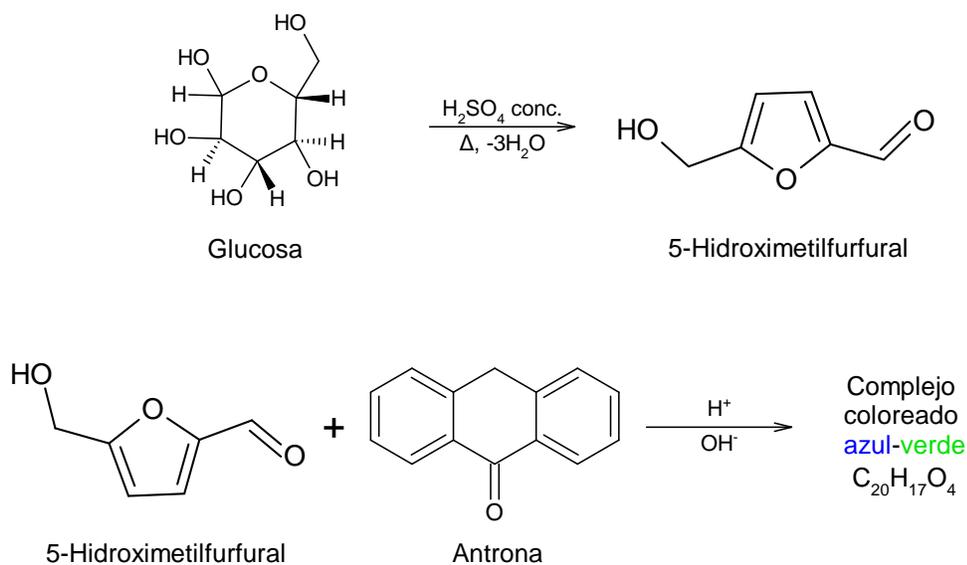
Determinación del contenido de glucosa

La determinación del contenido de glucosa consumida se basó en la metodología de Dubois y colaboradores (1956) descrita por Rodríguez (1987). Las células emplearon la glucosa como fuente de carbono principal, debido a su facilidad de metabolismo, abundancia, eficiencia energética (Blanco & Blanco, 2022; Cooper, 2000; Malina et al., 2021). La fundamentación del método (Figura 6) estuvo basado en la hidrólisis de los polisacáridos en monosacáridos, principalmente la glucosa no consumida en el medio. Estos remanentes de glucosa se deshidrataron en presencia de ácido sulfúrico concentrado, formando hidroximetilfurfural o furfural. Al combinar estos compuestos con antranol, que es la forma activa de la antrona, se produjo una reacción que da lugar a la formación de un complejo de color verde-azulado, el cual se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 625 nm ($DO_{625\text{ nm}}$) (Grande et al., 1953; More et al., 2018; Stephen & Merrifield, 2005).

Para generar la curva de calibración se prepararon seis puntos (Tabla 6) a partir de un patrón de glucosa conocido (100 mg/L). Las muestras se diluyeron en agua destilada (Tabla 7), considerando una dilución inicial 1:1000 ya que el medio MRS comercial contiene 20 g de glucosa por litro. Se alicuotó 2 mL de cada dilución en tubos Falcon (15 mL) y se agregó 4 mL del reactivo de antrona (0.2% en H_2SO_4 conc.). La reacción se incubó en hielo durante 5 minutos y posteriormente, se agitó por vórtex. Se dejó en baño María a 100°C durante 10 minutos y se enfrió en hielo por 5 minutos. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro utilizando cubetas de vidrio de 1mm de espesor a una longitud de onda de 625 nm (DO_{625}). A partir de la regresión lineal de la curva de calibración y la relación con la ecuación de Lambert Beer se calculó la concentración de glucosa en $\mu\text{g/mL}$.

Figura 6.

Representación esquemática de la prueba de cuantificación de glucosa consumida.



Nota: Elaboración en ChemSketch (2021, Versión 1.2)

Tabla 6.

Datos para la preparación de la curva de calibración de glucosa.

Concentración [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Volumen de solución patrón [mL]	Volumen de agua [mL]
0	0	2
10	0,2	1,8
20	0,4	1,6
30	0,6	1,4
40	0,8	1,2
50	1,0	1,0

Tabla 7.

Preparación de las muestras obtenidas a partir del sobrenadante de los cultivos microbianos.

Tiempo [h]	Dilución	Volumen de muestra [μL]	Volumen de agua [mL]
0	1:1000	10	9,99
4	1:500	20	9,98
8	1:500	20	9,98
12	1:500	20	9,98
16	1:200	50	9,95
20	1:100	100	9,90
24	1:100	100	9,90
28	1:100	100	9,90

Curva de estandarización DO vs UFC/mL

A partir de un cultivo de 16 h (fase estacionaria de crecimiento alcanzada) se determinó los valores de DO, y se diluyó el inóculo en medio MRS fresco hasta alcanzar una DO de 0.1, tomando muestras a cada hora (Hall et al., 2014; Van Alst et al., 2016). Después de la medición de DO, se sembraron las muestras en agar MRS mediante la técnica de siembra por extensión de diluciones seriadas. Las ecuaciones estándares para cada cepa se obtuvieron a partir de una regresión lineal realizada de los datos de DO_{600nm} como abscisa y las unidades formadoras de colonias por mL como ordenada (Raheem et al., 2022; Van Alst et al., 2016). Las mediciones de densidad óptica y los recuentos de biomasa viable (UFC/mL) fueron los métodos que se utilizaron habitualmente para la cuantificación directa de las bacterias (Duedu & French, 2017).

Encapsulación de las cepas probióticas

Liofilización (Secado por congelación)

La composición de las formulaciones probióticas se estableció considerando los resultados de viabilidad celular obtenidos en proyectos previos, realizados en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología de la Universidad de Concepción. En este sentido, el uso de agentes prebióticos como encapsulantes se establecieron en el ensayo como se indica en la tabla 8.

Tabla 8.

Cepas caninas liofilizadas con mejor rendimiento según el material de encapsulación

Microorganismo	Material de encapsulación (%p/v)
CEPA-16	12.5% Maltodextrina + 12.5% FOS
CEPA-17	10% FOS + 10% Inulina
TUCO-4	10% FOS + 10% Inulina

El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 15 °C. Se resuspendió los materiales de recubrimiento y el pellet de células en agua destilada estéril, con agitación magnética durante 20 minutos. Una vez homogeneizada la mezcla, se traspasó a recipientes de fondo plano completando entre

un 10-20% de la capacidad total del envase. Para evitar el estrés de las células con una disminución gradual de la temperatura, se expuso a congelación durante 4 h a -20°C y 4 h a -80°C posteriormente se secaron en el liofilizador (*BK-FD12PT, Biobase Bioindustry, China*) por 72 h. El producto se trituró de forma mecánica y se almacenó en bolsas de polipropileno (Jalali et al., 2012).

Viabilidad y estabilidad celular.

Para el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) a partir de las cepas liofilizadas se resuspendió 1 g de la cepa liofilizada en 10 mL de buffer de siembra. Utilizando el mismo diluyente, se prepararon diluciones seriadas hasta alcanzar una dilución 10^{-7} . Posteriormente, se sembró por extensión 100 μL de las dos últimas diluciones en placas de agar MRS, por duplicado. La incubación se realizó a 37°C durante 48 h (Gebre et al., 2023). A las formulaciones se les evaluó la viabilidad celular mediante recuento microbiano (Visciglia et al., 2022) y los valores se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular}(\%) = \left(\frac{N_a}{N_0}\right) * 100$$

Donde N_0 y N_a fueron los valores de log UFC antes y después de la liofilización, respectivamente.

Para el análisis de estabilidad, los productos liofilizados se dividieron en porciones y se realizaron ensayos en tiempo real incubando las muestras a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $60\%\pm 5\%$ de humedad relativa (Hr) y un ensayo en condiciones aceleradas con las muestras expuestas a $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75\%\pm 5\%$ de Hr durante tres meses. Mensualmente se determinaron los recuentos de células viables de los productos liofilizados (Nguyen et al., 2023).

$$\text{Tasa de supervivencia}(\%) = \left(\frac{N_t}{N_0}\right) * 100$$

Donde N_0 y N_t fueron los valores de log UFC en tiempo 0 y en tiempo t, respectivamente.

Caracterización biológica mediante ensayos *in vitro*

Objetivo 2: Analizar los efectos citotóxicos de las formulaciones probióticas encapsuladas en la línea celular MDCK mediante el ensayo colorimétrico MTT.

Ambas líneas celulares MDCK y DH82 se cultivaron en medio DMEM suplementado para cultivo. Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Para la amplificación de las células se utilizó tripsina, enzima que permite el desprendimiento de las células por su capacidad de cortar cadenas largas de aminoácidos (Hirota et al., 2006).

Ensayo de viabilidad celular

El análisis de viabilidad celular fue realizado mediante el ensayo de reducción de tetrazolio MTT, que emplea bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Se cultivaron 5000 células de la línea celular MDCK en placas de 96 pocillos. Para promover su diferenciación de monocitos en macrófagos se dejó incubar por 16 h hasta una confluencia del 80%. Se lavaron primero con PBS y se agregaron Se trataron las células con las cepas probióticas encapsuladas a diferentes concentraciones y con el material de encapsulación. Al retirar el tratamiento, a cada pocillo se le añadió 100 µL de medio DMEM libre de suero y 10 µL de la solución de MTT, logrando una concentración final de 0.45 mg/mL. Posteriormente, la mezcla fue incubada a 37 °C durante un periodo de 3 h. Para la solubilización de los cristales de formazán, se adicionaron 100 µL de una solución de isopropanol ácido y se agitó vigorosamente. Se utilizó un lector de microplacas multimodal *BioTek Synergy HTX (Biotek Instruments, Vermont, EU)* para medir la absorbancia a 570 nm y 630 nm (Riss et al., 2016). Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se utilizó la siguiente fórmula:

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

Considerando que el control de tratamiento corresponde a una viabilidad del 100%, los resultados que sobrepasen el 100% indican incremento en la capacidad o viabilidad celular, mientras que los valores por debajo de 100% señalan citotoxicidad.

Objetivo 3: Cuantificar la expresión de citoquinas proinflamatorias y de regulación negativa en células DH82 tratadas con las formulaciones probióticas encapsuladas mediante RT-qPCR.

Ensayo de inmunomodulación en células DH82

Las células DH82 se cultivaron en placas de 24 pocillos hasta llegar a una confluencia del 80%. Se trató las células con lipopolisacáridos (LPS) a una concentración de 1 µg/mL durante 4 h, considerando grupos control sin estimulación y preestimulados únicamente con LPS sin el tratamiento probiótico posterior. Se procedió al lavado de las células, seguido por un tratamiento de 12 h con diferentes concentraciones de las cepas bacterianas (1×10^5 UFC/mL; 1×10^6 UFC/mL; 1×10^7 UFC/mL; 1×10^8 UFC/mL). Cada condición se replicó tres veces. Las suspensiones bacterianas se prepararon utilizando medio de cultivo DMEM complementado con SBF al 10%, L-glutamina 2 mM y solución de aminoácidos no esenciales (NEAA). Los tratamientos se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂. Finalizado el tiempo indicado, se procedió a la extracción de ARN mediante el reactivo Trizol (Invitrogen) a partir de las instrucciones del fabricante (Rio et al., 2010; Thermo Fisher Scientific, 2023). La cuantificación del ARN se realizó mediante el lector de microplacas multimodal *BioTek Synergy HTX* (Biotek Instruments, Vermont, EU), verificando la integridad a través de electroforesis de agarosa y almacenando las muestras a -80°C.

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para evaluar la expresión relativa de diversos genes, a partir de marcadores proinflamatorios como citoquinas TNF-α, IL-6 e IL-1β y reguladores negativos de la inflamación como MKP-1 (Tabla 9). El gen GAPDH fue utilizado como normalizador. Para la síntesis de ADN complementaria y las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el kit comercial Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent, EU) y el equipo *Agilent AriaMx Real-Time PCR System* (Agilent, EU) con las condiciones descritas en la Tabla 10. Los resultados se analizaron mediante el método comparativo de Livak-Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) que compara dos valores en el exponente que representan los valores de expresión normalizados (Ganger et al., 2017).

Tabla 9.

Secuencias de partidores usados en RT-qPCR para la especie Canis lupus familiaris

Gen		Secuencias 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Tm	Acceso GenBank
TNFa-c	Forward	TAGCAAACCCCGAAGCTGAG	118	60.04	NM_001003244.4
	Reverse	TACAACCCATCTGACGGCAC		60.04	
IL-6-c	Forward	GGGAAAGCAGTAGCCATCAC	78	58.62	NM_001003301.1
	Reverse	CAGGACCCAGCTATGAACT		58.79	
IL-1B-c	Forward	GAAAGCCCACCCTACAGCTA	195	59.09	NM_001037971.1
	Reverse	GGCCACCTCTGGTATTTCTT		59.08	
MKP1-c	Forward	AGCACCCCACTCTATGACCA	121	60.25	XM_022417693.1
	Reverse	TGATCAAGGCAGTGATGCCC		60.39	
GAPDH-c	Forward	GTCCCCACCCCAATGTATC	98	59.81	NM_001003142.2
	Reverse	TCCGATGCCTGCTTCACTAC		59.82	

Nota: c: canino. Obtenido de Sayers et al. (2022)

Tabla 10.

Condiciones utilizadas en el equipo para RT-qPCR

Etap	Temperatura (°C)	Duración	No. Ciclos
RT	50	30 min	1
Hot Start	95	10 min	1
Amplificación	95	15 s	40
	59	30 s	
Melting	95	30 s	1
	65	30 s	
	95	30 s	

Nota: Obtenido de Sayers et al. (2022)

Análisis estadístico

Los datos mostrados constituyen la media aritmética de los valores de dos o más repeticiones, dependiendo del ensayo en cuestión \pm la desviación estándar. Antes de realizar análisis de varianzas (ANOVA; a un nivel de significancia de $p < 0,05$), se confirmó la distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de varianzas de los datos (proceso automático en el software) en GraphPad

Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). El análisis estadístico y la creación de gráficos se efectuaron en la misma plataforma. Para la actividad citotóxica de las formulaciones probióticas y los materiales de encapsulación en células MDCK, los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional. Se realizó la misma prueba para describir los resultados del ensayo de expresión genética de citoquinas obtenidas a partir de una RT-qPCR. Además, se utilizó la prueba post hoc de Dunnet (prueba de comparaciones múltiples) después de cada ANOVA (Ganger et al., 2017; Herath et al., 2020).

Capítulo IV: Resultados

La implementación de métodos para la producción de formulaciones probióticas conlleva ventajas significativas en términos de reproducibilidad y eficiencia tanto económica como temporal. Se exponen los resultados obtenidos a partir del análisis de las cepas aisladas y encapsuladas. Los resultados se han dividido en dos categorías principales: la cinética de crecimiento de las cepas y la caracterización biológica de las formulaciones liofilizadas. La fase inicial proporciona una caracterización detallada de las cepas, incluyendo parámetros de cultivo como la densidad celular, biomasa viable, contenido de glucosa y producción de biomasa. Estos aspectos permiten conocer el inicio de la fase estacionaria en el metabolismo de cada cepa para la posterior liofilización como estrategia de microencapsulación. Además, la caracterización biológica permitió identificar el nivel de citotoxicidad y la capacidad inmunomoduladora de las cepas liofilizadas a partir de la viabilidad de las células y el análisis de expresión de citoquinas.

Cinética de crecimiento de las cepas probióticas

Densidad óptica

Para el desarrollo de formulaciones probióticas, se realizaron fermentaciones en cultivos tipo Batch a escala de laboratorio utilizando como base las cepas microbianas. En el precultivo, se inocularon por separado las cepas *Lactobacillus* spp (CEPA-16, CEPA-17, TUCO-4) con el fin de activar metabólicamente a la bacteria. Se realizó la inoculación de los matraces con los preinóculos en medio MRS. Durante las 28 h de incubación, se evaluó el crecimiento celular mediante mediciones de DO_{600nm} .

