



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
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

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

Elaborado por:

Hernández Balladares, Karolay Abigail

Dra. Thelvia Isabel Ramos Gómez PhD.

Bq. Felipe Sandoval Sandoval

4 de septiembre de 2023



TABLA DE CONTENIDO



	Introducción
	Objetivos e Hipótesis
	Metodología
	Resultados y Discusión
	Conclusiones y Recomendaciones



INTRODUCCIÓN / Formulación del problema y Antecedentes



500 millones de canes en todo el planeta

Modelo de investigación

Enfoque hacia el análisis de la microbiota intestinal del perro doméstico

Canis lupus familiaris

Figura 1. La raza de perro más popular en todos los países.
<https://www.travelandleisure.com/animals/most-popular-dog-breed-in-every-country>

(Deschamps et al., 2022; López-Osorio et al., 2020; Zhang et al., 2023, Grześkowiak et al., 2015)

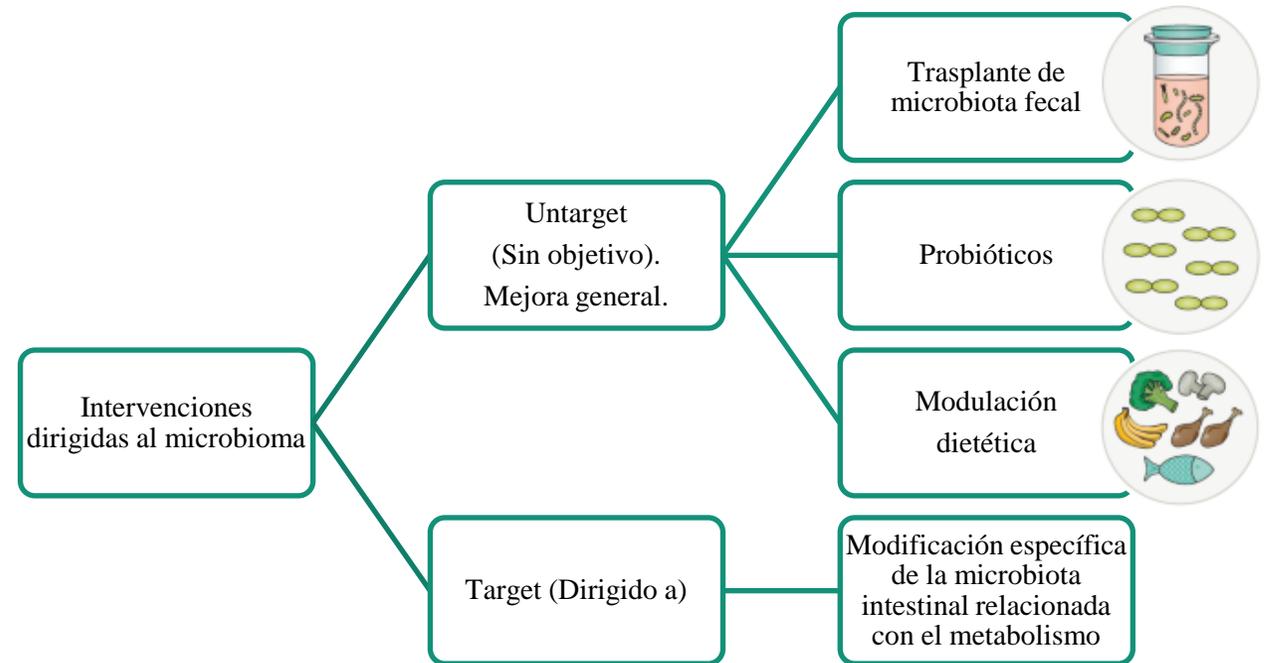
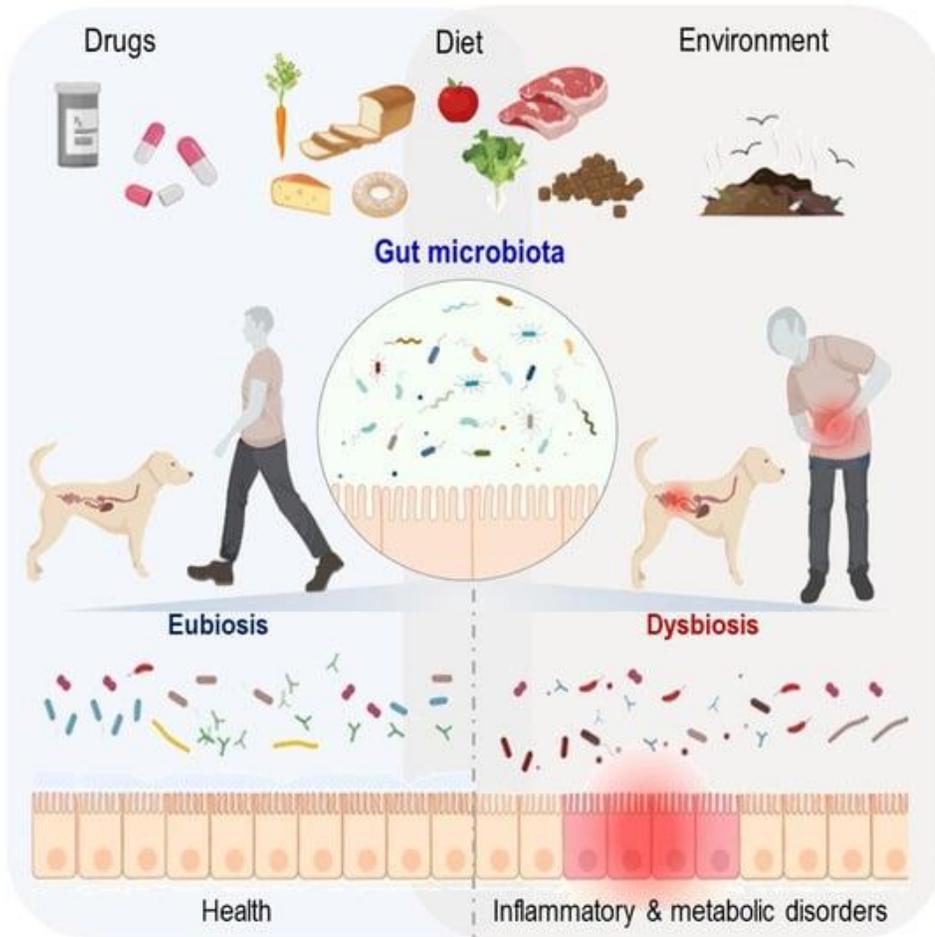


Figura 2. Impacto del entorno doméstico en la microbiota intestinal y la salud de humanos y canes.

Fuente: Hernández et al. (2022)

¿Qué son los probióticos?

“Microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas facilitan el equilibrio microbiano en el sistema digestivo.



Lactobacillus spp. *Bifidobacterium* spp.

Figura 3. Cepas probióticas más estudiadas y comercializadas.

