



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
CÁTEDRA DE BACTERIOLOGÍA

**ESTUDIO DE DIFERENTES COMPOSICIONES
FARMACEUTICAS QUE CONTIENEN *Lactobacillus
fermentum* Y *Lactobacillus rhamnosus* PARA EL
TRATAMIENTO DE INFECCIONES VAGINALES**

ANA LISSA CAMILLETI

Trabajo Final de Grado para optar por el título de MICROBIÓLOGA

Directora: Dra. PASCUAL Liliana
Co-directora: Dra. BARBERIS Lucila

MARZO 2015

El presente trabajo se llevó a cabo siguiendo el reglamento de la asignatura Trabajo Final (código 2149), para la Carrera de Microbiología, avalado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Se realizó durante el año 2014 en el laboratorio de Bacteriología, ubicado en el Departamento de Microbiología e Inmunología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

ALUMNA **Ana Lissa Camilletti** _____

DIRECTORA **Dra. Liliana Pascual** _____

CO-DIRECTORA **Dra. Lucila Barberis** _____

JURADOS

Dra. Liliana Pascual _____

Dra. Cristina Bogni _____

Dra. Cristina Torres _____

AGRADECIMIENTOS

❖ A mi familia.

Papá, mamá, por ser mi apoyo afectivo, incondicional y también económico a lo largo de toda mi vida y sobre todo en esta etapa de estudiante universitaria que está llegando a su fin. Por ser mi sostén emocional y por enseñarme a ser una persona responsable, humilde y solidaria. Si no fuera por ustedes nunca hubiera llegado hasta acá, mis frutos son suyos también. Gracias infinitas!

Julián, que gracias a vos aprendí y conocí la amistad y cariño (a veces no tanto, je) entre hermanos, por haber crecido juntos y por tu tendencia constante a la alegría y jovialidad, al humor pícaro y sarcástico.

Dami, porque sos la persona que me acompañó en estos últimos seis años en cada paso que di, en mis logros y en mis pérdidas, en mis días alegres y en mis días negros, en la cercanía y en la distancia (que parecía infinita); porque sos otro de mis pilares, mi contención, amor, compañero y AMIGO. Gracias para siempre!!

A mis abuelos. Take y Abu, por esperarme ansiosamente cada fin de semana que volvía a casa, y despacharme de nuevo con algo rico!! Gracias por su afecto y preocupación. Abuela Cata, gracias por tu interés constante en mí, por tu cariño y complicidad.

❖ A mis queridas compañeras de carrera y amigas de siempre.

Mis Microzorras del alma: Kati, Sofi, Ku, Mile, Ili, Lau, Lina, Ani y Dey; sin ustedes mi vida universitaria nunca hubiera sido tan alegre!! Con quién salgo a dar una vuelta a la manzana cansada de estudiar si no hubiera sido por ustedes?? Gracias por las tardes de “estudio” (porque en realidad fueron de comer, dormir y pavear), por las noches de desenchufe, por los infinitos criollitos compartidos y los mates mocosos de alguna resfriada. Gracias por poder compartir con ustedes los momentos de nervios insoportables antes de rendir desde el parcialito más patético, hasta el final más difícil. Las quiero mucho chicas!!!

A mis amigas santarroseñas-riocuartenses, Jenni y Ceci, por las risas, helados, pelis, panchos, llantos, salidas, mates helados y tererés calientes compartidos en estos años de amistad, por su amistad, cariño y entusiasmo siempre... Gracias chicas!!

Aquellas amigas que desde siempre han estado presentes de una u otra forma conmigo, por ser mi apoyo psicológico y por ser las responsables del hecho de que siempre me sienta acompañada, llena de cariño y apoyo incondicional... Ellas son Cami, Sofi, Mili, Anita, Marti, Rocha, Mili y Agos. Pasarán los años y nuestra amistad seguirá intacta, gracias a mis bellas amigas!

Mis ex-compañeritas de carrera pero actuales compañeras de vida, aunque nuestros caminos empiecen a bifurcarse y cada vez nos veamos menos, siempre las tengo en mi corazón: Bel, Flor A., Flor B., Meli, Mari... gracias por compartir los primeros pasos de esta hermosa etapa juntas!!!

❖ Al grupo de Bacteriología de la UNRC.

Luci y Lili, por dedicar tiempo valioso a formarme práctica e intelectualmente, por los conocimientos inculcados y la predisposición constante.

Pauli Jose y Fran, que con tanta paciencia, voluntad y solidaridad han sabido aguantarme y ayudarme en todo lo que necesité mientras realicé este trabajo. Gracias por recibirme con los brazos abiertos y estar siempre dispuestos a darme una mano con lo que necesitara!!

❖ A todos mis compañeros del Espacio Independiente.

Con ustedes he aprendido todo lo que sé acerca de política universitaria, nacional e internacional. Porque gracias a este espacio tengo la oportunidad de formar parte en la construcción de una universidad pública, inclusiva, de excelencia académica y con compromiso social. A mis exactos queridos, gracias!!

❖ A toda la sociedad.

Porque con su sacrificio mantiene en pie a la Universidad Nacional de Río Cuarto, mi segundo hogar, el bello campus que todos los días en estos últimos cinco años me vio con las ojeras de la madrugada y la facha cansada de la tardecita cuando volvía a casa; gracias a la gente y a esta institución tuve la oportunidad de estudiar y hoy tener un título universitario para alzar con orgullo y agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
2.1 Bacterias ácido lácticas	14
2.2 Género <i>Lactobacillus</i>	14
2.2.1 Características morfológicas y culturales	14
2.2.2 Características bioquímicas	15
2.2.3 Nutrición y condiciones de crecimiento	15
2.3 Microbiota del tracto genitourinario.....	16
2.3.1 Microbiota vaginal de diferentes grupos etarios	16
2.4 Probióticos	17
2.4.1 Criterios para la selección de bacterias probióticas.....	17
2.4.2 Los lactobacilos como probióticos.....	19
2.4.2.1 Autoagregación, adhesión a células epiteliales y formación de biofilm .	20
2.4.2.2 Coagregación con microorganismos patógenos	21
2.4.2.3 Producción de metabolitos activos	21
2.4.2.3.1 Ácidos orgánicos.....	21
2.4.2.3.2 Peróxido de hidrógeno	21
2.4.2.3.3 Biosurfactantes	22
2.4.2.3.4 Bacteriocinas	22
2.5 Formulaciones farmacéuticas conteniendo <i>Lactobacillus</i> spp.....	24
2.6 Infecciones vaginales y genitales	27