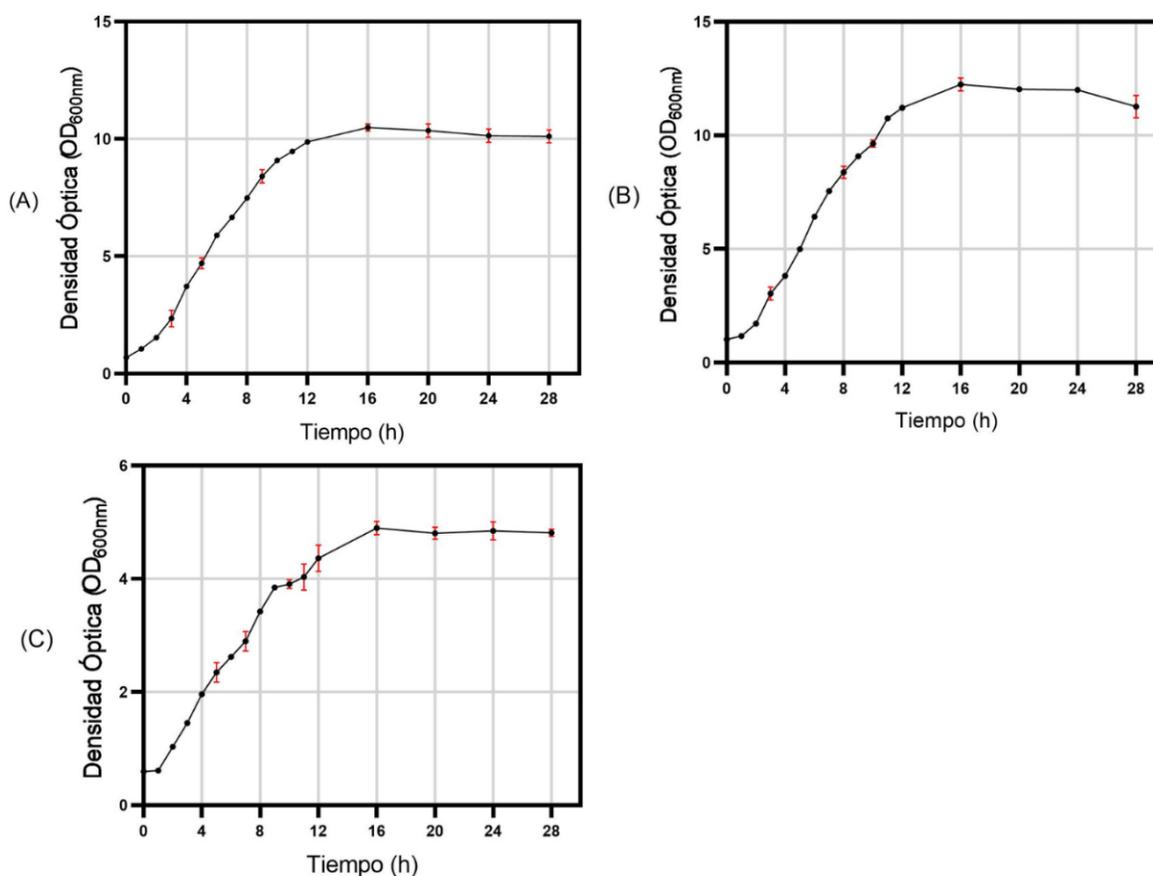
Las curvas de crecimiento celular evidenciaron que los cultivos tuvieron una fase de adaptación corta. El ingreso a la fase exponencial se observó en el intervalo de 0-12 h, mientras que la fase estacionaria inició a las 12 h de cultivo para las tres cepas y se mantuvo hasta finalizar el ensayo. De acuerdo con estos resultados se estableció que la recolección de las células se debía realizar en esta

etapa (12-16 h) para favorecer la estabilidad y viabilidad de las formulaciones durante la microencapsulación.

Las curvas de crecimiento (Figura 7) se construyeron en términos de $\text{Log}_{10} \text{DO}_{600\text{nm}}$ en función del tiempo. En la etapa temprana de la fase estacionara, se determinó la densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 9.87 para la CEPA-16 (A), de 11.21 para la CEPA-17 (B) y 4.66 para TUCO-4 (C). Estos valores proporcionaron una estimación cuantitativa del aumento de la población celular con el tiempo. Desde una perspectiva productiva, conocer la densidad celular en el inicio del proceso permite que este sea reproducible y que, a su vez, se establezcan condiciones para la fermentación en el escalamiento del proceso.

Figura 7.

Curvas de crecimiento bacteriano de las tres cepas probióticas en medio MRS.



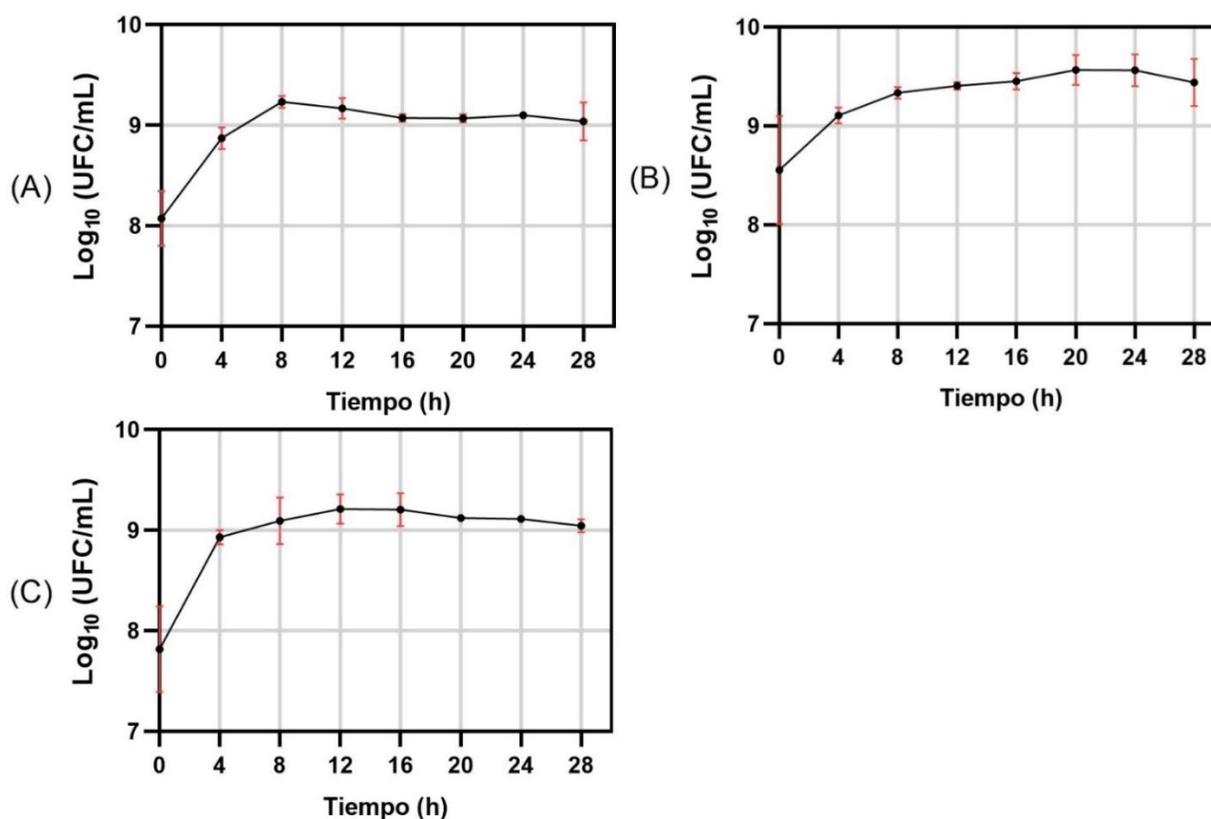
Nota. Se expresa los valores de absorbancia a los diferentes tiempos en $\text{Log} (\text{DO}_{600\text{nm}})$. Las barras de error indican la desviación estándar (DE) del experimento por triplicado.

Biomasa viable (UFC/mL)

La cuantificación de las células bacterianas por el método de siembra en placa permitió evaluar la cantidad de células vivas mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). En la fase estacionaria iniciada a las 12 h, se estableció valores de Log_{10} UFC/mL de 9.16 para la CEPA-16 (A), de 9.41 para la CEPA-17 (B) y 9.21 para TUCO-4 (C) equivalente a 1.5×10^9 , 2.6×10^9 , 2.1×10^9 UFC/mL, respectivamente. Esta medición permitió reconocer que las tres cepas mantienen la viabilidad en medio MRS a lo largo del tiempo (Figura 8).

Figura 8.

Concentración de células viables expresada en Log_{10} UFC/mL frente al tiempo. Curvas de crecimiento de la CEPA-16 (A), CEPA-17 (B) y TUCO-4 (C).



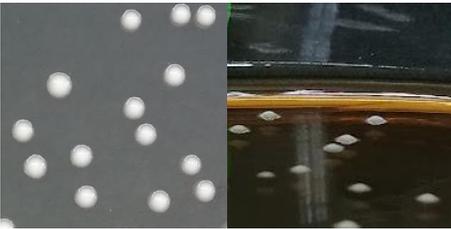
Nota. Las barras de error indican DE para un experimento realizado por triplicado.

Observación macroscópica

Se realizaron observaciones macroscópicas para describir las características morfológicas de las cepas de *Lactobacillus* spp. a las 48 h de la inoculación en agar MRS. Se examinaron aspectos como la forma, el borde, la elevación y la superficie descritas para cada cepa en la Tabla 11. Las características de las colonias individuales de las tres cepas se ajustan a la descripción de las colonias de bacterias ácido-lácticas que son redondas, lisas y de color blanco amarillento.

Tabla 11.

Estructura morfológica de las colonias de las cepas de Lactobacillus spp. en agar MRS.

Cepa	Morfología de las colonias	Descripción de la colonia
CEPA-16		Colonias blanquecinas, planas, de forma circular, superficie lisa, ligeramente elevadas.
CEPA-17		Colonias blanquecinas, planas, de forma circular, superficie lisa, ligeramente elevadas.
TUCO-4		Colonias blanquecinas, planas, de forma irregular y superficie lisa.

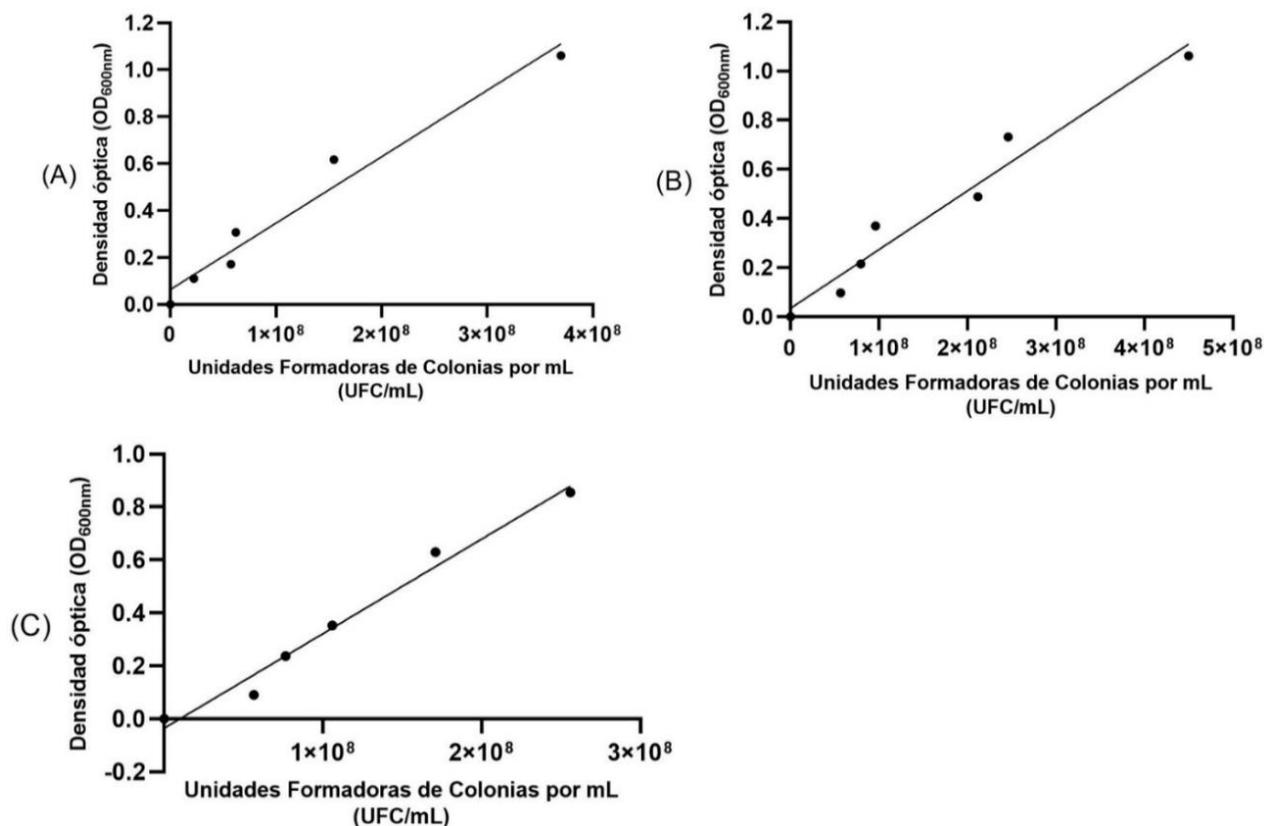
Correlación de UFC/mL y la $DO_{600\text{ nm}}$

Los datos medidos para la relación entre las UFC/mL (eje de abscisas, x) y la $DO_{600\text{ nm}}$ (eje de ordenadas, y) se muestran en la Figura 9. A partir de la regresión lineal de los datos, se obtuvieron las

ecuaciones correspondientes para la CEPA-16 ($y=2.829 e^{-9x}+0.06339$); la CEPA-17 ($y=2.389 e^{-9x}+0.03427$) y la TUCO-4 ($y=3.571 e^{-9x}+0.03568$). La curva de calibración entre las variables permitió conocer que la unidad de densidad óptica ($1,0 DO_{600\text{ nm}}$) es equivalente a 0.75 UFC/mL para la CEPA-16, 0.61 UFC/mL para la CEPA-17 y 0.97 UFC/mL para la TUCO-4. La correlación entre la cuantificación de las UFC/mL y la $DO_{600\text{ nm}}$ de las cepas facilitan el seguimiento del crecimiento celular mediante la obtención de ecuaciones empíricas que permiten estimar la concentración de células vivas a partir de los valores de $DO_{600\text{ nm}}$.

Figura 9.

Correlación entre UFC/mL y la $DO_{600\text{ nm}}$ de la CEPA-16 (A), CEPA-17 (B) y TUCO-4 (C) en medio MRS.