Fuente: <https://shorturl.at/xCWX4>

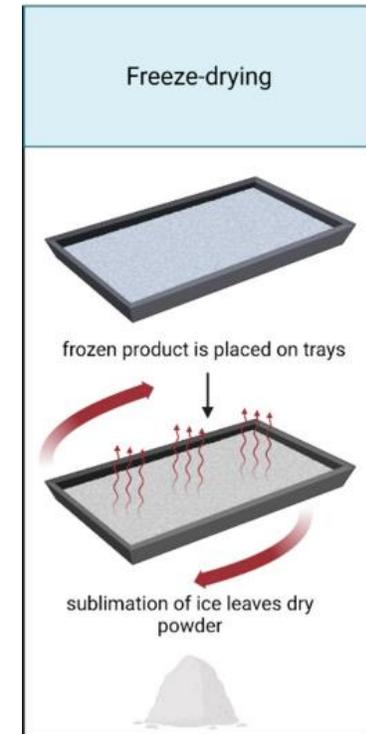


Figura 4. Técnica de encapsulación más comúnmente aplicada

Fuente: <https://encyclopedia.pub/entry/26192>

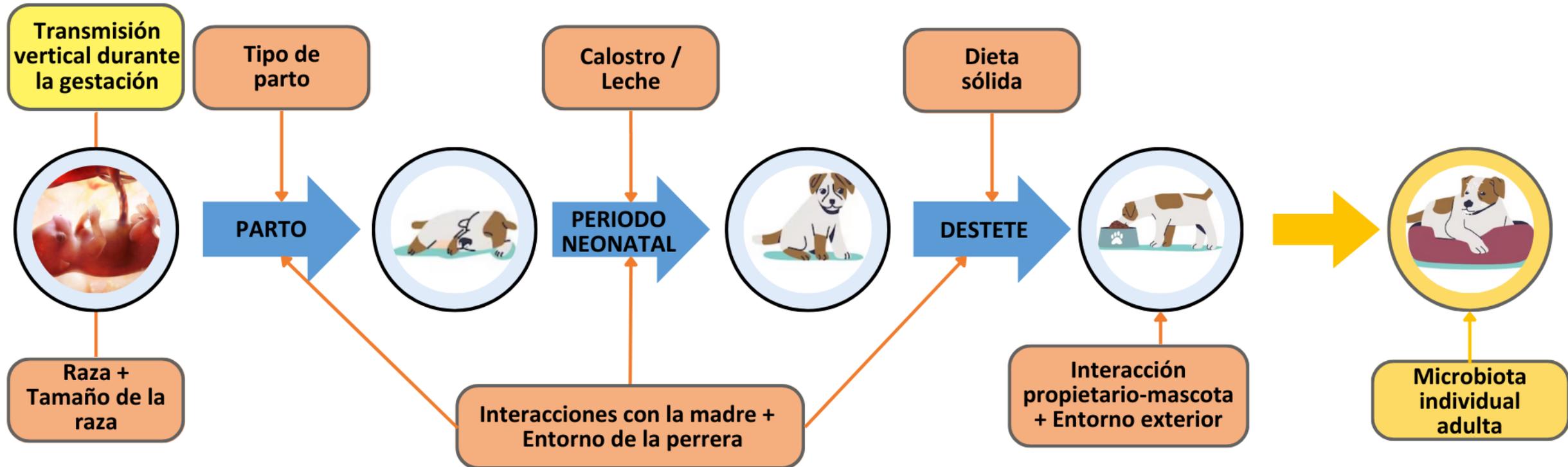


Figura 5. Principales factores que influyen en el desarrollo de la microbiota intestinal de los cachorros en crecimiento hasta la edad adulta.

Fuente: Garrigues et al. (2022)

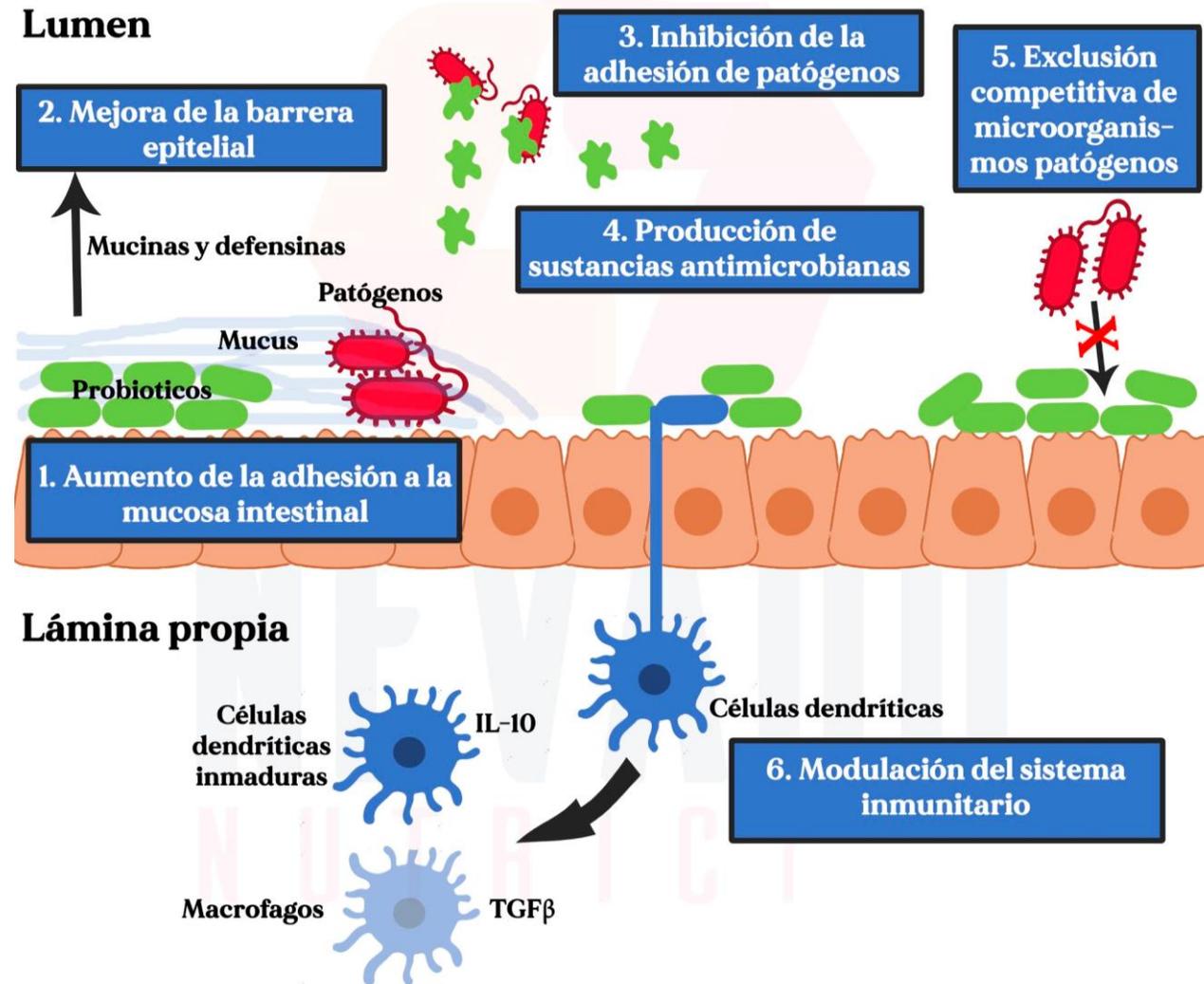


Figura 6. Principales mecanismos de acción de los probióticos.

Fuente: Nevado (2021)

OBJETIVOS E HIPÓTESIS



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.



Cultivo bacteriano

- Preinóculo
- Cultivo Batch (300 mL)

Cinética de crecimiento

- Densidad óptica (DO_{600nm})
- Viabilidad celular (UFC/mL)
- Biomasa seca (g/L)
- Concentración de glucosa (g/L)

Microencapsulación de las cepas

- Liofilización
- Viabilidad celular (%)
- Estabilidad (%)

Cultivo bacteriano

Cepas *Lactobacillus* spp.