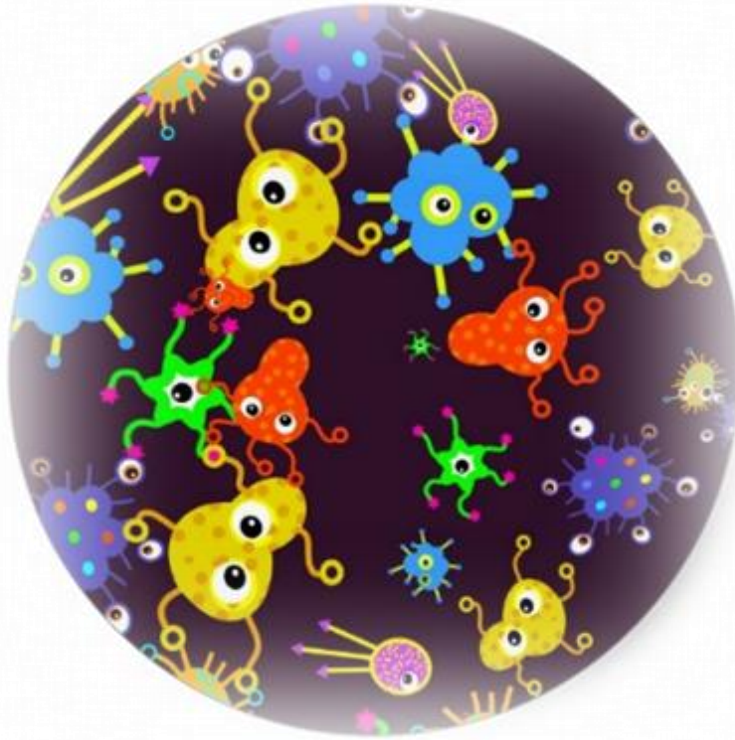
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Cepas utilizadas y medios de cultivo	31
5.2 Conservación de las cepas	32
5.3 Preparación de los óvulos	32
5.4 Estudio de supervivencia y estabilidad de los lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas.....	34
5.5 Preparación de suspensiones de L23 y L60 en distintas concentraciones de glicerina.....	35
5.6 Detección de la actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> y <i>L. rhamnosus</i> en las formulaciones farmacéuticas.....	35
a) Técnica de estrías cruzadas	35
b) Técnica de difusión en pozos	36
b1) Obtención del sobrenadante libre de células.....	36
b2) Ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en pozos....	36
5.7 Ensayo de producción de biofilm.....	37
5.8 Análisis estadístico.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Aislamiento de cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y obtención de las formulaciones farmacéuticas	39
6.2 Caracterización físico-química de las formulaciones farmacéuticas y control de calidad.....	41
6.3 Viabilidad y estabilidad de las cepas de lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas.....	41

6.4 Estudio de la viabilidad de los lactobacilos L23 y L60 con distintas concentraciones de glicerina	44
6.5 Detección de la actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> y <i>L. rhamnosus</i> presentes en los óvulos a través del tiempo mediante las técnicas de estrías cruzadas y de difusión en pozos	45
6.6 Producción de biofilm	52
7. CONCLUSIONES	55
8. BIBLIOGRAFÍA	57
9. ANEXO	67

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Mecanismos bioprotectores de <i>Lactobacillus</i> spp. cuando coloniza la mucosa vaginal.	20
Figura 2 Datos de incidencia mundial estimados de enfermedades de transmisión sexual curables por año.	27
Figura 3 Colonias pertenecientes al género <i>Lactobacillus</i> , cultivadas en agar MRS.	39
Figura 4 Microfotografía de un cultivo de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 (1000x).	40
Figura 5 Microfotografía de un cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 (1000x).	40
Figura 6 Recuento de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en la Formulación N°3.	42
Figura 7 Recuento de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en la Formulación N°4.	43
Figura 8 Fotografía de la técnica de estrías cruzadas para la determinación de actividad antimicrobiana.	46
Figura 9 Fotografía de la técnica de difusión en pozos con los sobrenadantes de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60.	48
Figura 10 Porcentajes promedio de la actividad inhibitoria de los metabolitos producidos por la cepa <i>L. fermentum</i> L23 en las distintas formulaciones.	51
Figura 11 Porcentajes promedio de la actividad inhibitoria de los metabolitos producidos por la cepa <i>L. rhamnosus</i> L60 en las distintas formulaciones.	51
Tabla 1 Géneros de microorganismos probióticos.	19
Tabla 2 Pruebas bioquímicas para identificar al género <i>Lactobacillus</i>	32
Tabla 3 Fórmula cuali-cuantitativa de las preparaciones farmacéuticas (para 1 óvulo).	33
Tabla 4 Preparación de las suspensiones de <i>L. fermentum</i> y <i>L. rhamnosus</i> en glicerina.	35

Tabla 5 Crecimiento de las cepas L23 y L60 en suspensiones a distintas concentraciones de glicerol.....	45
Tabla 6 Actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 presentes en los óvulos frente a una cepa de <i>E. coli</i> sensible por el método de estrías cruzadas.	46
Tabla 7 Actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 contenidos en las distintas formulaciones por un periodo de 180 días, por el método de difusión en pozos.....	49
Tabla 8 Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> por los SLC y SLCN de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 en las distintas formulaciones, por un período de 180 días.....	50
Tabla 9 Producción de biofilm en las cepas L23 y L60 presentes en los óvulos a través del tiempo.	53
Tabla 10 Ensayo de producción de biofilm por las cepas L23 y L60 control.	53



**“El mundo está dividido, fundamentalmente,
en bacterias y el resto”**

Richard Dawkins

**“Hasta las bacterias funcionan por consenso,
o no funcionan”**

Eduardo Punset

A mi Nonno, que tanto extraño...

1. RESUMEN

El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), el cual es muy importante desde el punto de vista de la salud humana y animal y muy frecuentemente algunas de sus especies son utilizadas como probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en un número adecuado, confieren un beneficio de salud al huésped. Desde hace algunos años, en la comunidad científica se ha mostrado un interés creciente en estos microorganismos debido a que su utilización puede mejorar la salud y prevenir enfermedades en el hombre. Gracias a su acción protectora, se utilizan como agentes de tratamiento y prevención de patologías como úlceras estomacales, diarreas infecciosas, enfermedades urogenitales, inflamación del colon, trastornos en la piel como dermatitis alérgica, herpes labial, acné, y en infecciones respiratorias.

Los lactobacilos son los microorganismos de mayor predominancia en la microbiota vaginal de la mujer sana en edad reproductiva, protegiéndola de posibles infecciones causadas por microorganismos patógenos y oportunistas. Esta actividad antimicrobiana de los lactobacilos se basa en numerosas propiedades, entre las que se encuentran su capacidad de adhesión específica al epitelio vaginal, coagregación con microorganismos patógenos, estimulación del sistema inmune local, producción de biofilm basada en la autoagregación e hidrofobicidad en superficie, exclusión competitiva de microorganismos patógenos del epitelio vaginal y la producción de metabolitos activos como biosurfactantes, antibióticos, bacteriocinas, peróxidos y ácidos orgánicos, sustancias antagonistas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Existen numerosos trabajos de investigación que demuestran que otra importante aplicación de los lactobacilos es como probióticos vaginales, ya que son efectivos en la prevención y tratamiento contra una variedad de bacterias implicadas frecuentemente en las infecciones del aparato genital femenino. El objetivo de este trabajo fue investigar *in vitro* la actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 probióticas en diferentes formulaciones farmacéuticas. Se evaluó y cuantificó la actividad inhibitoria de crecimiento microbiano de las cepas contenidas en los óvulos utilizando las técnicas de estrías cruzadas y de difusión en pozos. Para determinar el recuento de lactobacilos desde el momento de producción del óvulo hasta seis meses después se utilizó la técnica de dilución en placa por duplicado. Como método indirecto de valoración de la capacidad de adherencia al epitelio vaginal por producción de biofilm de las cepas de lactobacilos se utilizó la técnica de cristal

violeta. Los lactobacilos presentes en la Formulación N°1 se mantuvieron viables sólo por 40 días, mientras que de las Formulación N°3 y N°4 se recuperaron lactobacilos viables aun a los 180 días. La actividad inhibitoria del desarrollo bacteriano fue evaluada frente a *E. coli*, y dicha propiedad se mantuvo en el tiempo independientemente del recuento de cada cepa en cada formulación. Las cepas contenidas en las formulaciones farmacéuticas son productoras de biofilm, y mantienen esta capacidad a través del tiempo que duró la presente experiencia.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Bacterias ácido lácticas

El grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) está compuesto por numerosos géneros que originan ácido láctico como producto de fermentación. Los miembros de este grupo carecen de citocromos y porfirinas, no llevan a cabo transporte de electrones vía fosforilación, con lo que obtienen la energía solamente a través de la fosforilación a nivel de sustrato. Este grupo de bacterias se divide en dos subgrupos, clasificación que se basa en qué tipos de productos de fermentación generan a partir de los azúcares. El subgrupo llamado homofermentativo produce solamente ácido láctico, mientras que el heterofermentativo produce otros compuestos como etanol y dióxido de carbono. La diferencia está marcada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave de la glucólisis (Balamurugan y col., 2014; Zhong y col., 2014).

Dentro del grupo de las BAL, se encuentran numerosos géneros bacterianos, entre los que se encuentran bacilos como *Lactobacillus* spp. y *Carnobacterium* spp., y cocos como *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Oenococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Aerococcus* spp. (Bergey, 1994; Madigan y col., 2004).

2.2 Género *Lactobacillus*

2.2.1 Características morfológicas y culturales

El género *Lactobacillus* está compuesto por numerosas especies, y presentan una morfología bacilar, Gram positiva. Estos bacilos se disponen de forma aislada y casi todos son inmóviles, pero se han señalado excepciones por la presencia de flagelos peritricos. Su morfología puede variar según el tipo de especie, estado nutricional y etapa del crecimiento: coco-bacilos, bacilos delgados largos, bacilos gruesos cortos, y tipo coryneforme. Las colonias típicas de este género en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), circulares, convexas, claras, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Algunas especies forman colonias rugosas. Otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000; Rodríguez González, 2009).

2.2.2 Características bioquímicas

Los miembros del género *Lactobacillus* son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta pH 4. Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. No licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. No producen indol ni sulfhídrico (H₂S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000). Sin embargo, algunas cepas presentan proteasas ligadas a su pared o libres en el espacio extracelular, y pueden presentar ligera actividad proteolítica alrededor de la colonia. También existen cepas con débil actividad lipolítica debido a lipasas intracelulares. Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso (Law y Kolstad, 1983).

2.2.3 Nutrición y condiciones de crecimiento

Cada especie de *Lactobacillus* spp. presenta requerimientos nutricionales particulares, ya que además de los carbohidratos como fuente de carbono y energía, algunas de ellas necesitan que el medio contenga aminoácidos, péptidos, o derivados de ácidos nucleicos (Bergey, 1994). Otras necesitan vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de *Lactobacillus* spp. contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Estos compuestos se incluyen en el medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS), que es el medio de elección para lactobacilos (Pendharkar y col., 2013; Arakawa y col., 2014).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* spp. son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento (Madigan y col., 2004).

2.3 Microbiota del tracto genitourinario

La orina dentro de la vejiga es estéril, y su eliminación mecánica impide la colonización de microorganismos en la porción uretral cercana a la vejiga. Sin embargo, tanto en el hombre como en la mujer, en la porción anterior de la uretra pueden encontrarse algunos microorganismos como *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium* spp. y bacilos Gram negativos como *E. coli* y otras especies de enterobacterias. En los genitales externos se encuentran microorganismos que son microbiota habitual de la piel, como pueden ser difteroides, *Streptococcus* spp., y SCN, *Micrococcus* spp. y *Enterococcus* spp. En la mujer, la cercanía de la uretra con el ano favorece la colonización de microorganismos entéricos en el tracto urinario, lo que puede desencadenar infecciones urinarias. El rol de mantener el tracto genitourinario femenino sano es principalmente llevado a cabo por especies de *Lactobacillus*. La presencia de estos microorganismos funciona como marcador de una microbiota vaginal saludable (Madigan y col., 2004; Ruiz y col., 2009; Pendharkar y col., 2013; Rodrigues y col., 2014; Castro y col., 2015).

2.3.1 Microbiota vaginal de diferentes grupos etarios

La vulva de una niña recién nacida comienza dentro de las primeras 24 h de vida a ser colonizada por un bajo número de microorganismos no patógenos similares a los que habitan en la piel y mucosas maternas. Entre ellos *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., y escasos lactobacilos. Luego de 2-3 días, el estrógeno de la circulación materna transferido pasivamente en la lactancia induce el depósito de glucógeno en el epitelio vaginal favoreciendo el desarrollo de *Lactobacillus* spp. Antes de la pubertad, el glucógeno disponible y los lactobacilos desaparecen y la vagina femenina se torna alcalina y en la microbiota predominan *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., difteroides y *E. coli*.

En la pubertad el glucógeno retorna lentamente por la actividad ovárica y se deposita en las paredes de la mucosa vaginal, donde reaparecen los lactobacilos, se acidifica el medio y el pH vaginal alcanza valores entre 4,4-4,6 en condiciones fisiológicas normales. Durante la menarca, las adolescentes presentan una microbiota vaginal dominada por *Lactobacillus* spp, frecuentemente con otras BAL y algunos anaerobios que sin causar infección, habitan como especies comensales de la vagina.

La microbiota vaginal en mujeres adultas sanas consiste en una amplia variedad de géneros microbianos, donde se destaca el género *Lactobacillus*. El glucógeno presente en la vagina es utilizado por los lactobacilos para producir ácidos

reduciendo el pH vaginal. Las especies más relevantes son: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*., *L. vaginalis*, entre otras. Otros microorganismos en menor número son *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Bacteroides* spp. *Peptoestreptococcus* spp., *Anaerococcus* spp., algunas levaduras, entre otros. Una vagina deficiente de especies de *Lactobacillus* está asociada con el desarrollo de numerosas infecciones, como vaginosis bacteriana, vaginitis y aumento en el riesgo de adquirir una enfermedad de transmisión sexual.

Luego de la menopausia desaparece el glucógeno por el cese de la actividad ovárica, se eleva el pH y la microbiota se asemeja a la de las niñas premenárquicas en donde los microorganismos predominantes son *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp. y bacterias entéricas (Madigan y col., 2004; Martín y col., 2008; Datcu, 2014; Madhivanan y col., 2014; van de Wijgert y col., 2014).