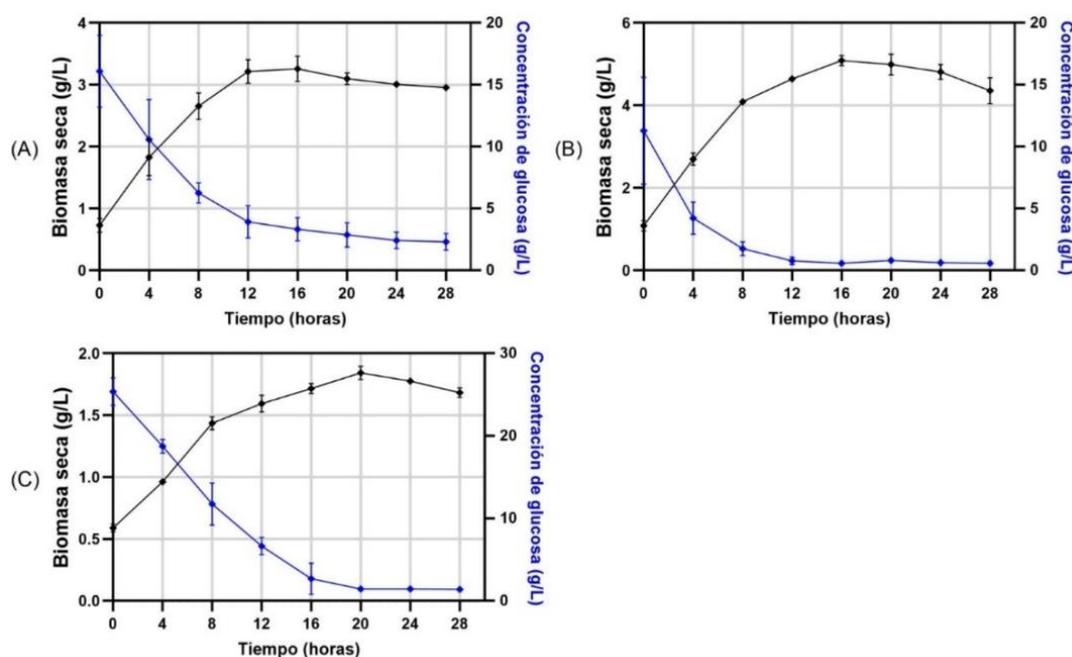
Producción de biomasa (g/L) y consumo de glucosa (g/L)

Considerando las curvas de crecimiento (Figura 10), se reafirma que las tres cepas entraron en la fase estacionaria a las 12 h de la fermentación, coincidiendo con el agotamiento de glucosa del medio. La

producción de biomasa se cuantificó en términos de peso seco (g/L) de las células cosechadas. Esto proporcionó una medida directa de la cantidad de células producidas en el cultivo, que indican la multiplicación celular que a las 12 h detiene su incremento. En la fase estacionaria se obtiene una concentración de biomasa de 3.21 g/L para la CEPA-16, 4.64 g/L para la CEPA-17 y 1.59 g/L para la TUCO-4. Además, se muestra que la concentración de glucosa en el medio MRS disminuye a las 12 h para la CEPA-16 desde 16.08 g/L a 3.92 g/L (76% del contenido inicial). Para la CEPA-17 desde 11.30 g/L a 0.76 g/L (93% del contenido inicial). Y para la TUCO-4 desde 25.37 g/L a 6.63 g/L (73% del contenido inicial).

Figura 10.

Producción de biomasa (g/L) y consumo de glucosa (g/L) a lo largo del tiempo de la CEPA-16 (A), CEPA-17 (B) y TUCO-4 (C)



Nota. Las barras de error indican DE para un experimento realizado por triplicado.

Se analizan los niveles del consumo de glucosa del medio durante el crecimiento de las tres cepas considerando que este carbohidrato es la fuente de carbono principal y el componente clave en la producción de biomasa microbiana. En procesos productivos, el rendimiento de biomasa junto con la

utilización del sustrato debe analizarse simultáneamente para realizar refuerzos nutricionales con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa.

Viabilidad y estabilidad celular de las cepas encapsuladas

Para la encapsulación por liofilización, se tomó como base los cultivos obtenidos a las 16 h considerando que durante la fase estacionaria se alcanza la máxima densidad celular y, por ende, las tasas de supervivencia son más altas debido al estado óptimo de las células. Para la estandarización del proceso se analiza las condiciones iniciales de las tres cepas a las 16 h antes (Tabla 12) y después de la liofilización (Tabla 13). La viabilidad celular de cada una de las tres especies bacterianas se ve alterada por el proceso de liofilización confirmando que el proceso de secado tiene impacto en la integridad celular, sin embargo, la pérdida no supera el 20% (Figura 11).

Tabla 12.

Condiciones iniciales de DO_{600 nm}, crecimiento microbiano y producción de biomasa a 16 h para la CEPA-16, CEPA-17 y TUCO-4

CEPA	DO_{600 nm}	UFC/mL	g/L
CEPA-16	10,48	1,18E+09	3.26
CEPA-17	12,24	2,88E+09	5.09
TUCO-4	4,89	1,44E+09	1.71

Nota. Biomasa viable (UFC/mL). Biomasa seca (g/L).

Tabla 13.

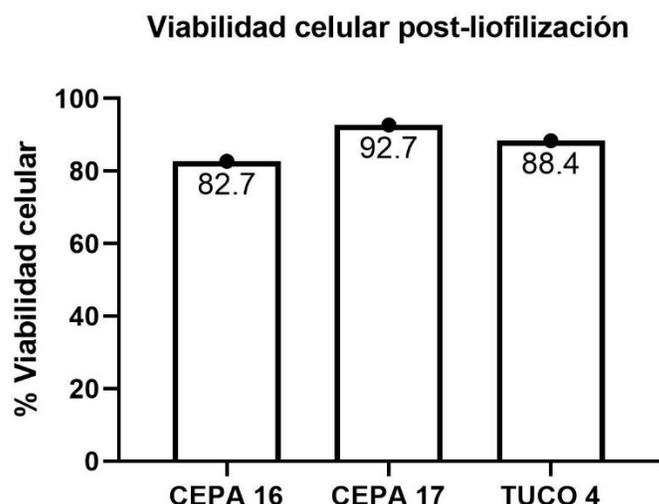
Características de las microcápsulas post-liofilización para la CEPA-16, CEPA-17 y TUCO-4

CEPA	UFC/g	UFC/mL	g/mL
CEPA-16	9,10E+10	9,76E+08	0,011
CEPA-17	5,80E+10	2,67E+09	0,046
TUCO-4	1,50E+10	1,27E+09	0,085

Nota. %V: Porcentaje de viabilidad celular.

Figura 11.

Tasas de viabilidad celular post-liofilización.



Nota. Los valores representan el promedio de las réplicas técnicas.

Las cepas formuladas y encapsuladas se conservaron a diferentes condiciones de almacenamiento (25°C y 60% humedad relativa, 37°C y 70% humedad relativa) para llevar a cabo el análisis de estabilidad. En intervalos de un mes, se realizó el recuento microbiano de las muestras en agar MRS. La Tabla 14 muestra los resultados del análisis de estabilidad durante tres meses a 25°C donde se observa un nivel de supervivencia de 99% para la CEPA-16, 93,5% para la CEPA-17 y 97,5% para la cepa TUCO-4. Las muestras almacenadas a 37°C mostraron una disminución en la estabilidad, con los porcentajes de supervivencia disminuyendo 86,8% para la CEPA-16; 86,85% para la CEPA-17 y 89,7% para la cepa TuCo4 (Tabla 15).

Tabla 14.

Recuento celular por siembra en agar MRS para análisis de estabilidad en tiempo real

Mes	CEPA 16 (UFC/g)	%Ts	CEPA 17 (UFC/g)	%Ts	TUCO 4 (UFC/g)	%Ts
1	8,70E+10	99,82	3,00E+10	97,34	1,00E+10	98,27
2	8,50E+10	99,73	1,90E+10	95,50	9,70E+09	98,14
3	8,20E+10	99,59	1,30E+10	93,97	8,80E+09	97,72

Nota. %Ts: tasa de supervivencia.

Tabla 15.

Recuento celular por siembra en agar MRS para análisis de estabilidad en condiciones aceleradas

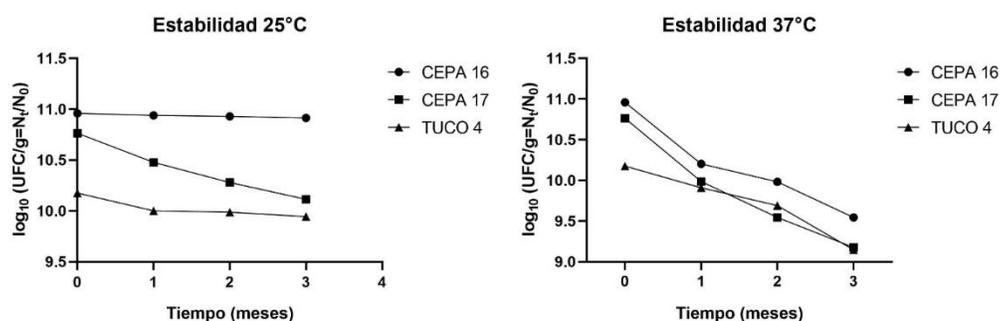
Mes	CEPA 16 (UFC/g)	%Ts	CEPA 17 (UFC/g)	%Ts	TUCO 4 (UFC/g)	%Ts
1	1,60E+10	93,11	9,70E+09	92,78	8,10E+09	97,37
2	9,60E+09	91,09	3,50E+09	88,67	4,90E+09	95,23
3	3,50E+09	87,09	1,50E+09	85,25	1,40E+09	89,88

Nota. %Ts: tasa de supervivencia.

En cada tiempo de almacenamiento (0 meses, 1 mes, 2 meses y 3 meses), se realizó el recuento de la biomasa viable de las tres cepas (UFC/mL). Se representa en la Figura 12, la pérdida de viabilidad bacteriana en cada tiempo de almacenamiento expresada como $\log_{10} (N_t/N_0)$.

Figura 12.

Estabilidad de las cepas liofilizadas durante 3 meses en almacenamiento a 25 y 37°C



Nota. Los resultados se basan en datos de experimentos por duplicado.

Caracterización biológica de las cepas probióticas liofilizadas mediante ensayos *in vitro*

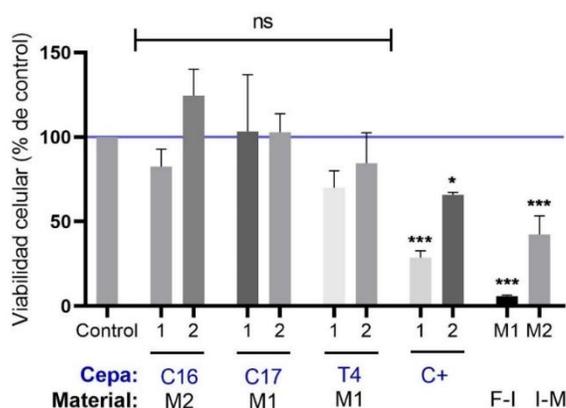
Análisis de citotoxicidad por ensayo colorimétrico MTT

Para examinar la citotoxicidad de los probióticos en macrófagos, se trató las células de la línea MDCK con las cepas probióticas y con los materiales de encapsulación. Los resultados indicaron que las cepas probióticas no inducen citotoxicidad a las células en las concentraciones analizadas, más bien, en la CEPA-16 y CEPA-17 mostraron la proliferación de las células en algunas muestras (valores mayores al 100%, no significativos). Las células MDCK tratadas con las tres cepas liofilizadas, no presentaron diferencias significativas (Figura 13), sin embargo, el control positivo correspondiente al probiótico

comercial exhibió valores de citotoxicidad significativos tanto para 1×10^7 UFC/mL (valor de $p < 0.001$) como para 1×10^6 UFC/mL (valor de $p = 0.049$). Además, se observaron niveles significativos de citotoxicidad en relación con los materiales de encapsulación (valor de $p < 0.001$).

Figura 13.

Ensayo de citotoxicidad en células caninas MDCK tratadas con las formulaciones probióticas microencapsuladas y los materiales de recubrimiento analizadas por MTT.



Nota. Se trataron las células MDCK con las tres cepas de análisis *Lactobacillus* spp. (C16: CEPA-16; C17: CEPA-17; T4: TUCO-4), el control (probiótico comercial) en diferentes concentraciones (1: 1×10^7 ; 2: 1×10^6 UFC/mL) y los materiales de encapsulación durante 24 h. Los resultados se expresan como medias \pm DE de experimentos por triplicado. (ns, $P > 0.05$; * $P \leq 0.1$; *** $P \leq 0.001$)

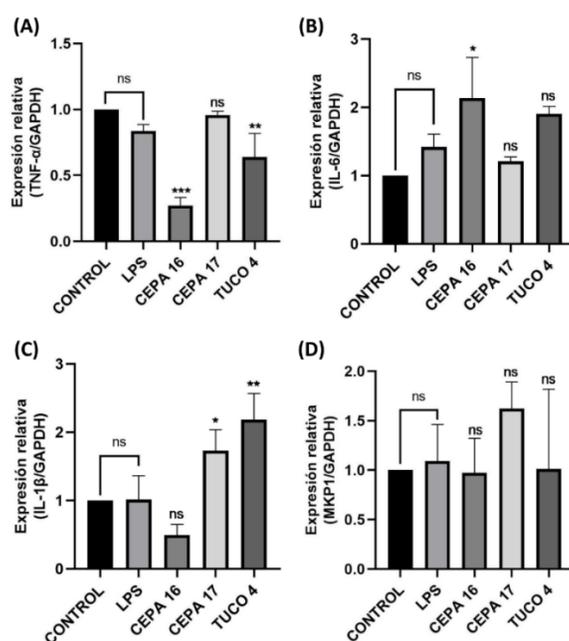
Expresión de citoquinas

Al analizar la expresión de citoquinas, se identificaron resultados significativos en relación con los diferentes tratamientos. El tratamiento con la cepa CEPA-16 indujo una notable reducción en la expresión de TNF- α (Fig 14.A), lo que sugiere un efecto supresor en esta citoquina. Por otro lado, la expresión relativa de IL-6 aumentó significativamente en respuesta al tratamiento con la cepa CEPA-16 (Fig 14.B), indicando un efecto estimulante en la producción de esta citoquina. En el caso de IL-1 β , se observó un aumento significativo en los tratamientos con las cepas CEPA-17 y TUCO-4 (Fig 14.C), lo que

denota su capacidad para influir en la expresión de esta citoquina. Sin embargo, la expresión relativa de MKP1 no mostró variaciones significativas en ninguno de los grupos de tratamiento (Fig 14.D). Estos resultados sugieren un potencial terapéutico de los probióticos evaluados, ya que pueden modular la expresión de citoquinas de manera selectiva, lo que podría ser beneficioso en el contexto de la regulación de respuestas inmunitarias específicas.

Figura 14.

Expresión relativa de ARNm de citoquinas con relación a GAPDH en células DH82 tratadas con formulaciones probióticas



Nota. La expresión génica se midió después del tratamiento de células MDCK con 1 μ L/mL de LPS durante 3 h y con las formulaciones probióticas en concentración de 1×10^7 UFC/mL por 12 h a 37°C, CO₂ al 5%. Los datos se expresan como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta Ct = Ct$ (Gen objetivo) - Ct (Gen constitutivo), los valores son la media de tres réplicas del ensayo ± 1 desviación estándar y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (Cd tratamiento) - ΔCt (Control sin tratamiento). Los valores se compararon utilizando ANOVA unidireccional con corrección de Dunnett para comparaciones múltiples con la muestra tratada con LPS (ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

Capítulo V: Discusión

La población de animales de compañía ha aumentado los últimos años, especialmente en los países occidentalizados (Grzeškowiak et al., 2015c). En Latinoamérica, la falta de conciencia sobre el bienestar del animal y las enfermedades, el restringido acceso económico y tecnológico a una atención veterinaria adecuada y la ausencia de una tenencia responsable de mascotas, han creado las condiciones para el surgimiento y persistencia de muchas enfermedades gastrointestinales en las mascotas (Maggi & Krämer, 2019; Woodroffe et al., 2012). Dentro de las mascotas destaca la especie canina como una de las más populares en América Latina, siendo Brasil el país con mayor número de perros en la región con 68 millones de perros en el 2022, seguido de México con 17 millones (Mota-Rojas et al., 2021; Navarro, 2022). Este crecimiento en la población de canes en América Latina ha demostrado la necesidad de abordar de manera efectiva los desafíos relacionados con su salud, particularmente el sistema gastrointestinal, órgano con mayor afectación por la forma de alimentación de la especie (Mota-Rojas et al., 2023). Es esencial comprender las particularidades del sistema gastrointestinal del perro doméstico y explorar estrategias preventivas y terapéuticas, como el uso de probióticos, para aprovechar las interacciones beneficiosas entre los microorganismos y su huésped (Mondo et al., 2019; Pilla & Suchodolski, 2021).

La evolución tecnológica en torno a la producción de probióticos de uso veterinario se ha enfocado en la optimización de los procesos productivos para su obtención, específicamente en las etapas upstream (“aguas arriba”) y downstream (“aguas abajo”) asegurando un alto rendimiento en la fabricación a escala industrial (Fenster et al., 2019). La fabricación de probióticos comprende una serie de fases comunes, que abarcan desde la preparación de inóculos hasta la fermentación y el procesamiento de la masa celular, siendo crucial comprender la cinética de crecimiento para optimizar estos procesos (Grumet et al., 2020). Los parámetros de la cinética de crecimiento, principalmente la

duración de la fase de latencia, pueden ser influenciados por las condiciones del cultivo y la composición del medio de fermentación empleado (Bertranda, 2019; Ślizewska & Chlebicz-Wójcik, 2020).