- CEPA-16
- CEPA-17
- TUCO-4

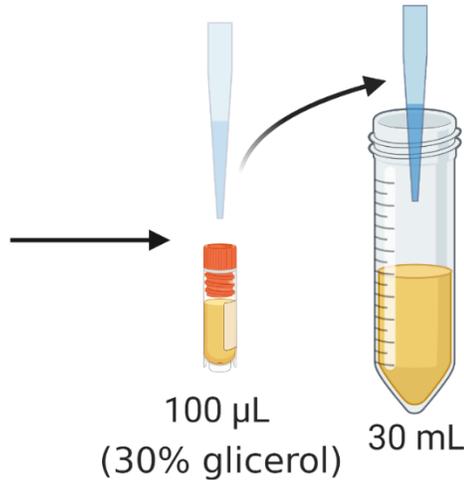


Universidad
de Concepción

CONICET
CERELA

1

❄️ -80 °C



2



⌚ 16 horas

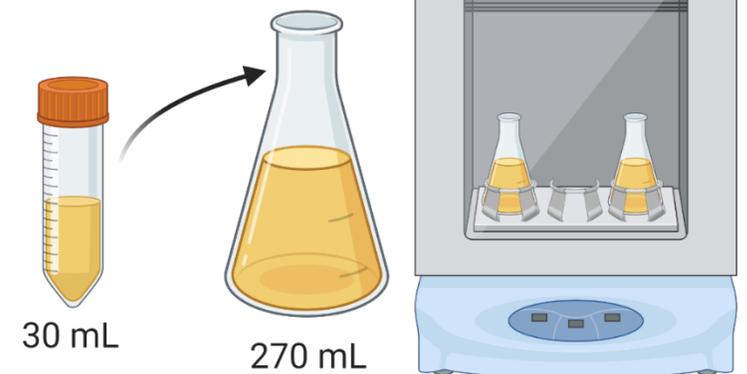
🌡️ 37°C

⚡ 150 rpm

3

🌡️ 37°C

⚡ 150 rpm



Cinética de crecimiento

- ✓ Densidad óptica

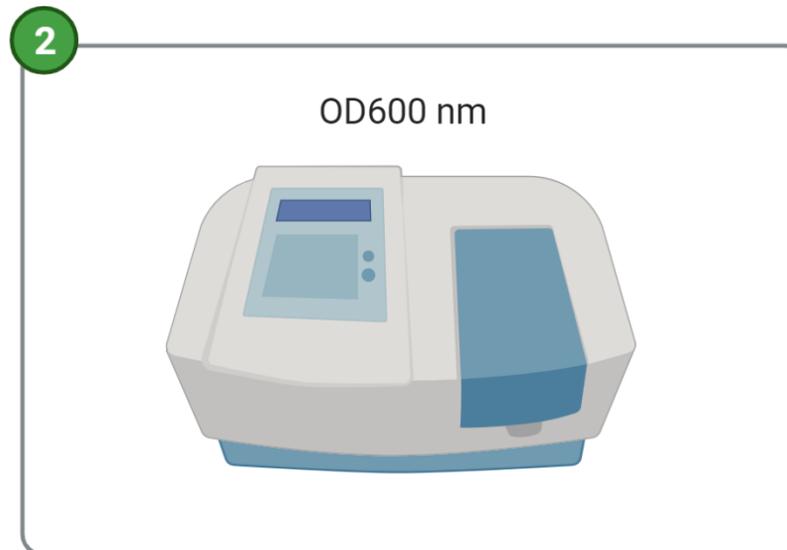
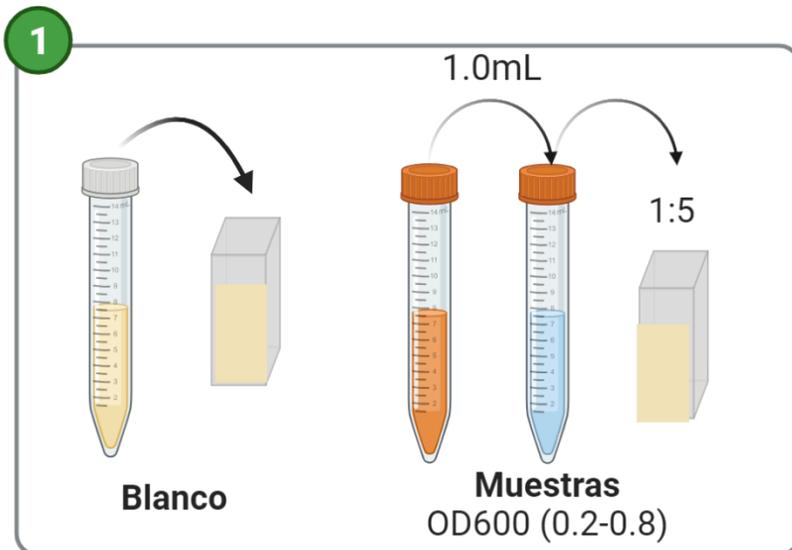
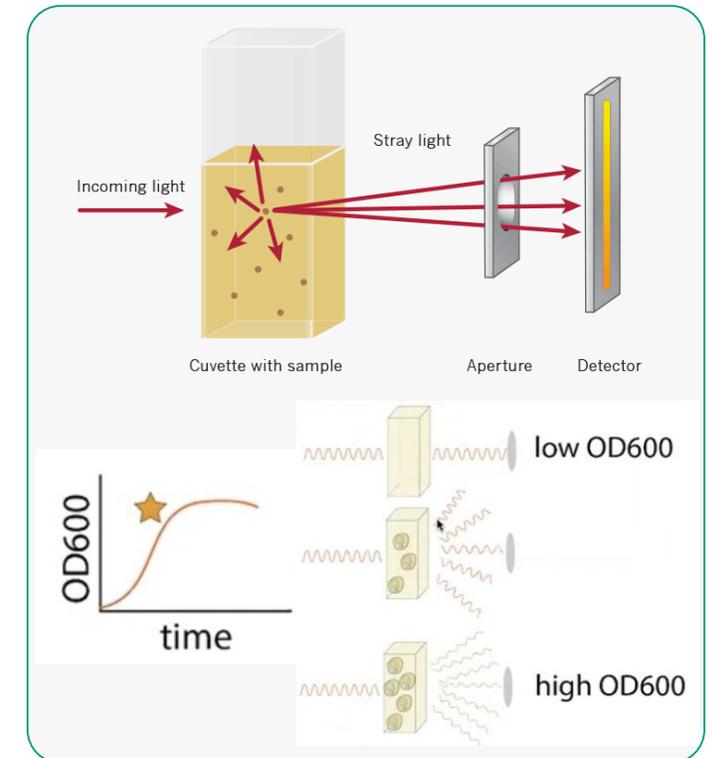


Figura 7. Dispersión de luz de una muestra de cultivo celular.