El nonoxinol-9 es un compuesto químico ampliamente usado en profilácticos y óvulos vaginales para la prevención de embarazos gracias a su propiedad espermicida. Ejemplos de esto son las marcas comerciales de óvulos vaginales Lorophyn®, Orofem® y Noceptin®. En el año 2006 Pascual y col., pertenecientes al grupo de investigación del laboratorio de Bacteriología de la UNRC, evaluaron la resistencia de varias especies de *Lactobacillus* aisladas de vagina al nonoxinol-9 (N-9). 50 cepas (80,6%) fueron sensibles al N-9 y 12 cepas (19,4%) fueron resistentes al efecto inhibitorio del N-9. Estos resultados permitieron establecer que el N-9 tiene efectos nocivos sobre las especies nativas vaginales de *Lactobacillus* si se lo administra como gel, crema u óvulos vaginales.

2.4 Probióticos

2.4.1 Criterios para la selección de bacterias probióticas

Según la FAO/WHO, el término probiótico es una palabra que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar a microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped. Por esta razón, los microorganismos probióticos pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos.

Según Klaenhammer (2001), para que un organismo sea considerado probiótico debe cumplir con la mayoría de los siguientes criterios:

- ✓ Inocuidad o carácter GRAS (“Generally Regarded As Safe”: reconocido como seguro para la salud)
- ✓ Identificación taxonómica por secuenciación de rRNA
- ✓ Origen: habitante de la microbiota normal y aislado de individuos sanos
- ✓ Resistencia frente a antibióticos
- ✓ Estabilidad tecnológica:
 - a) Adecuado crecimiento, recuperación, almacenamiento, deshidratación y distribución en el producto
 - b) No afectar las propiedades organolépticas
 - c) Factibilidad de reproducción a mayor escala
 - d) Resistencia a fagos
 - e) Si forman parte de un alimento, estabilidad de propiedades probióticas durante la vida útil del mismo
 - f) Estabilidad fenotípica y genotípica
- ✓ Competitividad:
 - a) Sobrevivir, proliferar y presentar actividad metabólica *in vivo*
 - b) Resistente a la bilis y acidez gástrica
 - c) Competir con la microbiota normal
 - d) Adherencia a epitelio mucoso y colonización del mismo
- ✓ Capacidad de producir sustancias antimicrobianas y compuestos bioactivos (antibióticos, bacteriocinas, ácidos orgánicos, etc.)
- ✓ Habilidad para ejercer efectos benéficos sobre el huésped
- ✓ Inmunoestimulación del huésped

Son muchos los géneros de bacterias que actualmente se considera que tienen características probióticas, entre ellos se destacan los mencionados en la Tabla 1.

Tabla 1 Géneros de microorganismos probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i> y otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetylactis</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>L. lactis</i>			<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentes</i>				<i>S. boulardii</i>
<i>L. kefir</i>	<i>B. breve</i>				<i>Leuconostoc</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. longum</i>				
<i>L. fermentum</i>					
<i>L. reuteri</i>					
<i>L. helveticus</i>					
<i>L. plantarum</i>					
<i>L. johnsonii</i>					
<i>L. salivarius</i>					

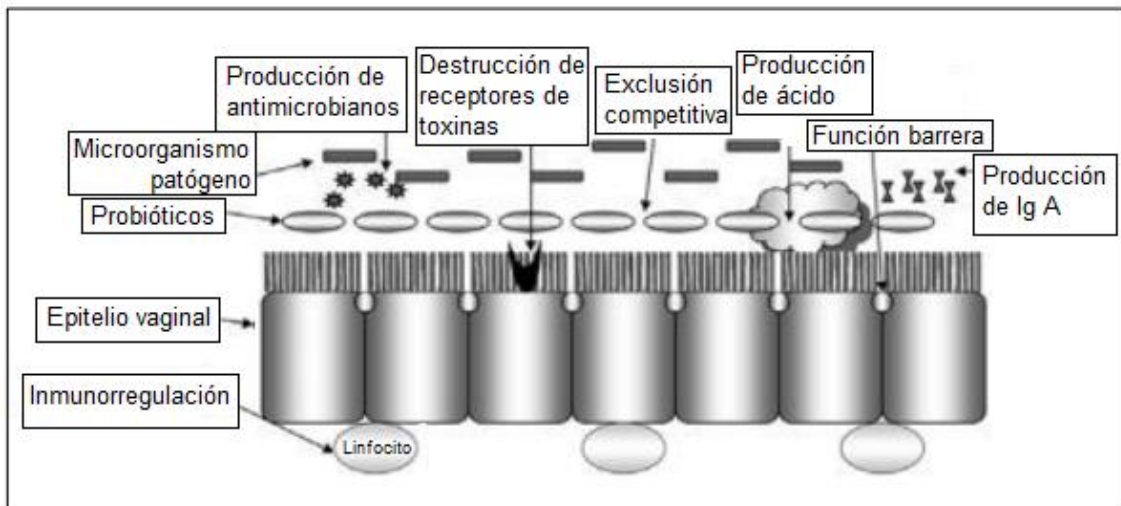
Vera Cusme, 2013.

2.4.2 Los lactobacilos como probióticos

Los lactobacilos son los microorganismos de mayor predominancia en la microbiota vaginal, donde también cohabitan otras especies en menor número, formando un equilibrio. Cuando ese equilibrio se rompe, puede deberse a una reducción en la población bacteriana autóctona o a un sobrecrecimiento de otras especies, y esto se traduce en la aparición de patologías. Algunas especies de *Lactobacillus* son probióticas y aparecen como un tratamiento de elección alentador en estos casos, ya que restituyen la microbiota normal. Dicha terapia se considera natural y sin efectos colaterales, en contraste con los tratamientos farmacéuticos convencionales. Existen evidencias científicas en todo el mundo que indican que la administración de lactobacilos representa una alternativa interesante a las terapias antibióticas actualmente prescritas para infecciones a repetición o recidivas de infección. Estos probióticos se han establecido recientemente como un método natural, seguro, económico y alternativo para la protección del tracto genitourinario de la mujer adulta (Reid, 2003; Reid y Burton, 2002; Mejía Rodríguez y col., 2007; Pérez Leonard, 2007; Verdenelli y col., 2009; Rodríguez González, 2009; Ruiz y col., 2009; Pascual y col., 2010; De Gregorio y col., 2012; Kaewnopparat y col., 2013; Castro y col., 2015; Poornachandra Rao y col., 2015).

Son varios los mecanismos por los cuales el género *Lactobacillus* se comporta como bioprotector contra microorganismos patógenos cuando coloniza la vagina de la

mujer, entre los que se encuentran la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, inmunorregulación por estimulación de linfocitos y de producción de inmunoglobulina A, exclusión competitiva de microorganismos patógenos de receptores celulares epiteliales, coagregación con dichos microorganismos patógenos (Fig. 1).



Vera Cusme, 2013.