En esta investigación, se han desarrollado tres formulaciones con propiedades probióticas a partir de cepas del género *Lactobacillus* spp. Para garantizar la reproducibilidad de los ensayos, fue necesario comenzar con el análisis de las fases de crecimiento microbiano, ya que es crucial para este tipo de procesos establecer condiciones iniciales óptimas (Fenster et al., 2019; Xia et al., 2021). Se inició el crecimiento a partir de inóculos en fase estacionaria, ya que esto minimiza el proceso degenerativo y prepara las cepas para la división exponencial, reduciendo la fase de latencia (Rolfe et al., 2012). Esta fase estacionaria permite la activación de ciertos mecanismos de estrés similares a las condiciones en periodos de inanición o estrés múltiple que permiten la supervivencia de las células (Schöpping et al., 2022).

Es importante señalar que el comportamiento cinético, la velocidad de crecimiento y el metabolismo pueden variar significativamente entre las cepas de *Lactobacillus* (Heeney et al., 2018), por ejemplo, debido a diferencias genéticas (Gubelt et al., 2020; Jyoti et al., 2004; Mejia-Gomez & Balcázar, 2020). La literatura describe que para cepas como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* se observa un comportamiento cinético similar con respecto a la duración de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria (12 h) (Siaterlis et al., 2009). En contraposición, Broeckx y col. (2019) describieron que la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, *L. rhamnosus* GG alcanzaba la fase estacionaria a las 17 h. Andrianto y col. (2018) informaron que en otra cepa de *Lactobacillus* spp., *L. casei* la fase estacionaria iniciaba a partir de las 18 h. Estas variaciones tienen un impacto significativo en la producción de los probióticos, ya que, cada cepa puede tener preferencias en el consumo de ciertos sustratos, lo que afecta la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento celular (You et al., 2022).

En la fermentación láctica, las cepas del género *Lactobacillus* utilizan preferiblemente la glucosa como fuente de carbono y energía (Y. Wang et al., 2021). Las tendencias de consumo de sustrato en el

ensayo descrito por Siaterlis y col. (2009) muestran que los niveles de glucosa utilizando el medio MRS, mantuvieron valores de alrededor de los 4 y 6 g/L, lo que sugiere que las cepas podrían tener respuestas metabólicas distintas bajo las mismas condiciones.

La cinética de crecimiento se definió en función de los parámetros examinados en el estudio actual, y se observó que las tres cepas desarrolladas en un sistema Batch experimentaron un periodo de crecimiento activo de aproximadamente 12 horas antes de ingresar a la fase estacionaria. Durante este período, el suministro de glucosa se agotó por completo después de aproximadamente 16-20 horas de cultivo, conservando una concentración de glucosa entre 0.6-2.3 g/L. Varios estudios han señalado que el consumo de glucosa muestra una relación inversamente proporcional con la tasa de crecimiento celular, lo que sugiere que las células se ajustaron a un estado de estrés debido a la escasez de nutrientes durante la fase estacionaria (Jeon et al., 2023; Jyoti et al., 2004).

Se ha demostrado que las células bacterianas en fase estacionaria exhiben una notable estabilidad en comparación con aquellas cosechadas durante la fase exponencial, tras someterse al proceso de liofilización (Jaishankar & Srivastava, 2017). Esta observación adquiere relevancia tanto desde la perspectiva industrial como para los consumidores, debido a los beneficios asociados con la liofilización de bacterias probióticas, que incluyen la facilidad en el transporte de los productos y sus propiedades estables durante el almacenamiento (Gong et al., 2019; H. Yang et al., 2023). No obstante, se debe considerar que características como la viabilidad y la supervivencia de las bacterias liofilizadas en estado seco se ven influenciadas por factores críticos, tales como las condiciones de secado, la elección del material de encapsulación y las condiciones de almacenamiento (Abla & Mehanna, 2022; Kurtmann et al., 2009).

Investigaciones recientes, como la realizada por Jeon y col. (2023), han demostrado que la cosecha de células en fase estacionaria exhibe una notable resistencia a la liofilización por la acumulación de compuestos crioprotectores, como la trehalosa y la arabinosa. Además, Corcoran y col.

(2004) informaron una notable supervivencia de las células de *Lactobacillus rhamnosus* GG cuando se encontraban en fase estacionaria, superando el 50%. Estos beneficios relacionados con la fase estacionaria han sido documentados también por Jalali y col. (2012), quienes determinaron una viabilidad de los microorganismos superior al 82% después de tres meses de almacenamiento a 23°C. La investigación de Nualkaekul y col. (2012) reportó una perspectiva adicional al resaltar que la inclusión de prebióticos puede jugar un papel fundamental en la estabilización de las células bacterianas durante la liofilización y su posterior almacenamiento. Las propiedades protectoras de los prebióticos también fueron observadas por Avila-Reyes y col. (2014) en la microencapsulación de *L. rhamnosus* con inulina, y por Rodrigues y col. (2020) en la encapsulación de *L. plantarum* GP con fructooligosacáridos (FOS) que mejoraron la viabilidad celular frente a otros materiales.

En el marco de este estudio se observó una viabilidad celular post-liofilización superior al 80% en las tres cepas, lo que condujo a una concentración inicial en los productos liofilizados para la CEPA-16 9.1×10^{10} UFC/g, CEPA-17 5.8×10^{10} UFC/g y TUCO-4 1.5×10^{10} UFC/g; esta disminución fue consecuente con los resultados expuestos anteriormente sobre liofilización de *Lactobacillus* donde la disminución de la viabilidad celular alcanzó el 30% (Siaterlis et al., 2009). La pérdida de viabilidad que se observó durante la liofilización pudo deberse a una temperatura extremadamente baja y a la formación de cristales de hielo en la células (Moumita et al., 2018). La pérdida de viabilidad durante el almacenamiento también puede explicarse por la oxidación de los lípidos de la membrana y la desnaturalización de las proteínas, lo que da como resultado la degradación molecular de las células probióticas, más rápida a altas temperaturas (Nguyen et al., 2023).

A pesar de estos inconvenientes, la liofilización se considera uno de los procesos de secado más dóciles con las células en comparación con otros procedimientos de secado utilizados habitualmente, y la actividad probiótica se puede mantener con un nivel bastante alto (Chen et al., 2023). Existen diversas estrategias de dosificación de probióticos, siendo la formulación en microcápsulas la más utilizada por su

capacidad para superar las tensiones ambientales (pH, actividad del agua) y la estabilidad a lo largo del proceso (G. Wang et al., 2022). Además, facilitan la capacidad de disolución y la administración de grandes dosis (Rashidinejad et al., 2020). Los ensayos de estabilidad celular realizados en este trabajo durante 3 meses posteriores al proceso de liofilización demostraron que la CEPA-16, CEPA-17, TUCO-4 almacenadas a condiciones en tiempo real (99, 93.5, 97.5%, respectivamente) fueron superiores a los de las muestras en el ensayo a condiciones aceleradas (86.8, 86.85, 89.7%). Las pruebas de estabilidad en tiempo real y en condiciones aceleradas permitieron establecer la vida útil del producto. En este sentido, si un producto muestra una estabilidad satisfactoria durante al menos 3 meses en condiciones de prueba de alta humedad (40°C/75% Hr), entonces se considerará una vida útil hasta 2 años, sujeto a datos satisfactorios de estabilidad a largo plazo (TGA, 2021).

Al igual que las pruebas de estabilidad que determinan la vida útil de un producto bajo condiciones específicas, como alta humedad y temperatura, las pruebas de citotoxicidad mediante el ensayo MTT desempeñan un papel crucial en la evaluación de la seguridad y eficacia de un producto (Kamiloglu et al., 2020). Este ensayo proporcionó una evaluación inicial sobre la interacción de un producto con las células vivas en un corto período de tiempo (Ghasemi et al., 2021). Diversos autores han revelado la capacidad de algunas cepas de *Lactobacillus* que limitan la citotoxicidad causada por muchos enteropatógenos (Gerasimov et al., 2015; Tejero-Sariñena et al., 2012). Vemuri y col. (2018) analizaron las cepas de *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 en concentraciones de 10^7 - 10^8 UFC/mL y no observaron citotoxicidad celular significativa ni pérdida de viabilidad celular. En el presente trabajo las cepas probióticas no mostraron citotoxicidad en células MDCK e incluso estimularon su proliferación. Esto sugiere que estas cepas tienen un impacto positivo en la salud de las células, lo que puede estar relacionado con su capacidad de inmunomodulación (Delgado et al., 2020).

Los efectos proinflamatorios y antiinflamatorios son dos resultados comunes de la inmunomodulación, que es un proceso que regula la respuesta del sistema inmunológico del organismo (L. Huang et al., 2019). Los efectos proinflamatorios involucran la capacidad de un agente para estimular o aumentar la respuesta inflamatoria en el cuerpo del huésped, lo que puede ser beneficioso en la detección y eliminación de amenazas patógenas (Fitzgibbon & Mills, 2020). Por otro lado, los efectos antiinflamatorios implican la capacidad de un agente para reducir o suprimir una respuesta inflamatoria excesiva, contribuyendo así a mantener un equilibrio saludable en el sistema inmunológico (Kałużna et al., 2022). Estos efectos antiinflamatorios demuestran la capacidad inmunomoduladora de los agentes, como los probióticos, y respaldan su potencial terapéutico en la regulación de la respuesta inmunológica y la promoción de la salud celular (Pahumunto et al., 2022).

Garantizar la potencia biológica de las cepas probióticas después del proceso de encapsulación y lograr su estabilidad, son algunas de las características más importantes que permiten evidenciar su actividad como inmunomoduladoras con acción proinflamatoria o antiinflamatoria en este caso sobre el sistema gastrointestinal canino (Baral et al., 2021). Resulta necesario realizar la selección adecuada de las cepas considerando sus propiedades inmunomoduladoras específicas (Bubnov et al., 2018; Cristofori et al., 2021). De manera general, se realizan pruebas *in vitro* para una detección preliminar de los efectos que tienen las células bacterianas sobre diferentes componentes de la respuesta inmune (Mokrozub et al., 2015).

Sudhakaran y colaboradores (2013) llevaron a cabo una evaluación del potencial antiinflamatorio de ocho aislados probióticos autóctonos de *Lactobacillus*. Sus resultados indicaron que la cepa *L. plantarum* reguló negativamente la expresión de TNF- α , mientras que las otras cepas mostraron modulación positiva sobre la IL-6 en diferentes niveles. Este fenómeno de regulación negativa sobre el TNF- α en respuesta a las cepas *Lactobacillus* ya se había documentado previamente por Haller y col. (2000), lo que sugiere la existencia de un potencial inmunosupresor en este tipo de probióticos. En este

contexto, Dong y col. (2012) analizaron las propiedades inmunomoduladoras de seis cepas probióticas *Lactobacillus*, todas las cuales demostraron aumentar la producción de IL-1 β . Además, en un estudio *in vitro* que involucró a la cepa *L. casei Shirota*, se observó un estímulo en la producción de IL-1 β (Dong et al. 2010). Por otro lado, Llewellyn y Foey (2017) han sugerido que la MKP1 desempeña un papel como regulador negativo en la señalización de TLR4, un componente crucial en la respuesta inmune innata y la inflamación. Estos hallazgos respaldan la diversidad de efectos inmunomoduladores que pueden manifestar los probióticos, tanto antiinflamatorios como proinflamatorios, dependiendo de las cepas y los componentes específicos involucrados en la respuesta inmunológica.

En esta investigación para evaluar la actividad biológica de las cepas probióticas, se analizó un set de citoquinas proinflamatorias, incluidas: TNF- α , la interleucina-6, la interleucina-1 β y de regulación negativa, la fosfatasa MKP-1. El resultado de este ensayo demostró que la CEPA-16 tenía características antiinflamatorias y que, favorecía la inmunosupresión de TNF- α y la estimulación de la IL-6. Por otro lado, en el caso de las cepas CEPA-17 y TUCO-4, se observó una estimulación significativa en la producción de IL-1 β . En cuanto a la expresión relativa de MKP1, no se observaron diferencias significativas en ningún grupo de tratamiento. Después de la microencapsulación de las cepas mediante liofilización, las formulaciones demostraron la preservación de su actividad biológica, lo que permitió la obtención de probióticos altamente eficaces con propiedades inmunorreguladoras.

El desarrollo de formulaciones probióticas para canes con propiedades inmunomoduladoras tiene un impacto de gran alcance en la salud y el bienestar de las mascotas caninas (Blake & Suchodolski, 2016; Woodroffe et al., 2012). Con el crecimiento constante de la población de perros en todo el mundo, el fortalecimiento del sistema inmunológico de estos animales se convierte en una preocupación crucial para sus dueños y para la comunidad veterinaria (Wernimont et al., 2020). Estas formulaciones, basadas en cepas específicas de *Lactobacillus* spp. encapsuladas mediante liofilización, no solo pueden contribuir a la prevención y el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sino que también tienen el

potencial de modular de manera positiva las respuestas inmunitarias de los perros; fortaleciendo la capacidad del sistema inmunológico de combatir enfermedades y mantener a los caninos en un estado óptimo de salud (Perini et al., 2023; Woodroffe et al., 2012). Este avance representa un compromiso continuo con el bienestar animal y la promoción de una vida saludable y activa para las mascotas. Además, la investigación y desarrollo de formulaciones probióticas inmunomoduladoras para perros abren nuevas puertas en la atención veterinaria y resaltan la importancia de cuidar a nuestros compañeros peludos de la mejor manera posible (Eissa et al., 2019; Stokes & Waly, 2006).

Capítulo VI: Conclusiones

En este estudio, se investigó la liofilización de cepas de *Lactobacillus* spp. en fase estacionaria que demostró ser una técnica viable para la producción de formulaciones probióticas con una alta viabilidad celular. Se demostró una notable estabilidad de las formulaciones durante el almacenamiento, con una pérdida de viabilidad celular relativamente baja. Esto sugiere que la microencapsulación de las cepas probióticas contribuye a mantener la calidad y eficacia de los productos probióticos a lo largo del tiempo, lo que es beneficioso tanto para la industria como para los consumidores.

El análisis de la cinética de crecimiento permitió definir que el comportamiento de las tres cepas (CEPA-16, CEPA-17 y TUCO-4) era similar, con una fase de estacionaria alcanzada a las 12 horas de cultivo. La liofilización mejoró la viabilidad de las cepas durante el procesamiento tecnológico y el almacenamiento, ya que deshidrató los productos sensibles como el material biológico con una mínima pérdida de calidad.

Los resultados obtenidos de la caracterización biológica de las cepas encapsuladas (CEPA-16, CEPA-17, TUCO-4) mediante el proceso de liofilización presentaron un perfil altamente prometedor desde el punto de vista de la seguridad, ya que no mostraron evidencia de citotoxicidad. Además, estos hallazgos revelaron un impacto positivo en la respuesta inmunológica, con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1 β , junto con una reducción en la expresión de TNF- α . Estos resultados respaldan el potencial de estas cepas encapsuladas como candidatos inmunomoduladores para aplicaciones terapéuticas y destacan la importancia de la liofilización como una técnica efectiva para preservar la viabilidad celular y potenciar las respuestas inmunológicas deseadas.

Capítulo VII: Recomendaciones

En el contexto del escalamiento del proceso, se recomienda llevar a cabo un análisis costo-beneficio relacionado con la adición de nutrientes al medio de cultivo con el propósito de favorecer la cinética de crecimiento. Evaluando de manera simultánea la utilización del sustrato y el rendimiento de la biomasa. Este enfoque permitirá una toma de decisiones más fundamentada y estratégica en cuanto a los refuerzos nutricionales que en este ensayo no fueron analizados, con el objetivo de optimizar la producción de biomasa.

Dada la similitud en el comportamiento observado entre las cepas analizadas en este estudio, se sugiere el desarrollo de una formulación probiótica multicepa. Esta estrategia podría aprovechar la capacidad de estas cepas para trabajar de manera complementaria, brindando así una variedad más amplia de beneficios para la salud y mejorando la estabilidad del producto final, lo que en última instancia contribuiría a la eficacia y viabilidad a largo plazo de la formulación probiótica.