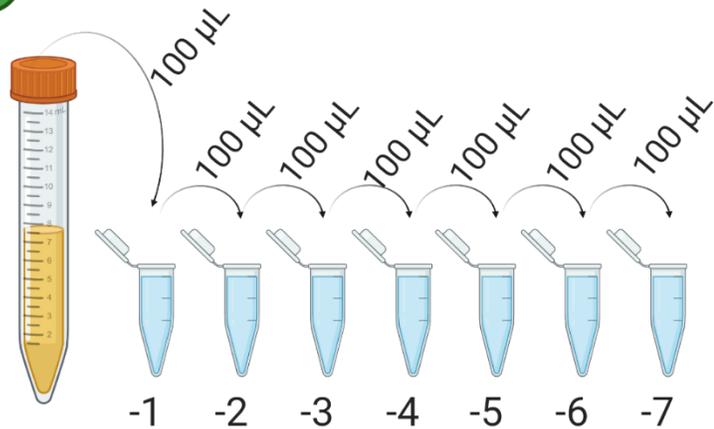


Fuente: <https://www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/>

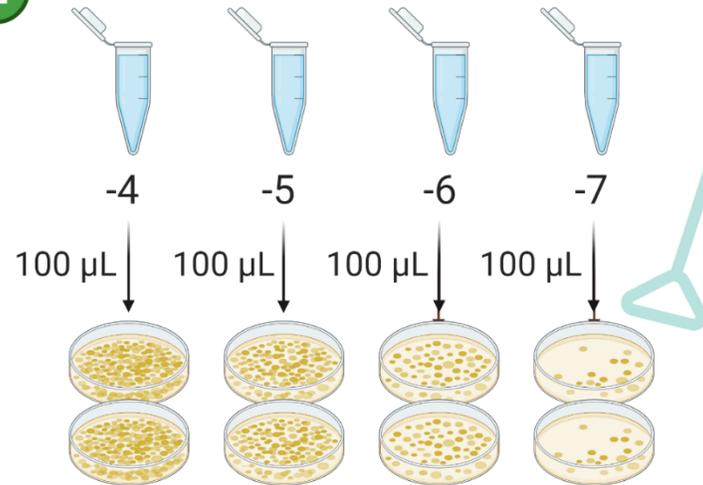
Cinética de crecimiento

✓ Viabilidad celular

1



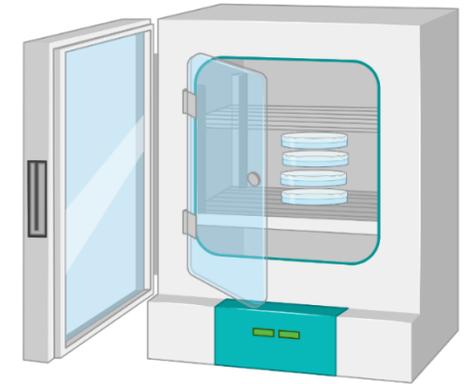
2



3

⌚ 28 h

🌡 37°C



METODOLOGÍA / Objetivo 1

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



Cinética de crecimiento
 ✓ Concentración de glucosa
 ✓ Biomasa seca

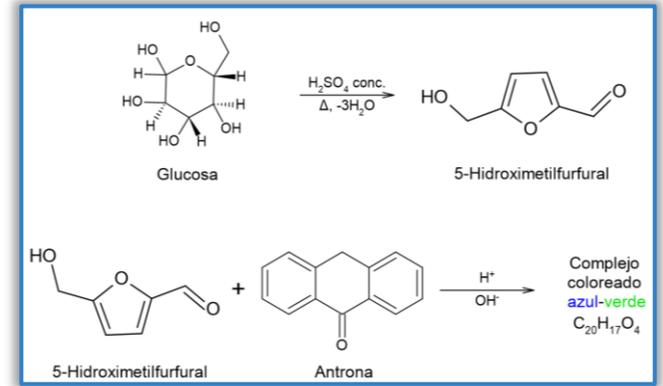
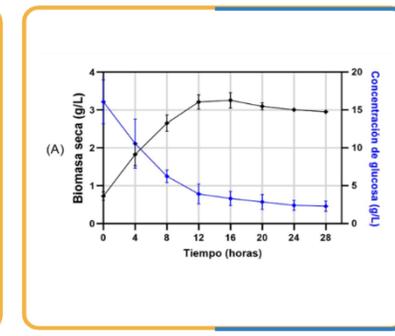
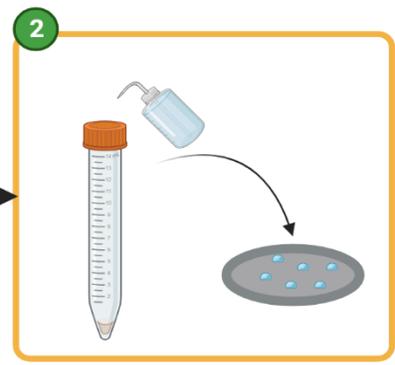
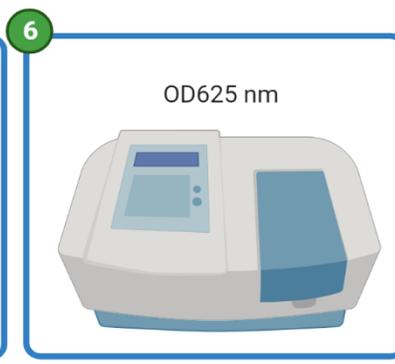
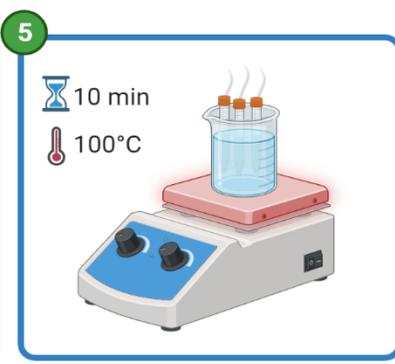
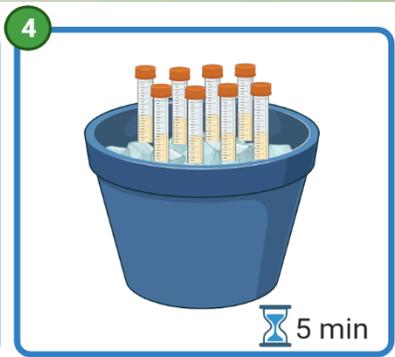
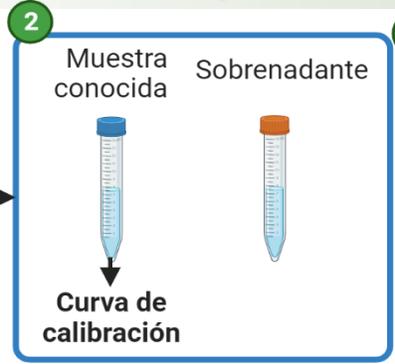
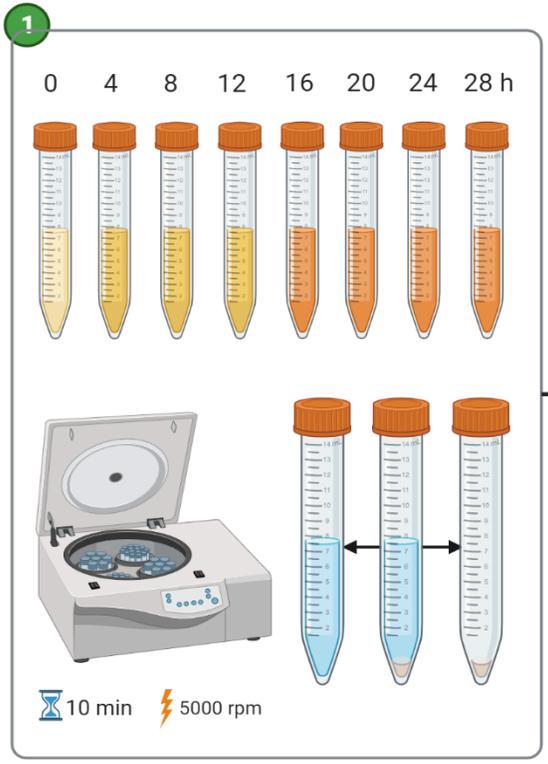
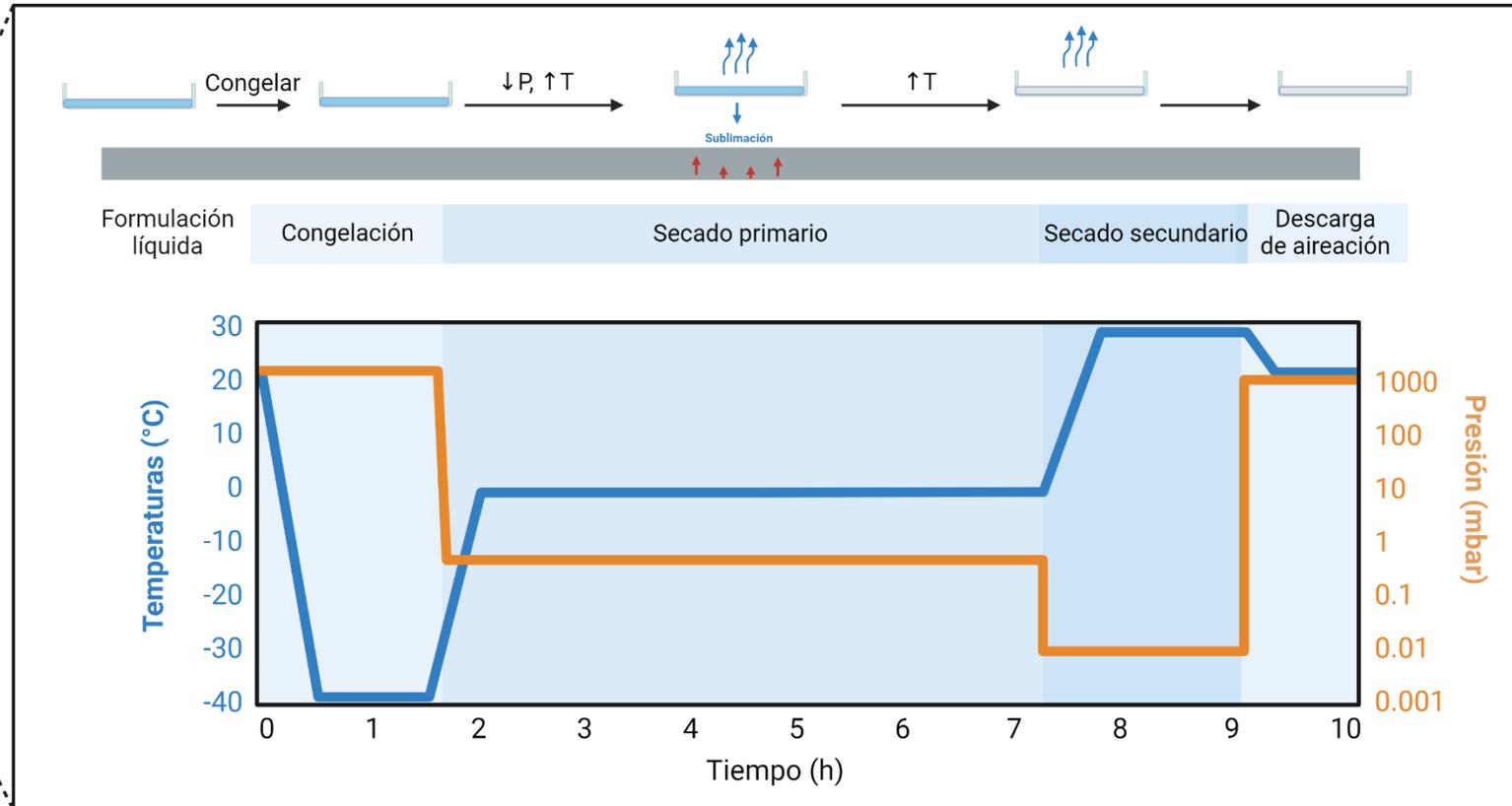
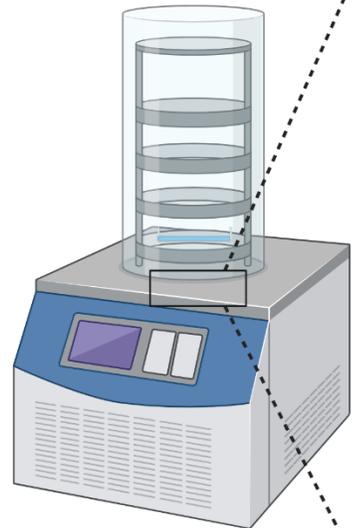