Figura 1 Mecanismos bioprotectores de *Lactobacillus* spp. cuando coloniza la mucosa vaginal.

2.4.2.1 Autoagregación, adhesión a células epiteliales y formación de biofilm

La autoagregación de lactobacilos es un fenómeno que induce la adhesión al epitelio vaginal y el desplazamiento de microorganismos patógenos. Para que la autoagregación ocurra, deben existir en la superficie celular sustancias tensoactivas. A medida que los lactobacilos se autoagregan, ocurre el fenómeno de adhesión a las células epiteliales vaginales, lo que a su vez estimula aún más la autoagregación microbiana y la proliferación para formar microcolonias. En el proceso de adhesión de estos microorganismos están involucrados dos mecanismos: uno no-específico, dependiente de las propiedades físico-químicas de las bacterias y de la mucosa, que origina diferentes tipos de interacciones entre ellas, y otro específico, que involucra la interacción o unión de las estructuras externas de la bacteria (adhesinas) a receptores específicos del epitelio. Los lactobacilos producen y excretan un exopolisacárido que consolida la unión a la superficie, y los microagregados se diferencian entonces en biofilms característicos. De esta manera, estas bacterias pueden participar en la competencia con microorganismos patógenos por los sitios específicos de adherencia, producir impedimento estérico (exclusión competitiva), o emplear los nutrientes disponibles, evitando así el ingreso, crecimiento o multiplicación de los microorganismos patógenos (Boris y col., 1997; Boris y col., 1998; Ocaña y Nader

Macías, 2002; Juárez Tomás y col., 2005; Nader Macías y col., 2007; Pascual y col., 2008b; Martín y col., 2012; Malik y col., 2013; Leccese Terraf y col., 2014).

2.4.2.2 Coagregación con microorganismos patógenos

Se ha observado *in vivo* que los lactobacilos muestran una fuerte adhesión a microorganismos patógenos, lo que puede explicar el bloqueo y eliminación de los mismos (Ekmekci y col., 2009). Este fenómeno se conoce como coagregación, que es uno de los mecanismos reconocidos a través del cual los lactobacilos pueden ejercer su actividad antimicrobiana y crear un micro-ambiente hostil alrededor del agente patógeno. Por otra parte, el fortalecimiento de estas fuerzas de adhesión por aumento en la población de lactobacilos resulta en coagregados significativamente más duraderos y se ha visto que la adhesión entre las cepas se produce en el mismo instante en que entran en contacto, lo que demuestra el potencial de los probióticos para producir un rápido efecto anti-patógeno (Boris, 1998; Younes y col., 2012).

2.4.2.3 Producción de metabolitos activos

2.4.2.3.1 Ácidos orgánicos

El pH ácido de la vagina es producido por el metabolismo fermentativo de los glúcidos, que llevan a cabo las especies del género *Lactobacillus*. Las células vaginales tienden a acumular glucógeno, especialmente durante el período comprendido entre la menarca y la menopausia (edad fértil), por lo que se considera que este glúcido es la fuente de la que deriva la acidez vaginal. Otros ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos son el ácido fórmico y ácido acético, que en conjunto con el ácido láctico disminuyen el pH del medio (aproximadamente a pH 4). Este mecanismo de protección de la mucosa es muy eficaz, ya que inhibe parcial o totalmente el desarrollo de la mayor parte de las bacterias procedentes del tracto digestivo y de las de origen ambiental (Vera Cusme, 2013).

2.4.2.3.2 Peróxido de hidrógeno

Algunos lactobacilos, mantenidos en condiciones aeróbicas, liberan cantidades relativamente altas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al medio ambiente. Este H_2O_2 es un subproducto de la oxidación de hidratos de carbono, y al ser una especie reactiva del oxígeno (ERO), podría ser un indicador de la aparición de otras sustancias de este grupo, como el superóxido radical ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}). El efecto bactericida del H_2O_2 está determinado por su alta capacidad de reaccionar sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando un daño celular oxidativo permanente. A pesar de que los lactobacilos no producen la típica catalasa que contiene el grupo hemo, poseen

otro mecanismo de protección en contra de su propio peróxido de hidrógeno, basado en la síntesis de una catalasa hexamérica o tetramérica que contiene manganeso, a veces descrita como pseudocatalasa o catalasa/peroxidasa (Strus y col., 2006; Martín y col., 2008).

2.4.2.3.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes microbianos son un grupo de agentes activos que una vez producidos se adhieren a la superficie celular o bien son producidos extracelularmente. Se trata de moléculas anfífilas de distinta naturaleza, como pueden ser glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos y compuestos poliméricos (Sharma y col., 2014). Los biosurfactantes producidos por algunos *Lactobacillus* spp. inhiben la adherencia bacteriana, poseen propiedades antimicrobianas y tienen la capacidad de atraer macrófagos, leucocitos, citoquinas y otras defensas del huésped (Velraeds y col., 1996; Jiménez Pacheco y Jiménez Pacheco, 2013).

2.4.2.3.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son definidas como sustancias antimicrobianas producidas por diversas especies de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Químicamente son metabolitos secundarios que presentan un núcleo proteico al cual se unen glúcidos, lípidos, ARN, etc. de peso molecular y propiedades bioquímicas variables. Su espectro de acción abarca tanto especies relacionadas como otras especies no relacionadas filogenéticamente, e incluso a cepas diferentes dentro de la misma especie. Se sintetizan en los ribosomas aunque algunas requieran una extensa modificación post traduccional. La síntesis de estos compuestos antimicrobianos se lleva a cabo gracias al metabolismo secundario de las BAL. El mecanismo de acción de las bacteriocinas es complejo, y la acción letal tiene lugar en dos fases: primero la bacteriocina se absorbe a receptores específicos en la envoltura celular y posteriormente ocurre la destrucción de la integridad de la membrana a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Stern y col., 2006; Martín y col., 2008; Pérez y col., 2014).

Algunas bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico son tolerantes a altas temperaturas, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana tras someterlas a temperaturas de pasteurización para su utilización en la industria alimenticia. A su vez existen bacteriocinas resistentes a pH bajos, como el característico de la mucosa vaginal. Estas sustancias antimicrobianas actúan en concentraciones muy bajas, específicamente a nivel nanomolar. Por el contrario, la

mayoría de los antibióticos utilizados en medicina clínica tienen actividad en concentraciones del orden micromolar (Zendo, 2013).

No se han reportado efectos secundarios ni resistencia bacteriana a las bacteriocinas producidas por lactobacilos, lo que resalta la importancia de este compuesto como metabolito antimicrobiano. Esto se debe a que además de actuar a muy bajas concentraciones, las bacteriocinas de las BAL no permanecen en el ambiente, por lo que las cepas que se encuentren allí tienen pocas probabilidades de desarrollar resistencia (Dobson y col., 2012; Wang y col., 2013; Zendo, 2013).