Referencias

- Abla, K. K., & Mehanna, M. M. (2022). Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products. *International Journal of Pharmaceutics*, *628*, 122233. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.122233>
- Aggarwal, N., Kitano, S., Puah, G. R. Y., Kittelmann, S., Hwang, I. Y., & Chang, M. W. (2023). Microbiome and Human Health: Current Understanding, Engineering, and Enabling Technologies. *Chemical Reviews*, *123*(1), 31. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.2C00431>
- Agregán-Pérez, R., Alonso-González, E., Mejuto, J. C., & Pérez-Guerra, N. (2021). Production of a Potentially Probiotic Product for Animal Feed and Evaluation of Some of Its Probiotic Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS221810004>
- Alipour, M. J., Jalanka, J., Pessa-Morikawa, T., Kokkonen, T., Satokari, R., Hynönen, U., Iivanainen, A., & Niku, M. (2018). The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports* *2018 8:1*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28733-y>
- AlShawaqfeh, M. K., Wajid, B., Minamoto, Y., Markel, M., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., Serpedin, E., & Suchodolski, J. S. (2017). A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(11). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIX136>
- Andrianto, D., Al Rasyid, L. O. H., & Miftasari, Y. (2018). Physicochemical Characteristics and Bioactivity of *Lactobacillus casei* Fermented Coconut Oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *197*(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/197/1/012003>
- Anukam, K. C., & Reid, G. (2007). Probiotics: 100 years (1907–2007) after Elie Metchnikoff's observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, *1*, 466–474.

Anyogu, A., Olukorede, A., Anumudu, C., Onyeaka, H., Areo, E., Adewale, O., Odimba, J. N., & Nwaiwu, O.

(2021). Microorganisms and food safety risks associated with indigenous fermented foods from Africa. *Food Control*, *129*, 108227. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108227>

Aparna Sudhakaran, V., Panwar, H., Chauhan, R., Duary, R. K., Rathore, R. K., Batish, V. K., & Grover, S.

(2013). Modulation of anti-inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 cell line and mouse model at gene expression level with indigenous putative probiotic lactobacilli. *Genes and Nutrition*, *8*(6), 637–648. <https://doi.org/10.1007/S12263-013-0347-5/FIGURES/4>

Aspri, M., Papademas, P., & Tsaltas, D. (2020). Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. *Fermentation 2020*, Vol. 6, Page 30, 6(1), 30.

<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6010030>

Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jiménez, M. T., San Martín-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A.

(2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*, *102*(1), 423–430. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.11.033>

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, *307*(5717), 1915–1920.

https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1104816/SUPPL_FILE/BACKHED.SOM.PDF

Baral, K. C., Bajracharya, R., Lee, S. H., & Han, H. K. (2021). Advancements in the Pharmaceutical

Applications of Probiotics: Dosage Forms and Formulation Technology. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 7535. <https://doi.org/10.2147/IJN.S337427>

Bastos, T. S., Souza, C. M. M., Legendre, H., Richard, N., Pilla, R., Suchodolski, J. S., de Oliveira, S. G.,

Lesaux, A. A., & Félix, A. P. (2023). Effect of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Probiotic on Diet Digestibility, Fermentative Metabolites, and Composition and Functional Potential of the Fecal Microbiota of Dogs Submitted to an Abrupt Dietary Change. *Microorganisms*, *11*(2), 506.

<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11020506/S1>

- Beaudoin, A. L., Bollig, E. R., Burgess, B. A., Cohn, L. A., Cole, S. D., Dear, J. D., Fellman, C. L., Frey, E., Goggs, R., Johnston, A., Kreuder, A. J., KuKanich, K. S., LeCuyer, T. E., Menard, J., Reagan, K. L., Sykes, J. E., Veir, J. K., Viviano, K., Wayne, A., & Granick, J. L. (2023). Prevalence of antibiotic use for dogs and cats in United States veterinary teaching hospitals, August 2020. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/JVIM.16814>
- Bernier-Latmani, J., & Petrova, T. V. (2017). Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2017 14:9, 14(9), 510–526. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.79>
- Bertranda, R. L. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*, 201(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00697-18/ASSET/145372C7-51F7-496C-8CF6-00350CEC2C46/ASSETS/GRAPHIC/JB.00697-18-F0007.JPEG>
- Bhogoju, S., & Nahashon, S. (2022). Recent Advances in Probiotic Application in Animal Health and Nutrition: A Review. *Agriculture* 2022, Vol. 12, Page 304, 12(2), 304. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE12020304>
- Blake, A. B., Cigarroa, A., Klein, H. L., Khattab, M. R., Keating, T., Van De Coevering, P., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2020). Developmental stages in microbiota, bile acids, and clostridial species in healthy puppies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(6), 2345–2356. <https://doi.org/10.1111/JVIM.15928>
- Blake, A. B., & Suchodolski, J. S. (2016). Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Animal Frontiers*, 6(3), 37–42. <https://doi.org/10.2527/AF.2016-0032>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2022). Carbohydrates. *Medical Biochemistry*, 77–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91599-1.00009-2>

- Bodzen, A., Jossier, A., Dupont, S., Mousset, P. Y., Beney, L., Lafay, S., & Gervais, P. (2021). Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnology*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12896-021-00726-2/FIGURES/4>
- Botigué, L. R., Song, S., Scheu, A., Gopalan, S., Pendleton, A. L., Oetjens, M., Taravella, A. M., Seregély, T., Zeeb-Lanz, A., Arbogast, R. M., Bobo, D., Daly, K., Unterländer, M., Burger, J., Kidd, J. M., & Veeramah, K. R. (2017). Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms16082>
- Bottero, E., Ferriani, R., Benvenuti, E., Ruggiero, P., Astorina, S., Giraldi, M., Bertoldi, L., Benvenuto, G., Sattin, E., Gianella, P., & Suchodolski, J. S. (2022). Clinical evaluation and microbiota analysis in 9 dogs with antibiotic-responsive enteropathy: A prospective comparison study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(4), 1220. <https://doi.org/10.1111/JVIM.16443>
- Brabec, T., Schwarzer, M., Kovacova, K., Dobesova, M., Schierova, D., Brezina, J., Pacakova, I., Srutkova, D., Ben-Nun, O., & Goldfarb, Y. (2022). Epithelial antigen presentation controls commensal-specific intraepithelial T-cells in the gut. *BioRxiv*, 2022–2028.
- Bresciani, F., Minamoto, Y., Suchodolski, J. S., Galiazzo, G., Vecchiato, C. G., Pinna, C., Biagi, G., & Pietra, M. (2018). Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1903–1910. <https://doi.org/10.1111/JVIM.15227>
- Broeckx, G., Kiekens, S., Jokicevic, K., Byl, E., Henkens, T., Vandenneuvel, D., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2019). Effects of initial cell concentration, growth phase, and process parameters on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying. *https://Doi.Org/10.1080/07373937.2019.1648290*, 38(11), 1474–1492. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1648290>
- Brown, A. C., & Valiere, A. (2004). Probiotics and Medical Nutrition Therapy. *Nutrition in Clinical Care : An Official Publication of Tufts University*, 7(2), 56. [/pmc/articles/PMC1482314/](https://pmc/articles/PMC1482314/)

Bubnov, R. V., Babenko, L. P., Lazarenko, L. M., Mokrozub, V. V., & Spivak, M. Y. (2018). Specific properties of probiotic strains: relevance and benefits for the host. *The EPMA Journal*, *9*(2), 205.

<https://doi.org/10.1007/S13167-018-0132-Z>

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467–483.

<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.12.031>

Busse, M. (1995). De man, rogosa and sharpe (MRS) agar. *Progress in Industrial Microbiology*, *34*(C), 362–363. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(05\)80056-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(05)80056-6)

Cao, F., Jin, L., Gao, Y., Ding, Y., Wen, H., Qian, Z., Zhang, C., Hong, L., Yang, H., Zhang, J., Tong, Z., Wang, W., Chen, X., & Mao, Z. (2023). Artificial-enzymes-armed *Bifidobacterium longum* probiotics for alleviating intestinal inflammation and microbiota dysbiosis. *Nature Nanotechnology* *2023* *18*:6, *18*(6), 617–627. <https://doi.org/10.1038/s41565-023-01346-x>

Cayra, E., Dávila, J. H., Villalta, J. M., & Rosales, Y. (2017). Evaluación de la estabilidad y viabilidad de dos cepas probióticas microencapsuladas por lecho fluidizado. *Informacion Tecnologica*, *28*(6), 35–44.

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000600005>

ChemSketch (1.2). (2021). Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs).

Chen, B., Wang, X., Li, P., Feng, X., Mao, Z., Wei, J., Lin, X., Li, X., & Wang, L. (2023). Exploring the protective effects of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* under optimized cryoprotectants formulation. *LWT*, *173*, 114295. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114295>

Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018). Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG), 365192. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01963/BIBTEX>

- Chun, J. L., Ji, S. Y., Lee, S. D., Lee, Y. K., Kim, B., & Kim, K. H. (2020). Difference of gut microbiota composition based on the body condition scores in dogs. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(2), 239. <https://doi.org/10.5187/JAST.2020.62.2.239>
- Coelho, L. P., Kultima, J. R., Costea, P. I., Fournier, C., Pan, Y., Czarnecki-Maulden, G., Hayward, M. R., Forslund, S. K., Schmidt, T. S. B., Descombes, P., Jackson, J. R., Li, Q., & Bork, P. (2018). Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome*, 6(1), 72. <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0450-3/FIGURES/4>
- Colombo, J., & Arena, A. (2016). Probiotics in Invasive Candidiasis. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, 641–653. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00048-4>
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9903/>
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1024–1039. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02219.X>
- Cristofori, F., Dargenio, V. N., Dargenio, C., Miniello, V. L., Barone, M., & Francavilla, R. (2021). Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.578386>
- Cuervo-Zanatta, D., Perez-Grijalva, B., González-Magaña, E., Hernandez-Acosta, J., Murugesan, S., García-Mena, J., & Perez-Cruz, C. (2021). Modulation of the microbiota-gut-brain axis by bioactive food, prebiotics, and probiotics decelerates the course of Alzheimer's disease. *Studies in Natural Products Chemistry*, 70, 51–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819489-8.00019-3>
- Cuscó, A., Pérez, D., Viñes, J., Fàbregas, N., & Francino, O. (2022). Novel canine high-quality metagenome-assembled genomes, prophages and host-associated plasmids provided by long-read

metagenomics together with Hi-C proximity ligation. *Microbial Genomics*, 8(3), 802.

<https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000802>

Dandrieux, J., Martinez Lopez, L. M., Prakash, N., & Mansfield, C. S. (2019). Treatment response and long term follow up in nineteen dogs diagnosed with chronic enteropathy in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 97(9), 301–307. <https://doi.org/10.1111/AVJ.12846>

Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., & Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, 2(2), 100185.

<https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100185>

Davoodi, S., & Foley, E. (2019). Host-Microbe-Pathogen Interactions: A Review of *Vibrio cholerae* Pathogenesis in *Drosophila*. *Frontiers in Immunology*, 10, 3128.

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.03128>

Day, M. (2011). *Clinical immunology of the dog and cat* (Manson Publishing/The Veterinary Press, Ed.; 2nd ed.). CRC Press.

de Jonge, N., Carlsen, B., Christensen, M. H., Pertoldi, C., & Nielsen, J. L. (2022). The Gut Microbiome of 54 Mammalian Species. *Frontiers in Microbiology*, 13, 886252.

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.886252/BIBTEX>

Degruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(5), 1137.

<https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>

Delgado, S., Sánchez, B., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., & Ruiz, L. (2020). Molecules Produced by Probiotics and Intestinal Microorganisms with Immunomodulatory Activity. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 391*, 12(2), 391. <https://doi.org/10.3390/NU12020391>

- Demers-Mathieu, V. (2022). The immature intestinal epithelial cells in preterm infants play a role in the necrotizing enterocolitis pathogenesis: A review. *Health Sciences Review*, 4, 100033.
<https://doi.org/10.1016/J.HSR.2022.100033>
- Dempsey, E., & Corr, S. C. (2022). Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.840245>
- Deschamps, C., Denis, S., Humbert, D., Zentek, J., Priymenko, N., Apper, E., & Blanquet-Diot, S. (2022). In vitro models of the canine digestive tract as an alternative to in vivo assays: Advances and current challenges. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 39(2), 235–257.
<https://doi.org/10.14573/ALTEX.2109011>
- Dodd, C. S., & Grueber, C. E. (2021). Functional Diversity within Gut Microbiomes: Implications for Conserving Biodiversity. *Conservation 2021, Vol. 1, Pages 311-326*, 1(4), 311–326.
<https://doi.org/10.3390/CONSERVATION1040024>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1002601107/SUPPL_FILE/PNAS.201002601SI.PDF
- Dominy, N. J. (2015). Ferment in the family tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), 308. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1421566112>
- Donaldson, D. S., Else, K. J., & Mabbott, N. A. (2015). The Gut-Associated Lymphoid Tissues in the Small Intestine, Not the Large Intestine, Play a Major Role in Oral Prion Disease Pathogenesis. *Journal of Virology*, 89(18), 9532–9547. <https://doi.org/10.1128/JVI.01544-15>
- Dong, C., & Flavell, R. A. (2000). Cell fate decision: T-helper 1 and subsets in immune responses. *Arthritis Research*, 2(3), 179–188. <https://doi.org/10.1186/AR85/FIGURES/1>

- Dong, H., Rowland, I., & Yaqoob, P. (2012). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition*, *108*(3), 459–470.
<https://doi.org/10.1017/S0007114511005824>
- Doron, L., Copenhagen-Glazer, S., Ibrahim, Y., Eini, A., Naor, R., Rosen, G., & Bachrach, G. (2014). Identification and Characterization of Fusolisin, the *Fusobacterium nucleatum* Autotransporter Serine Protease. *PLOS ONE*, *9*(10), e111329. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0111329>
- Drossman, D. A. (2016). Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. *Gastroenterology*, *150*(6), 1262-1279.e2.
<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.02.032>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356.
https://doi.org/10.1021/AC60111A017/ASSET/AC60111A017.FP.PNG_V03
- Duedu, K. O., & French, C. E. (2017). Data for discriminating dead/live bacteria in homogenous cell suspensions and the effect of insoluble substrates on turbidimetric measurements. *Data in Brief*, *12*, 169–174. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2017.04.003>
- Durack, J., & Lynch, S. V. (2019). The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(1), 20–40. <https://doi.org/10.1084/JEM.20180448>
- Eissa, N., Kittana, H., Gomes-Neto, J. C., & Hussein, H. (2019). Mucosal immunity and gut microbiota in dogs with chronic enteropathy. *Research in Veterinary Science*, *122*, 156–164.
<https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2018.11.019>
- Ericsson, A. C. (2019). The use of non-rodent model species in microbiota studies. *Laboratory Animals*, *53*(3), 259. <https://doi.org/10.1177/0023677219834593>
- Fajgenbaum, D. C., & June, C. H. (2020). Cytokine Storm. *The New England Journal of Medicine*, *383*(23), 2255. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA2026131>

FAO, & WHO. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria* Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization.

FAO/WHO. (2006). *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*.
FAO.