Figura 8. Reacción ocurrida durante la determinación de glucosa

(Wechselberger et al., 2013; Li & Mira De Orduña, 2010; Rodríguez, 1987)

Microencapsulación de las cepas

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



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

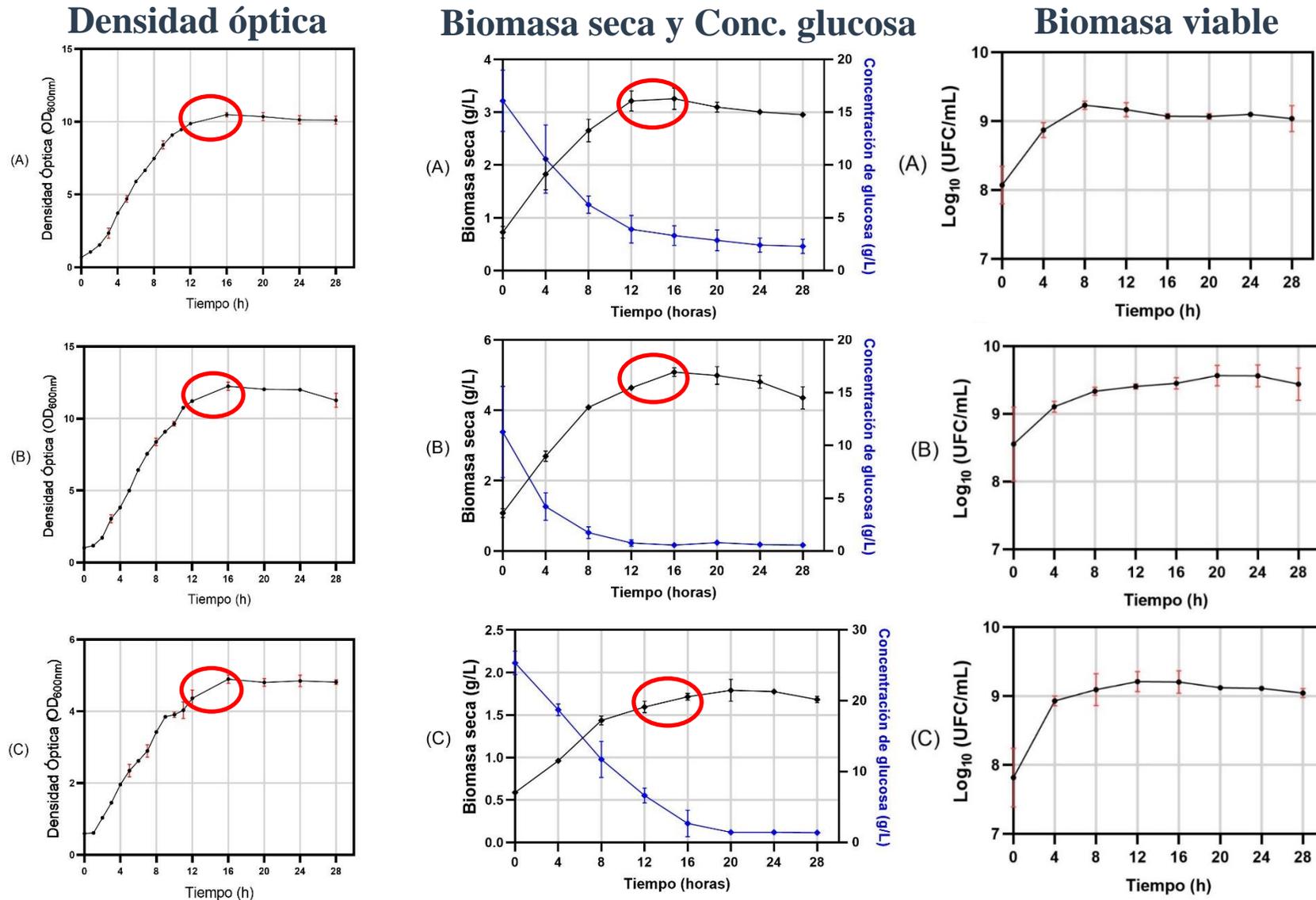


Figura 9. Curvas de crecimiento de CEPA-16 (A), CEPA-17 (B), TUCO-4 (C) en medio MRS.

Inicio de la fase estacionaria

Siaterlis *et al.* (2009) → 12 h

Broeckx *et al.* (2019) → 17 h

Andrianto *et al.* (2018) → 18 h

Viabilidad celular post-liofilización

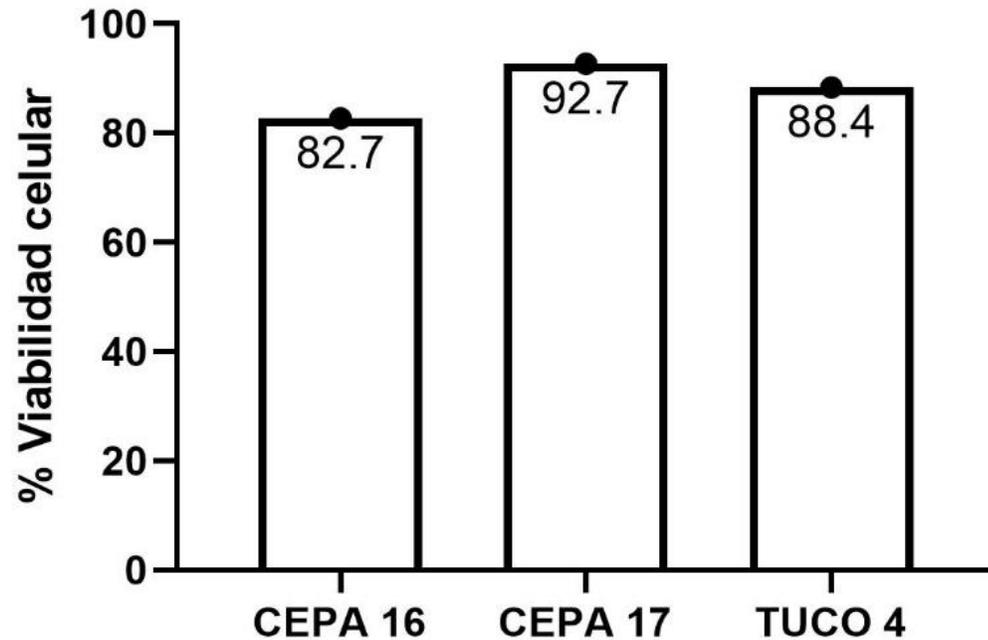


Tabla 1.