Existen estudios de aislamiento y caracterización de bacteriocinas producidas por BAL aisladas de vagina que demostraron poseer actividad antimicrobiana sobre microorganismos patógenos vaginales humanos (Juárez Tomás y col., 2002; Pascual y col., 2008a). Dentro de este grupo de bacterias, se ha reportado que existen bacteriocinas producidas por el género *Lactobacillus* que poseen acción inhibitoria sobre una gran diversidad de géneros bacterianos como *Prevotella bivia*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Alpay Karaoğlu y col., 2002; Matu y col., 2010; Daniele y col., 2011; Ruiz y col., 2012).

Son varios los autores que han intentado clasificar a las bacteriocinas en base a sus características genéticas y bioquímicas. La clasificación que se presenta a continuación de estos compuestos fue propuesta en base a las características bioquímicas y genéticas (Cotter y col., 2005; Nes y col., 2007):

Clase I.- Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. En este grupo se identifican dos subclases:

Clase IA: son lantibióticos modificados por dos enzimas diferentes (LanB y LanC) y son procesados por una serin proteasa LanP.

Clase IB: son lantibióticos modificados por la enzima LanM, y simultáneamente exportados y activados por el transportador ABC LanT, con actividad proteasa en el N-terminal.

Clase II.- Bacteriocinas cortas no modificadas estables al calor.- Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. Son estructuralmente más simples que los lantibióticos porque no poseen modificaciones post-traduccionales. En este grupo se pueden identificar cinco subclases:

Clase IIA.- Son péptidos fuertemente activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y su representante característico es la pediocina PA-1.

Clase IIB.- Son formadores de complejos de poración que consisten en dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentra la plantaricina EF.

Clase IIC.- Bacteriocinas que no están incluidas en ninguna subclase, por ejemplo la lactococcina A.

Clase IID.- Incluye a las bacteriocinas que carecen de secuencia líder, como la aureocina A-53.

Clase IIE.- Péptidos formados por degradación específica de proteínas más grandes. En esta subclase se encuentra la bacteriocina HP de *Helicobacter pylori*.

Clase III.- Proteínas grandes.-

Clase IIIA.- Está representado por las bacteriocinas tipo lisinas.

Clase IIIB.- Incluye bacteriocinas no líticas

Clase IV.- Bacteriocinas cíclicas.- este grupo contiene péptidos circulares covalentemente cerrados, y la bacteriocina AS-48 de *E. faecalis* es la más estudiada de este grupo hasta el momento.

2.5 Formulaciones farmacéuticas conteniendo *Lactobacillus* spp.

Las primeras investigaciones sobre microorganismos probióticos para su aplicación en urología se remontan a la primera mitad del siglo XX. Los estudios que se han reportado apuntan al efecto benéfico de los probióticos para la prevención de las infecciones genitourinarias en mujeres. Sin embargo, son necesarios un mayor número de estudios, con muestras más amplias, para poder considerarlos una alternativa terapéutica fiable y efectiva, ya que el número de ensayos clínicos de este tipo es escaso hasta la fecha (Jiménez Pacheco y Jiménez Pacheco, 2013).

Los primeros estudios utilizando formulaciones farmacéuticas conteniendo cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. fueron realizados dos décadas atrás. En la experiencia de Reid y col. (1992), cuarenta y un mujeres adultas con infecciones agudas del tracto urinario inferior (UTI) fueron tratadas aleatoriamente con trimetoprim/sulfametoxazol o norfloxacin, y luego se les realizó una post-terapia con supositorios conteniendo *Lactobacillus* spp. La infección fue erradicada en un 95-100%, pero la recurrencia de la misma fue menor en los casos de administración de formulaciones conteniendo lactobacilos luego de la terapia con alguno de los dos antibióticos. Este estudio indicaba que los supositorios vaginales de *Lactobacillus* spp. podían ser eficaces en la reducción de la recurrencia de la infección del tracto urinario después de la terapia antimicrobiana.

Ya en el año 2000, Maggi y col. proponen una idea innovadora, diseñando óvulos en doble capa conteniendo diez cepas distintas de *Lactobacillus* spp. Este sistema de dos capas se caracterizaba por diferentes propiedades de liberación: una es una composición efervescente que asegura una distribución rápida y completa del ingrediente activo sobre toda la superficie vaginal, mientras que la segunda es una composición de liberación sostenida capaz de liberar los lactobacilos durante un período de tiempo más largo.

En 2006, Uehara y col. comprobaron la utilidad de supositorios conteniendo *Lactobacillus* spp. en una formulación que a su vez contenía el excipiente Witepsol H15 (Warner Graham Co., Cockeysville, MD, USA). Esta fórmula contiene triglicéridos en una proporción máxima, 15% de diglicéridos y no más de 1% de monoglicéridos. Se caracterizan por poseer las temperaturas de fusión y de solidificación muy próximas entre sí. Las tabletas inoculadas, mezcladas y solidificadas conteniendo la cepa probiótica se mantuvieron a 4 °C. Se investigó la viabilidad de la cepa durante 1, 2, 4 y 8 semanas, para comprobar su estabilidad a dicha temperatura, obteniendo resultados satisfactorios (el número de UFC no se modificó significativamente en ese período).

Stapleton y col., en 2011 ensayaron los óvulos comerciales Lactin-V® en cien mujeres jóvenes con antecedentes de infecciones urinarias recurrentes. Ellas fueron tratadas primero con antimicrobianos para la infección urinaria aguda y luego fueron asignadas al azar para administrarles ya sea Lactin-V® o placebo diariamente durante 5 días, y luego una vez por semana durante 10 semanas. Obtuvieron resultados satisfactorios ya que las mujeres con infecciones urinarias disminuyeron la recurrencia de la enfermedad al utilizar estos óvulos luego del tratamiento con antibióticos.

Como afirman por otra parte más recientemente Rodrigues y col. (2014), formulaciones conteniendo *Lactobacillus acidophilus* con polietilenglicol 400 y 4000 o Witepsol H12 como excipientes son prometedoras como probióticos vaginales. Los tres excipientes evidenciaron ausencia de citotoxicidad en tres diferentes líneas de células vaginales.

En otra publicación reciente (Vera Pingitore y col., 2014) se informó un diseño de formulaciones farmacológicas urogenitales que contenían lactobacilos, salivaricina CRL 1328 (una bacteriocina) y compuestos no microbianos con diferentes funcionalidades. La viabilidad de los lactobacilos se vio afectada en diferentes grados dependiendo de las cepas y en las formulaciones ensayadas. *L. salivarius* y ácido ascórbico se combinaron con éxito sólo después del proceso de liofilización. La actividad de salivaricina no se detectó en las formulaciones que contenían *L. gasseri*. Sin embargo, cuando la combinaron con ácido ascórbico, lactosa, inulina o *L. salivarius*, la bacteriocina mantuvo su actividad durante 360 días. Los microorganismos seleccionados demostraron ser compatibles para su inclusión en formulaciones multi-cepas junto con lactosa, inulina y ácido ascórbico. La salivaricina podría incluirse únicamente en una formulación incluyendo una sola cepa de *L. salivarius* junto con las sustancias no microbianas.