Fathima, S., Hakeem, W. G. Al, Shanmugasundaram, R., & Selvaraj, R. K. (2022). Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Review on the Pathogen, Pathogenesis, and Prevention. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 1958, 10(10), 1958. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10101958>

Feng, T., & Elson, C. O. (2011). Adaptive immunity in the host–microbiota dialog. *Mucosal Immunology*, 4(1), 15–21. <https://doi.org/10.1038/MI.2010.60>

Fenimore, A., Martin, L., & Lappin, M. R. (2017). Evaluation of Metronidazole With and Without Enterococcus Faecium SF68 in Shelter Dogs With Diarrhea. *Topics in Companion Animal Medicine*, 32(3), 100–103. <https://doi.org/10.1053/J.TCAM.2017.11.001>

Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Laursen, R. R., & Ouwehand, A. C. (2019). The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*, 7(3).
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7030083>

Fernández, L., Martínez, R., Pérez, M., Arroyo, R., & Rodríguez, J. M. (2019). Characterization of lactobacillus rhamnosus MP01 and lactobacillus plantarum MP02 and assessment of their potential for the prevention of gastrointestinal infections in an experimental canine model. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 443408. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01117/BIBTEX>

Fernández-Lázaro, D., Sánchez-Serrano, N., Rabail, R., Aadil, R. M., Mielgo-Ayuso, J., Radesca Fabiano, K., & Garrosa, E. (2023). Is Probiotics Supplementation an Appropriate Strategy to Modulate

- Inflammation in Physically Active Healthy Adults or Athletes? A Systematic Review. *Applied Sciences* 2023, Vol. 13, Page 3448, 13(6), 3448. <https://doi.org/10.3390/APP13063448>
- Fitzgibbon, G., & Mills, K. H. G. (2020). The microbiota and immune-mediated diseases: Opportunities for therapeutic intervention. *European Journal of Immunology*, 50(3), 326–337. <https://doi.org/10.1002/EJI.201948322>
- Flores, L. (2022). Efectividad de un trasplante de microbiota fecal en Canis lupus familiaris diagnosticados con parvovirus canino en el Centro Médico Veterinario Vet Life. *Universidad Nacional de Tumbes*. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/63718>
- Fornai, F., Coli, A., Prinetto, D., & Giannessi, E. (2023). Wolf and Dog: What Differences Exist? *Anatomia* 2023, Vol. 2, Pages 78-87, 2(1), 78–87. <https://doi.org/10.3390/ANATOMIA2010007>
- Fu, N., Huang, S., Xiao, J., & Chen, X. D. (2018). Producing Powders Containing Active Dry Probiotics With the Aid of Spray Drying. *Advances in Food and Nutrition Research*, 85, 211–262. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2018.02.003>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Ganger, M. T., Dietz, G. D., & Ewing, S. J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12859-017-1949-5>
- García-Mazcorro, J. F., & Minamoto, Y. (2013). Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros: una revisión breve. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45, 111–124. <https://www.scielo.cl/pdf/amv/v45n2/art02.pdf>
- Garrigues, Q., Apper, E., Chastant, S., & Mila, H. (2022). Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.964649>

- Ge, Y., Zhu, W., Chen, L., Li, D., Li, Q., & Jie, H. (2021). The maternal milk microbiome in mammals of different types and its potential role in the neonatal gut microbiota composition. *Animals*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/ANI11123349/S1>
- Gebre, T. S., Emire, S. A., Chelliah, R., Aloo, S. O., & Oh, D.-H. (2023). Isolation, functional activity, and safety of probiotics from Ethiopian traditional cereal-based fermented beverage, “Borde.” *LWT*, *184*, 115076. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115076>
- Gerasimov, S. V., Ivantsiv, V. A., Bobryk, L. M., Tsitsura, O. O., Dedyshin, L. P., Guta, N. V., & Yandyo, B. V. (2015). Role of short-term use of *L. acidophilus* DDS-1 and *B. lactis* UABLA-12 in acute respiratory infections in children: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* *2016* *70*:4, *70*(4), 463–469. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.171>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312827/S1>
- Gilliland, S. E. (2003). Probiotics. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4792–4798. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00974-3>
- Gómez-Gallego, C., Junnila, J., Männikkö, S., Hämeenoja, P., Valtonen, E., Salminen, S., & Beasley, S. (2016). A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study. *Veterinary Microbiology*, *197*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.11.015>
- Gong, P., Di, W., Yi, H., Sun, J., Zhang, L., & Han, X. (2019). Improved viability of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* sp1.1 embedded in acidic-basic proteins treated with transglutaminase. *Food Chemistry*, *281*, 204–212. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.095>

- Goulopoulou, S., McCarthy, C. G., & Clinton Webb, R. (2016). Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. *Pharmacological Reviews*, 68(1), 142–167.
<https://doi.org/10.1124/PR.114.010090>
- Grande, F., Utrera, A., & De Oya, J. (1953). *La reacción de la antrona en la determinación de los hidratos de carbono* (Vol. 1).
- Grumet, L., Tromp, Y., & Stiegelbauer, V. (2020a). The Development of High-Quality Multispecies Probiotic Formulations: From Bench to Market. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 2453, 12(8), 2453.
<https://doi.org/10.3390/NU12082453>
- Grumet, L., Tromp, Y., & Stiegelbauer, V. (2020b). The Development of High-Quality Multispecies Probiotic Formulations: From Bench to Market. *Nutrients*, 12(8), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/NU12082453>
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015a). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2015.04.002>
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015b). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2015.04.002>
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015c). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, 34, 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2015.04.002>
- Guard, B. C., Barr, J. W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J. M., Vanamala, J., & Suchodolski, J. S. (2015). Characterization of Microbial Dysbiosis and Metabolomic Changes in Dogs with Acute Diarrhea. *PLOS ONE*, 10(5), e0127259.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127259>
- Guard, B. C., Mila, H., Steiner, J. M., Mariani, C., Suchodolski, J. S., & Chastant-Maillard, S. (2017). Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLOS ONE*, 12(4), e0175718. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0175718>

- Gubelt, A., Blaschke, L., Hahn, T., Rupp, S., Hirth, T., & Zibek, S. (2020). Comparison of Different Lactobacilli Regarding Substrate Utilization and Their Tolerance Towards Lignocellulose Degradation Products. *Current Microbiology*, 77(10), 3136–3146. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-02131-Y/TABLES/3>
- Guzzo, G. L., Andrews, J. M., & Weyrich, L. S. (2022). The Neglected Gut Microbiome: Fungi, Protozoa, and Bacteriophages in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 28(7), 1112. <https://doi.org/10.1093/IBD/IZAB343>
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth Rates Made Easy. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), 232–238. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MST187>
- Hallen, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140>
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W. P., Pfeifer, A. M. A., Schiffrin, E. J., & Blum, S. (2000). Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*, 47(1), 79–87. <https://doi.org/10.1136/GUT.47.1.79>
- Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, G. R., & Bruck, W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of the word ‘probiotic.’ *British Journal of Nutrition*, 90(4), 845–845. <https://doi.org/10.1079/BJN2003954>
- Hand, D., Wallis, C., Colyer, A., & Penn, C. W. (2013). Pyrosequencing the Canine Faecal Microbiota: Breadth and Depth of Biodiversity. *PLOS ONE*, 8(1), e53115. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053115>
- Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(2), 301–310. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2011.01058.X>

- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 140.
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2017.08.004>
- Herath, S., Dai, H., Erlich, J., Au, A. Y. M., Taylor, K., Succar, L., & Endre, Z. H. (2020). Selection and validation of reference genes for normalisation of gene expression in ischaemic and toxicological studies in kidney disease. *PLOS ONE*, *15*(5), e0233109.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233109>
- Hernandez, J., Rhimi, S., Kriaa, A., Mariaule, V., Boudaya, H., Drut, A., Jablaoui, A., Mkaouar, H., Saidi, A., Biourge, V., Borgi, M. A., Rhimi, M., & Maguin, E. (2022). Domestic Environment and Gut Microbiota: Lessons from Pet Dogs. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 949, *10*(5), 949.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10050949>
- Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals* 2021, Vol. 11, Page 979, *11*(4), 979. <https://doi.org/10.3390/ANI11040979>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014 *11*:8, *11*(8), 506–514.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hirota, M., Ohmuraya, M., & Baba, H. (2006). The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *Journal of Gastroenterology*, *41*(9), 832–836.
<https://doi.org/10.1007/S00535-006-1874-2>

- Hoegenauer, C., Hammer, H. F., Mahnert, A., & Moissl-Eichinger, C. (2022). Methanogenic archaea in the human gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2022 19:12, 19(12), 805–813. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00673-z>
- Honneffer, J. B., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., & Suchodolski, J. S. (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, 13(3), 1–20. <https://doi.org/10.1007/S11306-017-1165-3/FIGURES/4>
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115–1118. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1058709/ASSET/22B499CA-FA5E-4AB4-9CCD-118DE55A4721/ASSETS/GRAPHIC/SE1719399003.JPEG>
- Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z. S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Huang, L., Shen, M., Morris, G. A., & Xie, J. (2019). Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.08.008>
- Huang, Z., Pan, Z., Yang, R., Bi, Y., & Xiong, X. (2020). The canine gastrointestinal microbiota: early studies and research frontiers. *Gut Microbes*, 11(4), 635. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1704142>
- Hutchinson, A. N., Tingö, L., & Brummer, R. J. (2020). The Potential Effects of Probiotics and ω -3 Fatty Acids on Chronic Low-Grade Inflammation. *Nutrients*, 12(8), 2402. <https://doi.org/10.3390/NU12082402>
- Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E. J., & Von der Weid, T. (2003). Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro. *Infection and Immunity*, 71(1), 428–436. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.428-436.2003/ASSET/8CACE8CF-35E9-4D63-9B42-E64FEFA4CF5A/ASSETS/GRAPHIC/II0130756006.JPEG>

- Ishii, P. E., Suchodolski, J. S., Duarte, R., Pereira, A. R. C., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., & Giaretta, P. R. (2022). Detection of invasive *Escherichia coli* in dogs with granulomatous colitis using immunohistochemistry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 34(6), 990–994. <https://doi.org/10.1177/10406387221119712>
- Ito, T., Connett, J. M., Kunkel, S. L., & Matsukawa, A. (2013). The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. *Frontiers in Immunology*, 4(JAN), 40098. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00010/BIBTEX>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/NI.3123>
- Jaishankar, J., & Srivastava, P. (2017). Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02000>
- Jakubczyk, D., Leszczyńska, K., & Górka, S. (2020). The Effectiveness of Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD)—A Critical Review. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 1973*, 12(7), 1973. <https://doi.org/10.3390/NU12071973>
- Jalali, M., Abedi, D., Varshosaz, J., Najjarzadeh, M., Mirlohi, M., & Tavakoli, N. (2012). Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 31. [/pmc/articles/PMC3500555/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2350555/)
- Jeon, H. J., Kim, J., Seok, W. Y., Kim, G. S., Choi, B., Shin, M., Lee, J. H., Kim, Y., Yang, J., & Jung, Y. H. (2023). Changes in the metabolome of probiotics during the stationary phase increase resistance to lyophilization. *Food Bioscience*, 53, 102499. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102499>
- Jiménez, E., Manzano, S., Schlembach, D., Arciszewski, K., Martin, R., Ben Amor, K., Roelofs, M., Knol, J., Rodríguez, J. M., & Abou-Dakn, M. (2021). *Ligilactobacillus salivarius* PS2 Supplementation during

- Pregnancy and Lactation Prevents Mastitis: A Randomised Controlled Trial. *Microorganisms*, 9(9).
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9091933>
- Jurado-Gómez, H., Calpa-Yama, F., & Chaspuengal-Tulcán, A. (2014). Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61(3), 241–257.
<https://doi.org/10.15446/RFMVZ.V61N3.46872>
- Jyoti, B. D., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (2004). Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate. *Microbiological Research*, 159(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2004.01.008>
- Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W., & Hansbro, P. M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 123(3), 326.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2007.02719.X>
- Kajdič, L., Plavec, T., Zdovc, I., Kalin, A., & Pipan, M. Z. (2021). Impact of Type of Parturition on Colostrum Microbiota Composition and Puppy Survival. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(7).
<https://doi.org/10.3390/ANI11071897>
- Kałużna, A., Olczyk, P., & Komosińska-Vassev, K. (2022). The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in the Pathogenesis and Development of the Inflammatory Response in Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Medicine*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/JCM11020400>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/FFT2.44>
- Kao, D., Roach, B., Silva, M., Beck, P., Rioux, K., Kaplan, G. G., Chang, H. J., Coward, S., Goodman, K. J., Xu, H., Madsen, K., Mason, A., Wong, G. K. S., Jovel, J., Patterson, J., & Louie, T. (2017). Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent Clostridium

difficile Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318(20), 1985–1993.

<https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.17077>

Karmacharya, D., Manandhar, P., Manandhar, S., Sherchan, A. M., Sharma, A. N., Joshi, J., Bista, M., Bajracharya, S., Awasthi, N. P., Sharma, N., Llewellyn, B., Waits, L. P., Thapa, K., Kelly, M. J., Vuyisich, M., Starkenburg, S. R., Hero, J. M., Hughes, J., Wultsch, C., ... Sinha, A. K. (2019). Gut microbiota and their putative metabolic functions in fragmented Bengal tiger population of Nepal. *PLoS ONE*, 14(8).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0221868>

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7.
<https://doi.org/10.5402/2013/481651>

Kelley, R. L., Minikhiem, D., Kiely, B., & O'Mahony, L. (2009). Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Veterinary Journal*, 10(3), 121–130.

Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P., & Kapila, R. (2014). Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 303–319.
<https://doi.org/10.1111/JAM.12521>

Konstantinidis, A. O., Adamama-Moraitou, K. K., Pardali, D., Dovas, C. I., Brellou, G. D., Papadopoulos, T., Jergens, A. E., Allenspach, K., & Rallis, T. S. (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(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0245713>

Kowalska, E., Ziarno, M., Ekielski, A., & Żelaziński, T. (2022). Materials Used for the Microencapsulation of Probiotic Bacteria in the Food Industry. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 3321, 27(10), 3321.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27103321>

- Krautkramer, K. A., Fan, J., & Bäckhed, F. (2020). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:2, 19(2), 77–94.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0438-4>
- Krokida, M. (2017). Principles and Applications of Encapsulation Technologies to Food Materials. *Thermal and Nonthermal Encapsulation Methods*, 1–37. <https://doi.org/10.1201/9781315267883-1>
- Krzywonos, M., & Eberhard, T. (2011). High density process to cultivate *Lactobacillus plantarum* biomass using wheat stillage and sugar beet molasses. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(2).
<https://doi.org/10.2225/VOL14-ISSUE2-FULLTEXT-10>
- Kubinyi, E., Bel Rhali, S., Sándor, S., Szabó, A., & Felföldi, T. (2020). Gut Microbiome Composition is Associated with Age and Memory Performance in Pet Dogs. *Animals* 2020, Vol. 10, Page 1488, 10(9), 1488. <https://doi.org/10.3390/ANI10091488>
- Kumar, C. G., Sripada, S., & Poornachandra, Y. (2018). Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, 451–503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00014-0>
- Kumar, S., Pattanaik, A. K., Sharma, S., Gupta, R., Jadhav, S. E., & Dutta, N. (2017). Comparative assessment of canine-origin *Lactobacillus johnsonii* CPN23 and dairy-origin *Lactobacillus acidophilus* NCDC 15 for nutrient digestibility, faecal fermentative metabolites and selected gut health indices in dogs. *Journal of Nutritional Science*, 6. <https://doi.org/10.1017/JNS.2017.35>
- Kumar, S., Pattanaik, A., Sharma, S., & Jadhav, S. (2016). Species-specific probiotic *Lactobacillus johnsonii* CPN23 supplementation modulates blood biochemical profile and erythrocytic antioxidant indices in Labrador dogs. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 86(8).
<https://doi.org/10.56093/IJANS.V86I8.60815>

- Kunes, M., & Kvetina, J. (2016). Probiotics: Preclinical Testing for Verification of Their Gastrointestinal Effectiveness. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 799–810. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00056-5>
- Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Risbo, J., & Skibsted, L. H. (2009). Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*, 58(2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2008.12.001>
- Kwok, K. O., Fries, L. R., Silva-Zolezzi, I., Thakkar, S. K., Iroz, A., & Blanchard, C. (2022). Effects of Probiotic Intervention on Markers of Inflammation and Health Outcomes in Women of Reproductive Age and Their Children. *Frontiers in Nutrition*, 9, 889040. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.889040>
- La Fata, G., Weber, P., & Mohajeri, M. H. (2018). Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/S12602-017-9322-6/TABLES/3>
- Lanara, L. de R. A. (1981). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. *li-Métodos Físico e Químicos. Mel. Ministério Da Agricultura. Brasília*, 2(25), 1–15.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., Van Den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Hansen, L. H., & Jakobsen, M. (2010). Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLOS ONE*, 5(2), e9085. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009085>
- Lau, H. C.-H. (2023). Gut Microbiome in Health and Gastrointestinal Cancer. *Microbiome in Gastrointestinal Cancer*, 5–21. https://doi.org/10.1007/978-981-19-4492-5_2/COVER
- Laukoetter, M. G., Nava, P., & Nusrat, A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(3), 401. <https://doi.org/10.3748/WJG.14.401>
- Lecuit, M., & Eloit, M. (2017). The Viruses of the Gut Microbiota. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00021-5>