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

CEPA	UFC/g	UFC/mL	g/mL	%V
CEPA-16	9,10E+10	9,76E+08	0,011	82,70
CEPA-17	5,80E+10	2,67E+09	0,046	92,70
TUCO-4	1,50E+10	1,27E+09	0,085	88,40

Nota. %V: Porcentaje de viabilidad celular.

Figura 10. Tasas de viabilidad celular post-liofilización.

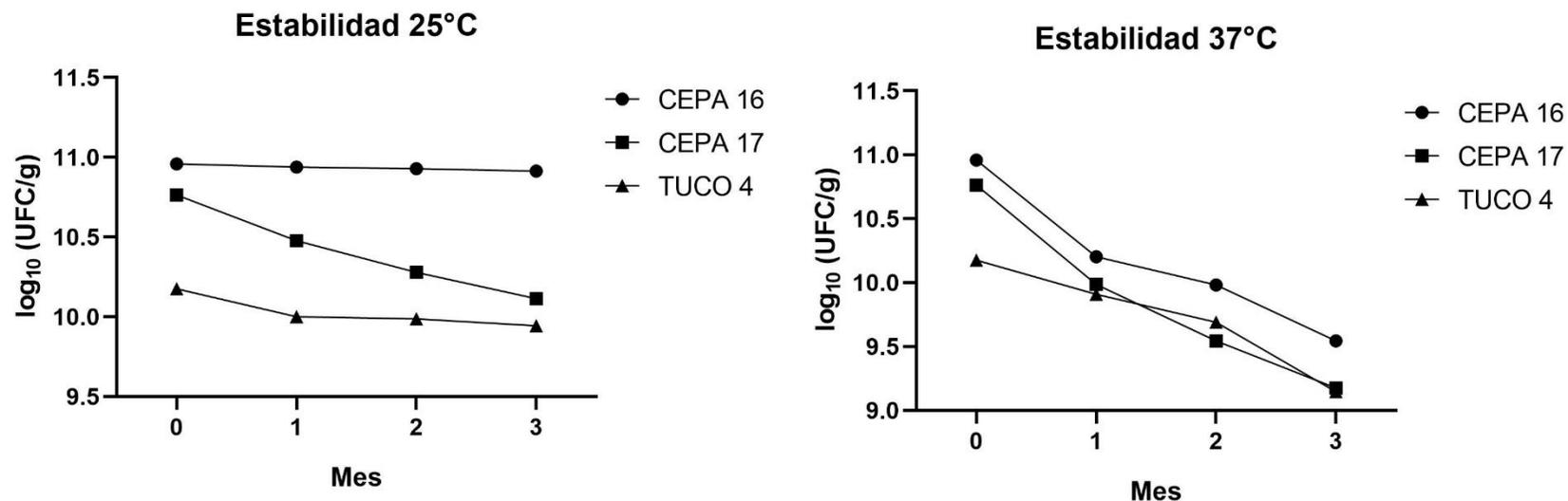


Figura 10. Estabilidad de las cepas liofilizadas durante 3 meses en almacenamiento a 25 y 37°C

Tabla 2

Análisis de estabilidad en tiempo real

Mes	CEPA 16		CEPA 17		TUCO 4	
	(UFC/g)	%Ts	(UFC/g)	%Ts	(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 3

Análisis de estabilidad en condiciones aceleradas

Mes	CEPA 16		CEPA 17		TUCO 4	
	(UFC/g)	%Ts	(UFC/g)	%Ts	(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.

Antes de realizar análisis de varianzas (ANOVA de una vía; a un nivel de significancia de $p < 0,05$)

- Distribución normal → Prueba de Shapiro-Wilk
- Homogeneidad de varianzas → Proceso automático en el software GraphPad Prism 8.
- Prueba post hoc de Dunnet (prueba de comparaciones múltiples) después de cada ANOVA.

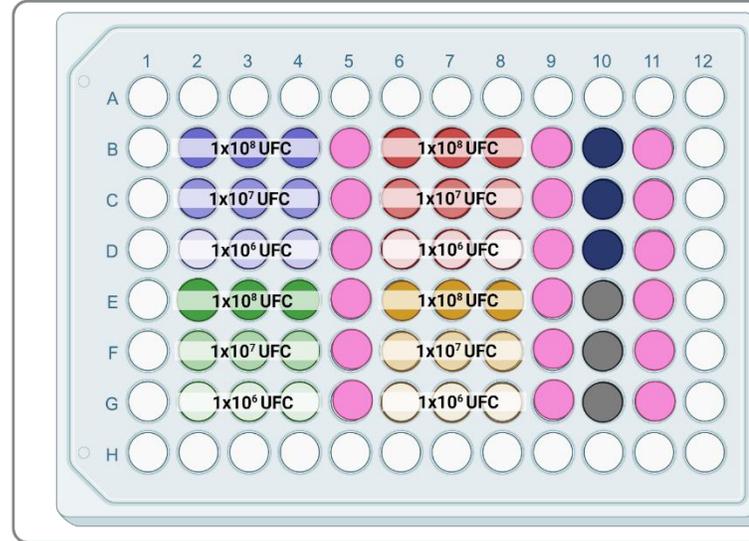
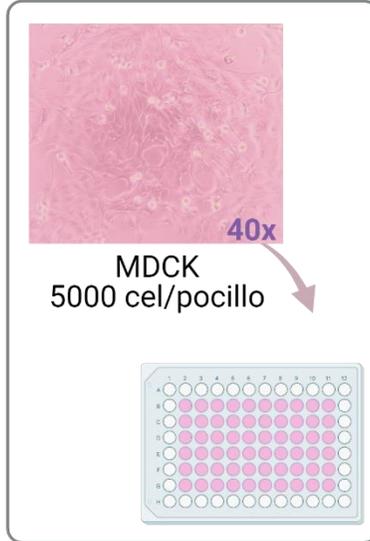


METODOLOGÍA / Objetivo 2

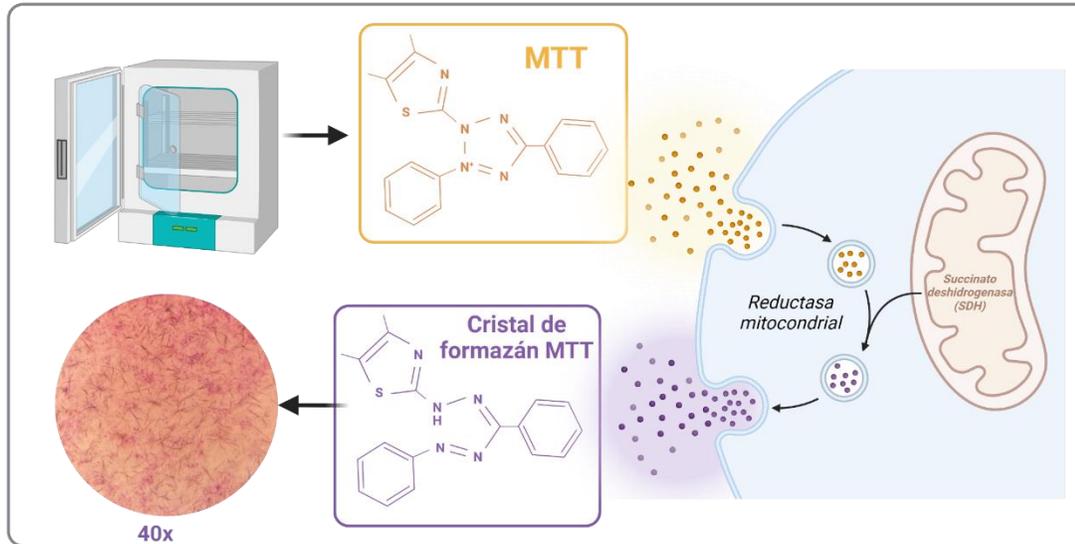
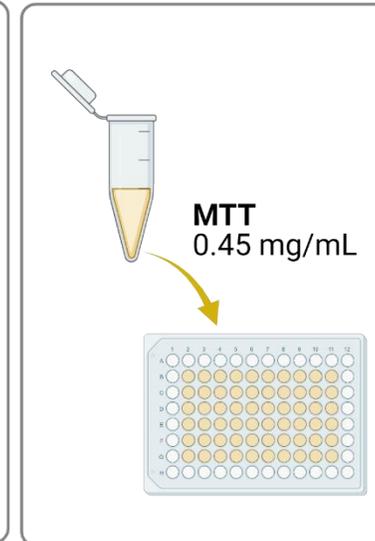
Analizar los efectos citotóxicos de las formulaciones probióticas encapsuladas en la línea celular MDCK mediante el ensayo colorimétrico MTT.