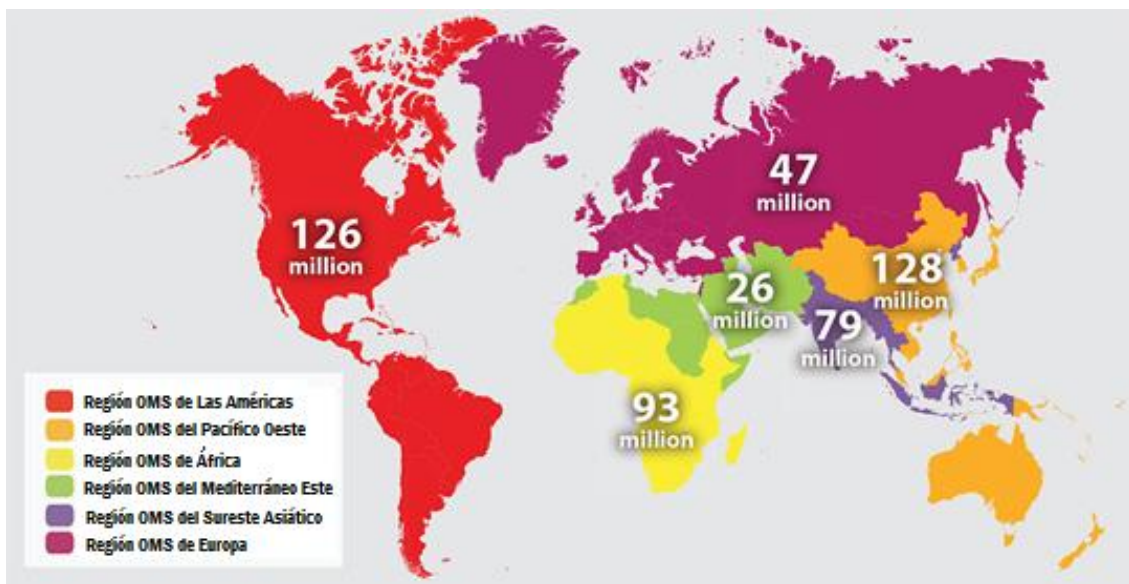
En el estudio de Donders y col. (2014) se investigó el potencial uso de tabletas vaginales conteniendo *L. acidophilus* y bajas dosis de estradiol para el tratamiento de la atrofia vaginal en pacientes con cáncer de mama y posmenopáusicas. Obtuvieron resultados muy satisfactorios ya que los síntomas clínicos de atrofia mejoraron rápidamente durante el tratamiento inicial y también durante la terapia de mantenimiento posterior.

Existen muchas marcas comerciales extranjeras de óvulos vaginales conteniendo cepas probióticas de *Lactobacillus*, tales son los casos de Lactin-V®, Synbio®, Normogin®, AntiCand 30®, Muvagyn®, Bactocin®, Florisia®, Ecocillin®, Gynoflor®. Todas ellas se encuentran protegidas legalmente bajo derechos de autor, por lo que no está disponible públicamente su composición química y microbiológica exacta. En Argentina sólo se produce una marca comercial de óvulos vaginales con probióticos (Lactinex®), que contienen *L. acidophilus* y dióxido de silicio y Witepsol S55 como excipientes.

2.6 Infecciones vaginales y genitales

Según los datos actualizados de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), hay más de 30 diferentes bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades de transmisión sexual (ETS), que se distribuyen principalmente por contacto sexual, incluyendo el sexo vaginal, anal y oral. Pueden dar lugar a enfermedades crónicas, SIDA, complicaciones durante el embarazo, infertilidad, cáncer cervicouterino y muerte. Ocho de los agentes patógenos que pueden ser transmitidos por contacto sexual se han relacionado con la mayor incidencia de ETS. De estas ocho infecciones, cuatro son actualmente curables: sífilis, gonorrea, clamidiasis y tricomoniasis. Las otras cuatro son infecciones virales y son incurables, pero pueden ser mitigados o modulados a través del tratamiento: hepatitis B, herpes genital, VIH y VPH.

Según las estadísticas de esta organización (2013), más de 1 millón de personas adquieren una ETS todos los días. Cada año, un estimado de 500 millones de personas se enferman con una de las cuatro ETS más importantes: clamidiasis, gonorrea, sífilis y tricomoniasis (Figura 2).



WHO, 2008.

Figura 2 Datos de incidencia mundial estimados de enfermedades de transmisión sexual curables por año.

Debido a la creciente resistencia de microorganismos patógenos a antibióticos, surge la necesidad de encontrar una alternativa al tratamiento de estas ETS, como lo es el uso de probióticos vaginales. Existe evidencia en numerosos trabajos de investigación que *Lactobacillus* spp. posee propiedades antimicrobianas *in vitro* contra

una gran diversidad de agentes patógenos causantes de patologías como gonorrea, clamidiasis, infecciones por *Streptococcus agalactiae*, candidiasis, vaginosis bacteriana, entre otras (Mastromarino y col., 2008; Asurmendi, 2010; Gerbaldo y col., 2012; Ruiz y col., 2012; Vicariotto y col., 2012; Vilela, 2013; Gong y col., 2014; Mastromarino y col., 2014; Murina y col., 2014; Shigemura y Fujisawa, 2014; Ruiz y col., 2015).

La vaginosis bacteriana (VB) ha sido subestimada por muchos años como enfermedad, pero a partir del último siglo se asoció con muchas enfermedades obstétricas y ginecológicas y en la actualidad, ha cobrado una gran importancia (Larsson y col., 2005). Al ser una enfermedad polimicrobiana, el enfoque de su estudio debe ser diferente al de aquellas enfermedades con un agente causal único y conocido. En las pacientes con VB existe un desequilibrio microbiológico donde los lactobacilos son reemplazados o superados por un gran número de bacterias anaerobias estrictas o facultativas, que están presentes en pequeñas concentraciones en la vagina sana y colonizan habitualmente el tracto digestivo bajo. Aún se desconoce cuáles son los eventos que desencadenan el establecimiento de la VB. Un gran porcentaje de las pacientes la cursan de forma asintomática, mientras que otras pueden presentar una VB sintomática y recurrente con resistencia a los tratamientos normalmente efectivos. Entre las principales bacterias que desde hace algunos años son reconocidas como agentes asociados a la VB y que fueron identificadas por pruebas bioquímicas y biología molecular se encuentran: *G. vaginalis*, especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, entre otras (Martínez Martínez, 2013).

Se han reportado varios estudios acerca de la fuerte capacidad antagonista que tienen los lactobacilos al excluir competitivamente del epitelio vaginal al principal agente de esta patología: *G. vaginalis*. A su vez, algunos de ellos aseguran que esta propiedad bioprotectora se mantiene en el tiempo, y que es capaz de, luego de administraciones repetitivas, disminuir la recurrencia de las infecciones (Coudeyras y col., 2008; Mastromarino y col., 2009; Matu y col., 2010; Hurtado Escamillo y col., 2011; Castro y col., 2013; Mastromarino y col., 2013; Parma y col., 2013; Daniele y col., 2014; Vicariotto y col., 2014).