- Lee, D., Goh, T. W., Kang, M. G., Choi, H. J., Yeo, S. Y., Yang, J., Huh, C. S., Kim, Y. Y., & Kim, Y. (2022a). Perspectives and advances in probiotics and the gut microbiome in companion animals. *Journal of Animal Science and Technology*, *64*(2), 197. <https://doi.org/10.5187/JAST.2022.E8>
- Lee, D., Goh, T. W., Kang, M. G., Choi, H. J., Yeo, S. Y., Yang, J., Huh, C. S., Kim, Y. Y., & Kim, Y. (2022b). Perspectives and advances in probiotics and the gut microbiome in companion animals. *Journal of Animal Science and Technology*, *64*(2), 197. <https://doi.org/10.5187/JAST.2022.E8>
- Lee, W., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology* *2014 10:6*, *10*(6), 416–424. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
- Leeming, E. R., Johnson, A. J., Spector, T. D., & Roy, C. I. L. (2019). Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/NU11122862>
- Levin, D., Raab, N., Pinto, Y., Rothschild, D., Zanir, G., Godneva, A., Mellul, N., Futorian, D., Gal, D., Leviatan, S., Zeevi, D., Bachelet, I., & Segal, E. (2021). Diversity and functional landscapes in the microbiota of animals in the wild. *Science (New York, N.Y.)*, *372*(6539). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB5352>
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008a). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* *2008 6:10*, *6*(10), 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008b). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* *2008 6:10*, *6*(10), 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>
- Li, E., & Mira De Orduña, R. (2010). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*, *50*(3), 283–288. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2009.02789.X>

- Li, P., Zhang, Y., Xu, Y., Cao, H., & Li, L. (2022). Characteristics of CD8+ and CD4+ Tissue-Resident Memory Lymphocytes in the Gastrointestinal Tract. *Advanced Gut & Microbiome Research*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/9157455>
- López-Osorio, S., Penagos-Tabares, F., & Chaparro-Gutiérrez, J. J. (2020). Prevalence of *Toxocara* spp. in dogs and cats in South America (excluding Brazil). *Advances in Parasitology*, 109, 743–778. <https://doi.org/10.1016/BS.APAR.2020.01.029>
- Lucena, R., Novales, M., Blanco, B., Hernández, E., & Ginel, P. J. (2019). Effect of probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on liver function in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), 2628–2634. <https://doi.org/10.1111/JVIM.15625>
- Maggi, R. G., & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites & Vectors* 2019 12:1, 12(1), 1–37. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3407-X>
- Maheshwari, A. (2022). The Phylogeny, Ontogeny, and Organ-specific Differentiation of Macrophages in the Developing Intestine. *Newborn (Clarksville, Md.)*, 1(4), 340. <https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-11002-0044>
- Malina, C., Yu, R., Bjorkerth, J., Kerkhoven, E. J., & Nielsen, J. (2021). Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(51), e2112836118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2112836118/SUPPL_FILE/PNAS.2112836118.SD04.XLSX
- Manojlović, V., Nedović, V. A., Kailasapathy, K., & Zuidam, N. J. (2010). Encapsulation of probiotics for use in food products. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 269–302. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_10/COVER
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific

- Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021 18:3, 18(3), 196–208.
<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
- Marelli, S. P., Fusi, E., Giardini, A., Martino, P. A., Polli, M., Bruni, N., & Rizzi, R. (2020). Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) on the nutritional and health status of boxer dogs. *The Veterinary Record*, 187(4), E28. <https://doi.org/10.1136/VR.105434>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S13099-018-0250-0/METRICS>
- Markowiak-Kopeć, P., & Ślizewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 1107, 12(4), 1107.
<https://doi.org/10.3390/NU12041107>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(2), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/S13223-018-0278-1/TABLES/4>
- Martin, R., Makino, H., Yavuz, A. C., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., & Knol, J. (2016). Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One*, 11(6).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0158498>
- Martín, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010). Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *The Veterinary Journal*, 185(2), 193–198. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.04.014>
- Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Yamada, A., & Hirayama, K. (2017). Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 36(1), 27. <https://doi.org/10.12938/BMFH.BMFH-2016-021>

- Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K., & Kato, H. (2002). Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *8*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/S101560200005>
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. In *Cells* (Vol. 12, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
- Mejia-Gomez, C. E., & Balcázar, N. (2020). Isolation, characterisation and continuous culture of *Lactobacillus* spp. and its potential use for lactic acid production from whey. *Food Science and Technology*, *40*(4), 1021–1028. <https://doi.org/10.1590/FST.29619>
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F. M., & Yliperttula, M. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release*, *336*, 480–498. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.06.042>
- Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. W. Heinemann, London, 161–183.
- Middelbos, I. S., Boler, B. M. V., Qu, A., White, B. A., Swanson, K. S., & Fahey, G. C. (2010). Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLOS ONE*, *5*(3), e9768. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009768>
- Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M. E., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2014). Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, *174*(3–4), 463–473. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2014.10.005>

- Misra, S., Pandey, P., Panigrahi, C., & Mishra, H. N. (2023). A comparative approach on the spray and freeze drying of probiotic and Gamma-aminobutyric acid as a single entity: Characterization and evaluation of stability in simulated gastrointestinal conditions. *Food Chemistry Advances*, 3, 100385. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHA.2023.100385>
- Miyauchi, E., Shimokawa, C., Steimle, A., Desai, M. S., & Ohno, H. (2022). The impact of the gut microbiome on extra-intestinal autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology* 2022 23:1, 23(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00727-y>
- Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M. T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, 40, 391–399. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.11.016>
- Mokrozub, V. V., Lazarenko, L. M., Sichel, L. M., Babenko, L. P., Lytvyn, P. M., Demchenko, O. M., Melnichenko, Y. O., Boyko, N. V., Biavati, B., Di Gioia, D., Bubnov, R. V., & Spivak, M. Y. (2015). The role of beneficial bacteria wall elasticity in regulating innate immune response. *EPMA Journal*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13167-015-0035-1/TABLES/4>
- Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M., & Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 253. <https://doi.org/10.4314/OVJ.V9I3.10>
- Montague, B., Summers, A., Bhawal, R., Anderson, E. T., Kraus-Malett, S., Zhang, S., & Goggs, R. (2022). Identifying potential biomarkers and therapeutic targets for dogs with sepsis using metabolomics and lipidomics analyses. *PLOS ONE*, 17(7), e0271137. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0271137>

- Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *MicrobiologyOpen*, 7(5), e00677. <https://doi.org/10.1002/MBO3.677>
- Moran, N. A., Ochman, H., & Hammer, T. J. (2019). Evolutionary and ecological consequences of gut microbial communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 50(1), 451. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-110617-062453>
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, 14(4), 793–802. <https://doi.org/10.1038/S41385-021-00389-4>
- More, S. A., Patil, S. S., Kakanur, M., Thakur, R., Nayak, M. N., & Kumar, S. R. (2018). A quantitative analysis of total carbohydrate content from the salivary expectorants in young children. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 36(1), 53–57. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_153_17
- Morelli, G., Patuzzi, I., Losasso, C., Ricci, A., Contiero, B., Andrighetto, I., & Ricci, R. (2022). Characterization of intestinal microbiota in normal weight and overweight Border Collie and Labrador Retriever dogs. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13270-6>
- Mota-Rojas, D., Calderón-Maldonado, N., Lezama-García, K., Sepiurka, L., & De Cassia Maria Garcia, R. (2021). Abandonment of dogs in Latin America: Strategies and ideas. *Veterinary World*, 14(9), 2371. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.2371-2379>
- Mota-Rojas, D., Strappini, A., Whittaker, A. L., Ghezzi, M., Titto, C. G., Calderón-Maldonado, N., Mora-Medina, P., Domínguez-Oliva, A., Gómez-Prado, J., Hernández-Ávalos, I., José-Pérez, N., Casas-Alvarado, A., & Orihuela, A. (2023). Controversial Topics in Animal Welfare in Latin America: A Focus on the Legislation Surrounding the Human-Companion Animal Relationship and Animals Used for

- Recreational Practices. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 13(9), 1463.
<https://doi.org/10.3390/ANI13091463>
- Moumita, S., Das, B., Hasan, U., & Jayabalan, R. (2018). Effect of long-term storage on viability and acceptability of lyophilized and spray-dried synbiotic microcapsules in dry functional food formulations. *LWT*, 96, 127–132. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.05.030>
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology* 2014 14:10, 14(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Mysore, J. V., Parry, N. M. A., & Chilton, J. A. (2023). The alimentary system of the non-human primate. *Spontaneous Pathology of the Laboratory Non-Human Primate*, 83–120.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813088-9.00010-0>
- Navarro, P. (2022). *Growth pet population in Latin America 2022* . Statista.
<https://www.statista.com/statistics/1185191/latin-america-pet-population/>
- Newberry, R. D., & Gustafsson, J. K. (2016). Anatomy and Function of the Gut Immune System. *Encyclopedia of Immunobiology*, 3, 427–433. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.07006-5>
- Nguyen, T. H., Kim, J. S., Kwon, H. J., & Kang, C. H. (2023). The Effect of a Glutathione (GSH)-Containing Cryo-Protectant on the Viability of Probiotic Cells Using a Freeze-Drying Process. *Fermentation* 2023, Vol. 9, Page 187, 9(2), 187. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9020187>
- Nikolakis, D., de Voogd, F. A. E., Pruijt, M. J., Grootjans, J., van de Sande, M. G., & D’haens, G. R. (2022). The Role of the Lymphatic System in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS23031854>
- Nualkaekul, S., Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2012). Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International*, 48(2), 627–633. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.06.003>

- Oluwatosin, S. O., Tai, S. L., & Fagan-Endres, M. A. (2022). Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. *Biotechnology Reports*, 33, e00696. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2021.E00696>
- Ostrander, E. A., & Wayne, R. K. (2001). Canine Genetics. *Encyclopedia of Genetics*, 264–270. <https://doi.org/10.1006/RWGN.2001.0374>
- Ou, B. S., Saouaf, O. M., Baillet, J., & Appel, E. A. (2022). Sustained delivery approaches to improving adaptive immune responses. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 187, 114401. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2022.114401>
- Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., & Cominelli, F. (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 454–459. https://doi.org/10.1073/PNAS.0910307107/SUPPL_FILE/PNAS.200910307SI.PDF
- Pahumunto, N., Duangnumswang, Y., & Teanpaisan, R. (2022). Effects of potential probiotics on the expression of cytokines and human β -defensins in human gingival epithelial cells and in vivo efficacy in a dog model. *Archives of Oral Biology*, 142, 105513. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2022.105513>
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim Nutr Health*, 29, 4–8.
- Patel, B., Raval, S., Bhanderi, B., & Limbachiya, B. (2018). Prevalence of Bacteriological Isolates Recovered from Faecal Sample of Domestic Cats. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(08), 3943–3949. <https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2018.708.406>
- Pelton, R. (2020). Postbiotic Metabolites: How Probiotics Regulate Health. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 19(1), 25. [/pmc/articles/PMC7238912/](https://doi.org/10.1089/im.2019.19.1.25)
- Perini, M. P., Pedrinelli, V., Marchi, P. H., Henríquez, L. B. F., Zafalon, R. V. A., Vendramini, T. H. A., Balieiro, J. C. de C., & Brunetto, M. A. (2023). Potential Effects of Prebiotics on Gastrointestinal and

- Immunological Modulation in the Feeding of Healthy Dogs: A Review. *Fermentation* 2023, Vol. 9, Page 693, 9(7), 693. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9070693>
- Perri, A. (2014). Dog: Domestication. *Encyclopedia of Global Archaeology*, 2162–2165. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0465-2_2204
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1), 70–89. <https://doi.org/10.1111/IMR.12567>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2021). The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 51(3), 605–621. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2021.01.002>
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2018). Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases. *Nutrients* 2018, Vol. 10, Page 42, 10(1), 42. <https://doi.org/10.3390/NU10010042>
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10(Suppl 1), S49. <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMY063>
- Purdel, C., Ungurianu, A., Adam-Dima, I., & Margină, D. (2023). Exploring the potential impact of probiotic use on drug metabolism and efficacy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114468. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.114468>
- Quiñonez, Y., Lizarraga, C., Aguayo, R., & Arredondo, D. (2021). Communication architecture based on IoT technology to control and monitor pets feeding. *Journal of Universal Computer Science*, 27(2), 190–207. <https://doi.org/10.3897/jucs.65094>
- Raheem, A., Wang, M., Zhang, J., Liang, L., Liang, R., Yin, Y., Zhu, Y., Yang, W., Wang, L., Lv, X., Jia, Y., Qin, T., & Zhang, G. (2022). The probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strain RW1 isolated from

canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 2306–2322.

<https://doi.org/10.1111/JAM.15341>

Rajam, R., & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 2022 11:1, 11(1), 1–18.

<https://doi.org/10.1186/S43088-022-00228-W>

Ramos, C. L., Esteves, E. A., Miranda, N. M. Z. de, Moreno, L. G., & Schwan, R. F. (2022). Non-Lactic Acid Bacteria as Probiotics and their Functional Roles. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics*, 73–102.

<https://doi.org/10.1002/9781119702160.CH4>

Rampelli, S., Turrone, S., Debandi, F., Alberdi, A., Schnorr, S. L., Hofman, C. A., Taddia, A., Helg, R., Biagi, E., Brigidi, P., D'Amico, F., Cattani, M., & Candela, M. (2021). The gut microbiome buffers dietary adaptation in Bronze Age domesticated dogs. *iScience*, 24(8), 102816.

<https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102816>

Ranadheera, C. S., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., & Ajlouni, S. (2017). Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. *Fermentation* 2017, Vol. 3, Page 67, 3(4), 67.

<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION3040067>

Rashidinejad, A., Bahrami, A., Rehman, A., Rezaei, A., Babazadeh, A., Singh, H., & Jafari, S. M. (2020). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. *https://Doi.Org/10.1080/10408398.2020.1854169*, 62(9), 2470–2494.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1854169>

Reese, A. T., Chadaideh, K. S., Diggins, C. E., Schell, L. D., Beckel, M., Callahan, P., Ryan, R., Thompson, M. E., & Carmody, R. N. (2021). Effects of domestication on the gut microbiota parallel those of human industrialization. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.60197>

Regan, M. R. G. (2016). Dog Meat. *Encyclopedia of Food and Agricultural Ethics*, 1–5.

https://doi.org/10.1007/978-94-007-6167-4_510-1

- Rehman, A., Heinsen, F. A., Koenen, M. E., Venema, K., Knecht, H., Hellmig, S., Schreiber, S., & Ott, S. J. (2012). Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-47>
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(4), 658. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658-672.2003>
- Renzi, F., Manfredi, P., Dol, M., Fu, J., Vincent, S., & Cornelis, G. R. (2015). Glycan-foraging systems reveal the adaptation of *Capnocytophaga canimorsus* to the dog mouth. *MBio*, *6*(2). https://doi.org/10.1128/MBIO.02507-14/SUPPL_FILE/MBO001152202ST4.DOCX
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01785>
- Rhimi, S., Kriaa, A., Mariaule, V., Saidi, A., Drut, A., Jablaoui, A., Akermi, N., Maguin, E., Hernandez, J., & Rhimi, M. (2022). The Nexus of Diet, Gut Microbiota and Inflammatory Bowel Diseases in Dogs. *Metabolites*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/METABO12121176>
- Ridyard, A. E., Nuttall, T. J., Else, R. W., Simpson, J. W., & Miller, H. R. P. (2002). Evaluation of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine mRNA expression within the colonic mucosa of dogs with idiopathic lymphocytic–plasmacytic colitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *86*(3–4), 205–214. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00039-9)
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, *2010*(6), pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT5439>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Ristivojević, M. K., Apostolović, D., & Smiljanić, K. (2021). Enterocytes in Food Hypersensitivity Reactions. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/ANI11092713>