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

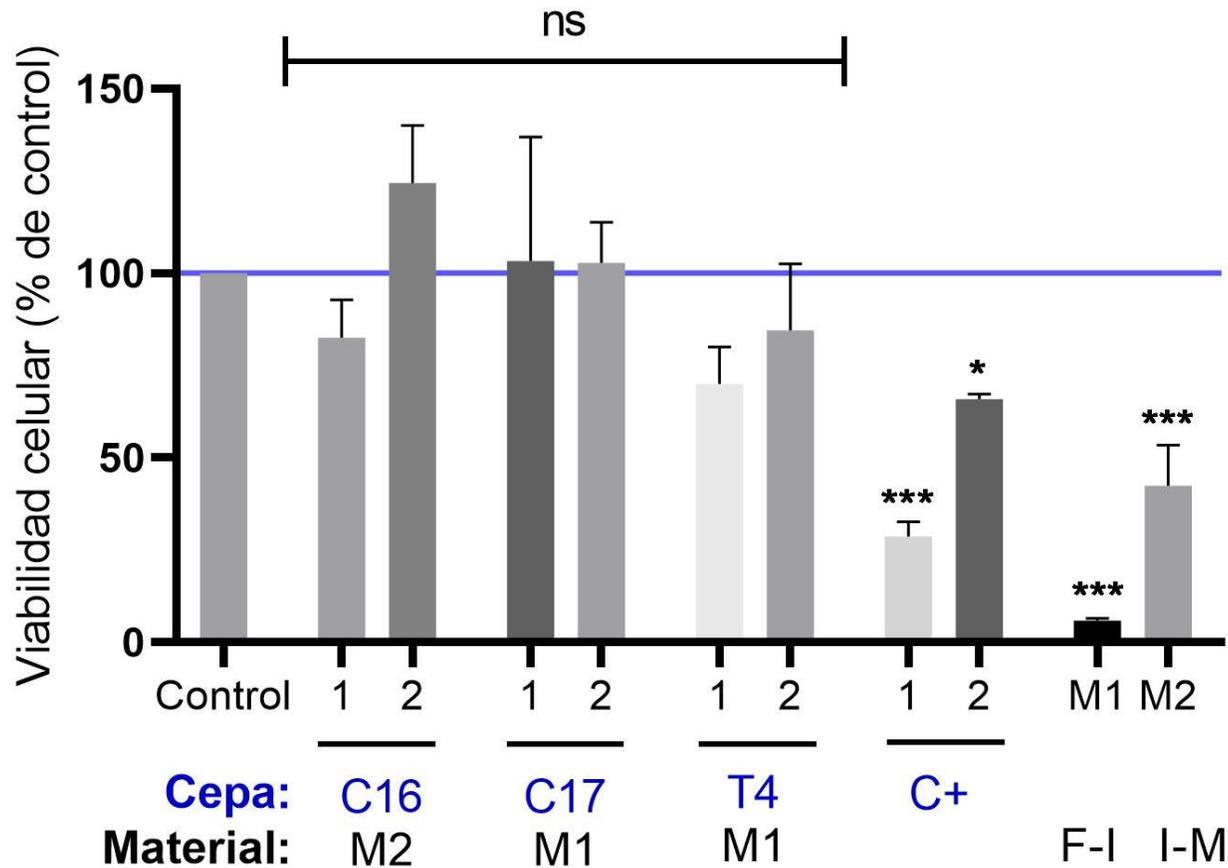


- CEPA 16
- CEPA 17
- TUCO 4
- CONTROL + Probiótico comercial
- CONTROL - Medio DMEM
- BLANCO Isopropanol ácido
- 12.5% Maltodextrina + 12.5% FOS
- 10% Inulina + 10% FOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN / Objetivo 2

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



100% Control de tratamiento

↑ 100% Viabilidad/estimulación de la proliferación.

↓ 100% Citotoxicidad.

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, $P > 0.05$, $*P \leq 0.1$; $***P \leq 0.001$)

Figura 11. Ensayo de citotoxicidad en células caninas MDCK tratadas con las formulaciones probióticas microencapsuladas y los materiales de recubrimiento analizadas por MTT

METODOLOGÍA / Objetivo 3

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

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

1



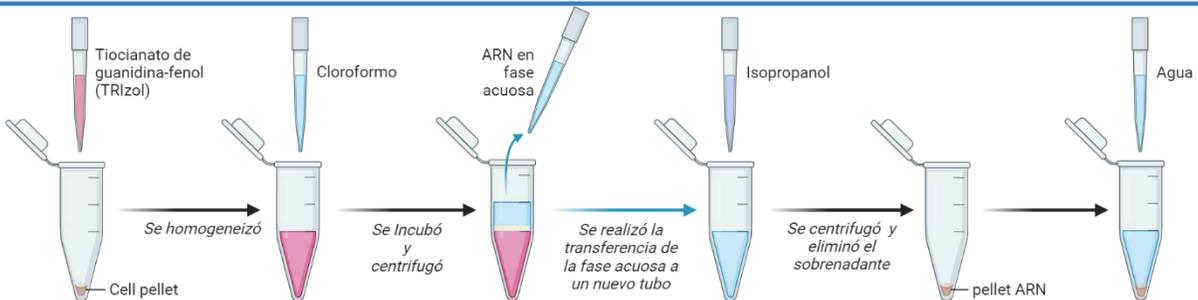
LPS
1 µg/mL

Cepas Bacterianas
Concentraciones: 1×10^6 UFC/mL, 1×10^7 UFC/mL

4 h

12 h

2



1 Se lisó las células.

2 Se agregó cloroformo

3 Se aisló la fase acuosa que contiene ARN

4 Se precipitó del ARN

5 Se secó el pellet de ARN

6 Se resuspendió el precipitado de ARN

Tiocianato de guanidina-fenol (TRIZOL)