- Rivera, F., Zhang, L. F., Lebrilla, C. B., Winter, S. E., & Bäumler, A. J. (2016). Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host & Microbe*, *19*, 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.004>
- Rodrigues, B. M., Olivo, P. M., Osmari, M. P., Vasconcellos, R. S., Ribeiro, L. B., Bankuti, F. I., & Pozza, M. S. S. (2020). Microencapsulation of Probiotic Strains by Lyophilization Is Efficient in Maintaining the Viability of Microorganisms and Modulation of Fecal Microbiota in Cats. *International Journal of Microbiology*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/1293481>
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. *Food Research International*, *137*, 109682. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109682>
- Rodríguez, J. A. (1987). *Manual de prácticas de Bioquímica*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020111502/1020111502.PDF>
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., & Hinton, J. C. D. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, *194*(3), 686. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Rota, A., Del Carro, A., Bertero, A., Del Carro, A., Cucuzza, A. S., Banchi, P., & Corrà, M. (2021). Does bacteria colonization of canine newborns start in the uterus? *Animals*, *11*(5), 1415. <https://doi.org/10.3390/ANI11051415/S1>
- Salavati, S. (2022). Modifying the Gut Microbiota – An Update on the Evidence for Dietary Interventions, Probiotics, and Fecal Microbiota Transplantation in Chronic Gastrointestinal Diseases of Dogs and Cats. *Advances in Small Animal Care*, *3*(1), 95–107. <https://doi.org/10.1016/J.YASA.2022.05.010>

- Saleem, I., Petkar, K., & Somavarapu, S. (2017). Rationale for Pulmonary Vaccine Delivery: Formulation and Device Considerations. *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development*, 357–371.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4.00019-1>
- Salgado, P. R., Di Giorgio, L., Musso, Y. S., & Mauri, A. N. (2019). Bioactive Packaging: Combining Nanotechnologies With Packaging for Improved Food Functionality. *Nanomaterials for Food Applications*, 233–270. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00009-9>
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., & Mogensen, G. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1–2), 93–106.
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. (2022). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D161–D164.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1135>
- Scarsella, E., Jha, A., Sandri, M., & Stefanon, B. (2022). Network-based gut microbiome analysis in dogs. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 1465–1475.
https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2124932/SUPPL_FILE/TJAS_A_2124932_SM6900.XLSX
- Scarsella, E., Stefanon, B., Cintio, M., Licastro, D., Sgorlon, S., Dal Monego, S., & Sandri, M. (2020). Learning machine approach reveals microbial signatures of diet and sex in dog. *PLOS ONE*, 15(8), e0237874. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0237874>
- Schachter, J., De Oliveira, D. A., Da Silva, C. M., De Barros Alencar, A. C. M., Duarte, M., Da Silva, M. M. P., De Paula Rosa Ignácio, A. C., & Lopes-Torres, E. J. (2020). Whipworm Infection Promotes Bacterial Invasion, Intestinal Microbiota Imbalance, and Cellular Immunomodulation. *Infection and Immunity*, 88(3). <https://doi.org/10.1128/IAI.00642-19>

- Schäfer, S., Spergser, J., Breitenfellner, J., & Aurich, J. E. (2003). Bacteriological Status of Canine Milk and Septicaemia in Neonatal Puppies – a Retrospective Study. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(7), 343–346. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0450.2003.00672.X>
- Schmitt, G., Barrow, P., & Stephan-Gueldner, M. (2015). Alternatives to the Use of Nonhuman Primates in Regulatory Toxicology. *The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment*, 337–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417144-2.00017-2>
- Schmitz, S., & Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*, 2(2), 71. <https://doi.org/10.1002/VMS3.17>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O’Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>
- Schöpping, M., Vesth, T., Jensen, K., Franzén, C. J., & Zeidan, A. A. (2022). *Genome-Wide Assessment of Stress-Associated Genes in Bifidobacteria*. <https://doi.org/10.1128/aem.02251-21>
- Shah, A. M., Tarfeen, N., Mohamed, H., & Song, Y. (2023). Fermented Foods: Their Health-Promoting Components and Potential Effects on Gut Microbiota. *Fermentation 2023, Vol. 9, Page 118*, 9(2), 118. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9020118>
- Siaterlis, A., Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2009). Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology*, 48(3), 295–301. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2008.02529.X>
- Sibbesson, E. (2019). Reclaiming the Rotten: Understanding Food Fermentation in the Neolithic and Beyond. *Environmental Archaeology*. <https://doi.org/10.1080/14614103.2018.1563374>

- Silva-Sanchez, A., & Randall, T. D. (2020). Anatomical Uniqueness of the Mucosal Immune System (GALT, NALT, iBALT) for the Induction and Regulation of Mucosal Immunity and Tolerance. *Mucosal Vaccines*, 21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811924-2.00002-X>
- Singh, P., Elhaj, D. A. I., Ibrahim, I., Abdullahi, H., & Al Khodor, S. (2023). Maternal microbiota and gestational diabetes: impact on infant health. *Journal of Translational Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-023-04230-3>
- Singh, R. P., Shadan, A., & Ma, Y. (2022). Biotechnological Applications of Probiotics: A Multifarious Weapon to Disease and Metabolic Abnormality. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(6), 1184–1210. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09992-8>
- Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2021). Influence of Probiotic Supplementation on Health Status of the Dogs: A Review. *Applied Sciences 2021, Vol. 11, Page 11384*, 11(23), 11384. <https://doi.org/10.3390/APP112311384>
- Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9120423>
- Soontarak, S., Chow, L., Johnson, V., Coy, J., Webb, C., Wennogle, S., & Dow, S. (2019). Humoral immune responses against gut bacteria in dogs with inflammatory bowel disease. *PloS One*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0220522>
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/FOODS10061306>
- Stenger, C. (2023). The Influence of Canine Ownership on Maternal and Fetal Microbiomes and Their Associated Health Outcomes: A Review of the Literature. *Human-Animal Interactions*, 2023. <https://doi.org/10.1079/HAI.2023.0009>

- Stephen, A. M., & Merrifield, E. H. (2005). Carbohydrates. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 392–408. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00051-0>
- Stoilova, E. (2011). Deconstructing the Authenticity: Who, When, and How Created the Bulgarian Yoghurt. In C.-F. Dobre, I. Epurescu-Pascovici, & C. E. Ghiță (Eds.), *Myth-Making and Myth-Breaking in History and the Humanities* (p. 125).
- Stokes, C., & Waly, N. (2006). Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Vet. Res*, 37(3), 281–293. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006015i>
- Strompfová, V., Kubašová, I., & Lauková, A. (2017). Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(16), 6309–6319. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8425-Z>
- Suchodolski, J. S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 215, 30–37. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2016.04.011>
- Suchodolski, J. S., Camacho, J., & Steiner, J. M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 567–578. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2008.00521.X>
- Suchodolski, J. S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E. M., Steiner, J. M., Cook, A. K., & Toresson, L. (2012). The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*, 7(12), e51907. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051907>
- Sun, L., Wang, X., Saredy, J., Yuan, Z., Yang, X., & Wang, H. (2020). Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biology*, 37, 101759. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2020.101759>
- Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Cann, I. K., White, B. A., & Fahey, G. C. (2011).

Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME Journal*, 5(4), 639.

<https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2010.162>

Swanson, K. S., & Schook, L. B. (2006). Canine Nutritional Model: Influence of Age, Diet, and Genetics on Health and Well-Being. *Current Nutrition & Food Science*, 2(2), 115–126.

<https://doi.org/10.2174/157340106776818853>

Tal, S., Tikhonov, E., Aroch, I., Hefetz, L., Turjeman, S., Koren, O., & Kuzi, S. (2021). Developmental intestinal microbiome alterations in canine fading puppy syndrome: a prospective observational study. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41522-021-00222-7>

Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530–538. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2012.08.004>

Therapeutic Goods Administration (TGA). (2021, July 20). *Stability of the finished product*. Guidelines on Quality Aspects of OTC Applications. <https://www.tga.gov.au/resources/resource/guidance/argom-appendix-2-guidelines-quality-aspects-otc-applications/9-stability-finished-product>

Thermo Fisher Scientific. (2023). *TRIZOL Reagent User Guide (Pub.No. MAN0001271 C.0)*.

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf

Tolbert, M. K., Telles, N. J., Simon, B. T., Scallan, E. M., Price, J. M., Gould, E. N., Papich, M. G., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., & Kathrani, A. (2022). Gastrointestinal transit time is faster in Beagle dogs compared to cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 260(S3), S8–S14.

<https://doi.org/10.2460/JAVMA.22.07.0287>

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2010). *Microbiology an introduction* (Vol. 10). Pearson edition, Inc., Publishing as Pearson Benjamins Cummings, San Francisco.

Treeful, A. (2023). *Novel Insights Into Addison's Disease in Dogs*. University of Minnesota.

- Trujillo, S. M., McKenney, E. A., Hilderbrand, G. V., Mangipane, L. S., Rogers, M. C., Joly, K., Gustine, D. D., Erlenbach, J. A., Mangipane, B. A., & Lafferty, D. J. R. (2022). Intrinsic and extrinsic factors influence on an omnivore's gut microbiome. *PLOS ONE*, *17*(4), e0266698. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0266698>
- Tuniyazi, M., Hu, X., Fu, Y., & Zhang, N. (2022). Canine Fecal Microbiota Transplantation: Current Application and Possible Mechanisms. *Veterinary Sciences 2022*, *Vol. 9*, Page 396, *9*(8), 396. <https://doi.org/10.3390/VETSCI9080396>
- Van Alst, A. J., LeVeque, R. M., Martin, N., & DiRita, V. J. (2016). *Growth Curves: Generating Growth Curves Using Colony Forming Units and Optical Density Measurements*. MyJoVE Corporation.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2004). Clostridium perfringens in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, *33*(6), 537–549. <https://doi.org/10.1080/03079450400013162>
- Vemuri, R., Shinde, T., Shastri, M. D., Perera, A. P., Tristram, S., Martoni, C. J., Gundamaraju, R., Ahuja, K. D. K., Ball, M., & Eri, R. (2018). A human origin strain Lactobacillus acidophilus DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(9), 840. <https://doi.org/10.7150/IJMS.25004>
- Ververidis, H. N., Mavrogianni, V. S., Fragkou, I. A., Orfanou, D. C., Gougoulis, D. A., Tzivara, A., Gouletsou, P. G., Athanasiou, L., Boscios, C. M., & Fthenakis, G. C. (2007). Experimental staphylococcal mastitis in bitches: Clinical, bacteriological, cytological, haematological and pathological features. *Veterinary Microbiology*, *124*(1–2), 95–106. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.03.029>
- Visciglia, A., Allesina, S., Amoruso, A., De Prisco, A., Dhir, R., Bron, P. A., & Pane, M. (2022). Assessment of shelf-life and metabolic viability of a multi-strain synbiotic using standard and innovative enumeration technologies. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.989563/FULL>

- Vitale, S., Picascia, S., & Gianfrani, C. (2016). The cross-talk between enterocytes and intraepithelial lymphocytes. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/S40348-016-0048-4>
- Wang, G., Chen, Y., Xia, Y., Song, X., & Ai, L. (2022). Characteristics of Probiotic Preparations and Their Applications. *Foods*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/FOODS11162472>
- Wang, G. Q., Pu, J., Yu, X. Q., Xia, Y. J., & Ai, L. Z. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066–3075. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17685>
- Wang, J., Hussain, T., & Duan, Y. (2022). Nutritional Management for the Energy Metabolism in Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 900736. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.900736/BIBTEX>
- Wang, S., Martins, R., Sullivan, M. C., Friedman, E. S., Misic, A. M., El-Fahmawi, A., De Martinis, E. C. P., O'Brien, K., Chen, Y., Bradley, C., Zhang, G., Berry, A. S. F., Hunter, C. A., Baldassano, R. N., Rondeau, M. P., & Beiting, D. P. (2019). Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-019-0740-4>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.612285/BIBTEX>
- Warren, A. L., & Yates, R. M. (2020). Structure, Function, and Disorders of Lymphoid Tissue. *Schalm's Veterinary Hematology, Seventh Edition*, 402–413. <https://doi.org/10.1002/9781119500537.CH51>
- Wechselberger, P., Sagmeister, P., & Herwig, C. (2013). Real-time estimation of biomass and specific growth rate in physiologically variable recombinant fed-batch processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(9), 1205. <https://doi.org/10.1007/S00449-012-0848-4>

- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V., MacLeay, J. M., Jewell, D. E., & Suchodolski, J. S. (2020). The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 527819.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01266/BIBTEX>
- Wessman, P., Håkansson, S., Leifer, K., & Rubino, S. (2013). Formulations for Freeze-drying of Bacteria and Their Influence on Cell Survival. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *78*, 4058.
<https://doi.org/10.3791/4058>
- Wexler, A. G., & Goodman, A. L. (2017). An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nature Microbiology* *2017* 2:5, 2(5), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>
- Woodroffe, R., Prager, K. C., Munson, L., Conrad, P. A., Dubovi, E. J., & Mazet, J. A. K. (2012). Contact with Domestic Dogs Increases Pathogen Exposure in Endangered African Wild Dogs (*Lycaon pictus*). *PLOS ONE*, *7*(1), e30099. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030099>
- Xia, J., Wang, G., Fan, M., Chen, M., Wang, Z., & Zhuang, Y. (2021). Understanding the scale-up of fermentation processes from the viewpoint of the flow field in bioreactors and the physiological response of strains. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *30*, 178–184.
<https://doi.org/10.1016/J.CJCHE.2020.12.004>
- Yang, H., Huang, P., Hao, L., Che, Y., Dong, S., Wang, Z., & Wu, C. (2023). Enhancing viability of dried lactic acid bacteria prepared by freeze drying and spray drying via heat preadaptation. *Food Microbiology*, *112*, 104239. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2023.104239>
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, *2*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1/TABLES/4>

- Yeo, S. K., & Liong, M. T. (2010). Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(2), 267–275.
<https://doi.org/10.1002/JSFA.3808>
- You, I. W., & Kim, M. J. (2021). Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: Breed, age, and body condition score. *Animals*, *11*(8), 2432.
<https://doi.org/10.3390/ANI11082432/S1>
- You, S., Ma, Y., Yan, B., Pei, W., Wu, Q., Ding, C., & Huang, C. (2022). The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. *Frontiers in Nutrition*, *9*.
<https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.1000517>
- Zakošek Pipan, M., Kajdič, L., Kalin, A., Plavec, T., & Zdovc, I. (2020). Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology*, *152*, 18–28. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.04.014>
- Zawistowska-Rojek, A., Zaręba, T., & Tyski, S. (2022). Microbiological Testing of Probiotic Preparations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(9).
<https://doi.org/10.3390/IJERPH19095701>
- Zhang, D., Zhang, M., & Gu, X. (2018). Seaweed-Derived Hydrocolloids as Food Coating and Encapsulation Agents. *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets*, 153–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00008-X>
- Zhang, F., Cui, B., He, X., Nie, Y., Wu, K., Fan, D., Feng, B., Chen, D., Ren, J., Deng, M., Li, N., Zheng, P., Cao, Q., Yang, S., Liu, Y., Zhou, Y., Nie, Y., Ji, G., Li, P., & Zhang, F. (2018). Microbiota transplantation: concept, methodology and strategy for its modernization. *Protein & Cell*, *9*(5), 462–473.
<https://doi.org/10.1007/S13238-018-0541-8>
- Zhang, Y., Ding, Z., Chen, X., Wen, M., Wang, Q., & Wang, Z. (2023). Effects of Oligosaccharide Fermentation on Canine Gut Microbiota and Fermentation Metabolites in an In Vitro Fecal

Fermentation Model. *Fermentation* 2023, Vol. 9, Page 722, 9(8), 722.

<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9080722>

Zhao, Y., Uduman, M., Siu, J. H. Y., Tull, T. J., Sanderson, J. D., Wu, Y. C. B., Zhou, J. Q., Petrov, N., Ellis, R., Todd, K., Chavele, K. M., Guesdon, W., Vossenkamper, A., Jassem, W., D’Cruz, D. P., Fear, D. J., John, S., Scheel-Toellner, D., Hopkins, C., ... Spencer, J. (2018). Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06089-1>

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research* 2020 30:6, 30(6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–26. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218011>

Ziese, A. L., & Suchodolski, J. S. (2021). Impact of Changes in Gastrointestinal Microbiota in Canine and Feline Digestive Diseases. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 51(1), 155–169. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2020.09.004>

Zuidam, N. J., & Nedović, V. A. (2010). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 1–400. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>

Zuo, T., & Siew, C. (2018). The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory bowel disease. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 365492. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02247/BIBTEX>

Zwittink, R. D., Van Zoeren-Grobbe, D., Martin, R., Van Lingen, R. A., Jebbink, L. J. G., Boeren, S., Renes, I. B., Van Elburg, R. M., Belzer, C., & Knol, J. (2017). Metaproteomics reveals functional differences in intestinal microbiota development of preterm infants. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 16(9), 1610–1620. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA117.000102>

Apéndices