Cloroformo

ARN en fase acuosa

Isopropanol

Agua

Cell pellet

Se homogeneizó

Se Incubó y centrifugó

Se realizó la transferencia de la fase acuosa a un nuevo tubo

Se centrifugó y eliminó el sobrenadante

pellet ARN

3



Polimerasa

Transcriptasa inversa

Fluoróforo

Forward primer

Reverse primer

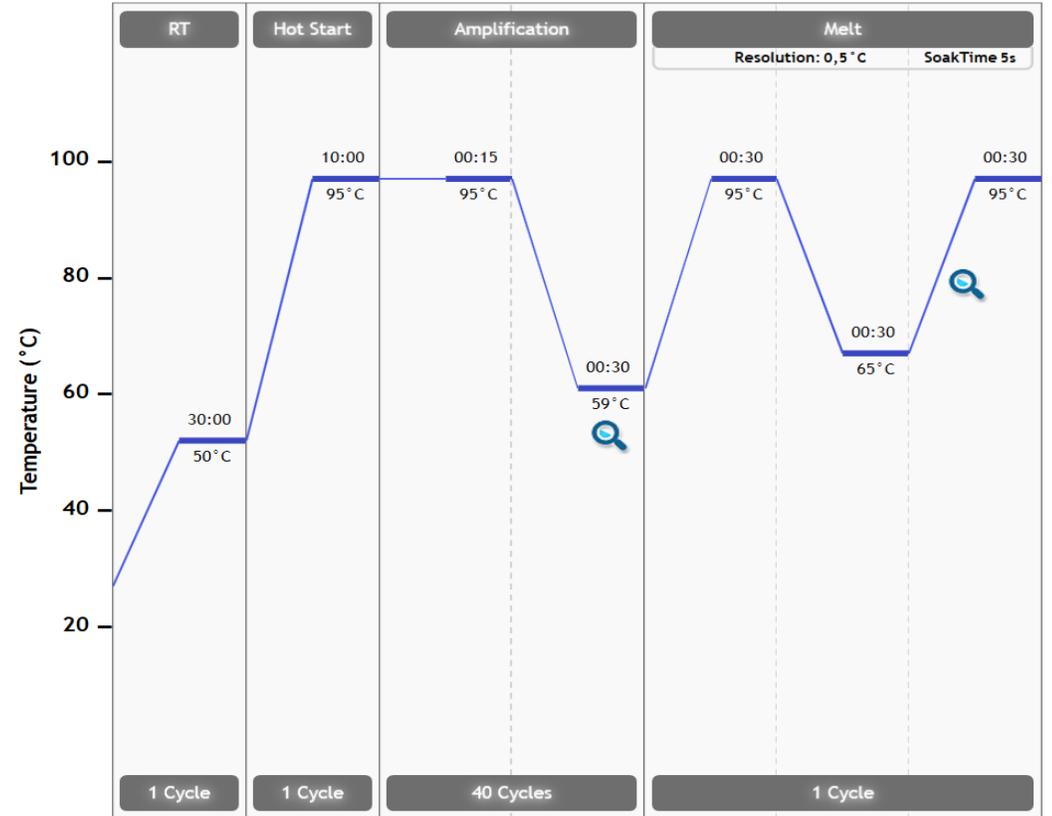
Curva de amplificación

Fluorescencia

Threshold Umbral

Ciclos

Perfil térmico de RT-qPCR



Quantification Strategies in real time qRT-PCR

M. W. Pfaffl, *BioSpektrum* 2004 (Sonderausgabe PCR)

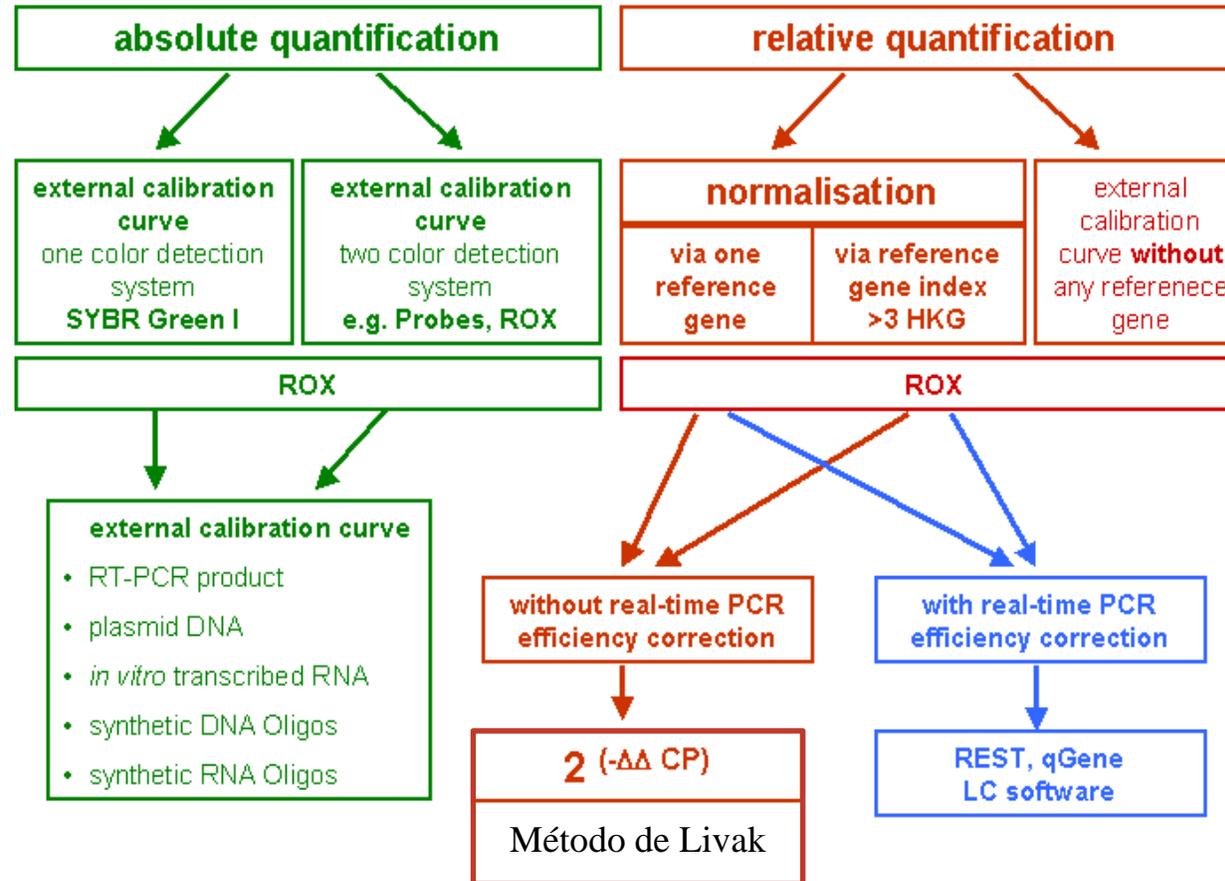


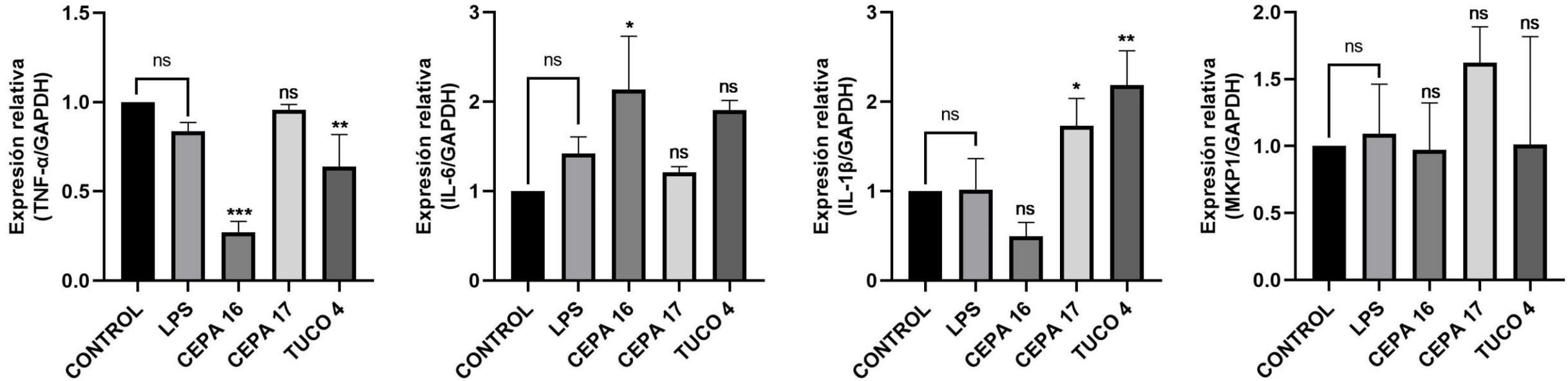
Figura 12. Estrategias de cuantificación en RT-PCR en tiempo real.

Fuente: <https://www.gene-quantification.de/strategy.html>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN / Objetivo 3

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

Figura 13. Expresión relativa de ARNm de citoquinas con relación a GAPDH en células DH82 tratadas con las formulaciones probióticas



CONCLUSIONES

- La liofilización de cepas de *Lactobacillus* spp. en fase estacionaria 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.
- 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, se demostró la capacidad de estas cepas encapsuladas como candidatos inmunomoduladores.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis costo-beneficio agregando nutrientes al medio de cultivo, considerando la utilización del sustrato y el rendimiento de la biomasa para tomar decisiones estratégicas de optimización.
- Se sugiere el desarrollo de una formulación probiótica multicepa debido a la similitud en el comportamiento de las cepas, lo que mejoraría la eficacia y estabilidad del producto final.

AGRADECIMIENTOS



**Universidad
de Concepción**

Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos (LBB). Universidad de Concepción, Chile.

Bq. Felipe Sandoval Sandoval
Universidad de Concepción, Chile

Dra. Thelvia Isabel Ramos, PhD.
Directora del proyecto de la Unidad de Integración Curricular
Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador

Dr. Jorge Roberto Toledo, PhD
Director del proyecto de la Unidad de Integración Curricular
Universidad de Concepción, Chile

Padre, madre, hermanos, sobrinos, amigas y amigos.



ANEXO 1. Clasificación de los sistemas defensivos