3. HIPÓTESIS

Luego de analizar la información citada se plantea la siguiente hipótesis:

- ✓ “Las diferentes formulaciones farmacéuticas testeadas en este trabajo mantienen viable y constante el número de lactobacilos probióticos como así también sus propiedades antimicrobianas a través del tiempo”.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Investigar *in vitro* la actividad antimicrobiana en diferentes formulaciones farmacéuticas de cepas de lactobacilos probióticas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar diferentes formulaciones farmacéuticas con *L. fermentum* y *L. rhamnosus*, con características probióticas.
- ✓ Estudiar la viabilidad de las cepas de lactobacilos probióticos en cada formulación farmacéutica.
- ✓ Determinar la capacidad de las formulaciones farmacéuticas para mantener constante el número de lactobacilos.
- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana de los lactobacilos a través del tiempo en las diferentes formulaciones farmacéuticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas utilizadas y medios de cultivo

Se utilizaron dos cepas de lactobacilos vaginales productoras de bacteriocinas: *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. Estas cepas han sido aisladas por el equipo de investigación del laboratorio de Bacteriología, perteneciente al Departamento de Microbiología e Inmunología. En numerosos trabajos anteriores las cepas fueron estudiadas y posteriormente seleccionadas por sus características probióticas. En dichos estudios previos fue demostrado que *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 sintetizan ácidos orgánicos, y que *L. rhamnosus* L60 produce, además, peróxido de hidrógeno. Las bacteriocinas producidas por estas cepas fueron caracterizadas y purificadas (Pascual, 2004; Pascual y col., 2006; Pascual y col., 2008a,b).

Como medio de cultivo para el aislamiento de los lactobacilos se utilizó agar Rogosa o agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) de Britania®, y fueron incubados en microaerofilia (5% de CO₂) a 37° C, durante 24 h. A las colonias aisladas se les realizó la tinción de Gram. Para llegar a la identificación de género se realizaron las pruebas bioquímicas sugeridas en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Tabla 2) y mediante el sistema de galerías API 50 CH (bioMérieux®) de identificación de lectura automatizada, se identificó a nivel de especie (Ruiz y col., 2009). Este último sistema consta de 49 azúcares, que permiten identificar al microorganismo mediante el estudio de la fermentación de carbohidratos y sus derivados heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos. La bacteria aislada a identificar con este sistema es suspendida en el medio API 50 CHL, llenando cada una de las 49 cápsulas de la galería. Algunos carbohidratos y derivados contenidos en la galería son: Erytriol, L-Xilosa, D-Adonitol, Dulcitol, Inositol, Inulina, D-Rafinosa, Xilitol, D-Lixosa, D-Fructosa, D-Arabitol, L-Arabitol, Potasio 5-Cetogluconato.

En las experiencias del presente estudio se utilizó como control una cepa de *Escherichia coli* aislada del tracto urogenital humano, la cual es sensible a las bacteriocinas características producidas por las cepas L23 y L60.

Tabla 2 Pruebas bioquímicas para identificar al género *Lactobacillus*.

Gelatinasa	Catalasa	Producción de SH ₂	Producción de Indol	Movilidad	Reducción de NO ₃	Citocromo
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, 1994.

5.2 Conservación de las cepas

La conservación de las cepas de lactobacilos se realizó cultivando L23 y L60 en un overnight de caldo MRS (18h, 37 °C, 5% CO₂). Pasado ese tiempo los caldos fueron adicionados con 30% de glicerol estéril y conservados a -20° C.

Para la conservación de la cepa de *E. coli* sensible se utilizó caldo Trypticase Soya de Britania®, y se incubó a 37° C durante 24 h, en aerobiosis. Los caldos fueron adicionados al 30% con glicerol estéril como crioprotector y conservados a -20° C.

5.3 Preparación de los óvulos

Se preparó un inóculo de cada cepa de lactobacilos a -20° C y se estrió por agotamiento en agar MRS para su aislamiento. Se incubó durante 24 h a 37° C con una atmósfera de 5% de CO₂ y a las colonias obtenidas se les realizó la tinción de Gram. Las mismas fueron inoculadas en caldos MRS para obtener masa bacteriana. Se incubó en microaerofilia a 37° C durante 24 h. Posteriormente los caldos fueron centrifugados durante 20 minutos a 3000 rpm, se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos bacterianos fueron recuperados en tubos estériles.

Para la preparación de los óvulos se utilizó el método de fusión. Consiste en fundir los excipientes y disolver en estos el principio activo para después solidificar la masa en los moldes. Los excipientes de cada preparación farmacéutica son de calidad especificada por la Farmacopea Argentina y se describen en la Tabla 3. Para cada formulación se realizaron 4 óvulos conteniendo como principio activo a la cepa L23 y 4 óvulos conteniendo a la cepa L60. La Formulación N°2 (F2) es un duplicado de la Formulación N°1 (F1), ya que poseen idéntica composición química.

Tabla 3 Fórmula cuali-cuantitativa de las preparaciones farmacéuticas (para 1 óvulo).

Materia prima	Formulación N°1	Formulación N°2	Formulación N°3	Formulación N°4
Lactobacilos + glicerina	4,0 g	4,0 g	2,5 g	1,25 g
Gelatina	0,8 g	0,8 g	1,0 g	1,0 g
Agua de ósmosis inversa	3,2 g	3,2 g	4,5 g	5,75 g
Porcentaje final de glicerina	50%	50%	30%	16%

El proceso de elaboración de los óvulos con probióticos reconstituyentes de la microbiota vaginal se llevó a cabo bajo condiciones que garantizaran la calidad del producto y que se detallan a continuación:

Consideraciones previas:

- 1) Se verificó que los elementos y equipos utilizados en las mediciones de peso y volumen estuviesen calibrados.
- 2) Se verificó que las condiciones de ambiente de trabajo fueran las adecuadas (temperatura, humedad, limpieza, etc.).
- 3) Se comprobó que la temperatura límite de campana estuviese en 37-38° C.
- 4) El preparador utilizó elementos de protección (barbijos, guantes, etc.) para su seguridad y la del preparado.

Procedimiento:

- 1) Se tuvo en cuenta la pérdida de masa por trabajo operativo entre 8-10%.
- 2) Se pesaron las cantidades de materias primas necesarias para la cantidad a preparar, restándole el peso del activo a la cantidad de glicerina a usar.
- 3) Al agua caliente se le agregó en fina lluvia la gelatina tratando de no formar grumos.

- 4) Se calentó la glicerina a 50-60° C y se agregó a lo anterior, mezclándose hasta homogeneizar.
- 5) Se bajó la temperatura a 37-38° C y la masa bacteriana de lactobacilos fue agregada.
- 6) Se procedió al envasado de la mezcla en los portaóvulos de plástico previamente pincelados con vaselina líquida y se enfrió en heladera. Se rotuló adecuadamente.

Control de calidad:

- 1) Se controló la consistencia y resistencia a las roturas.
- 2) Se verificó la uniformidad de contenido, sin englobar burbujas de aire.
- 3) Se determinó la capacidad de fundirse a la temperatura corporal en el menor tiempo posible.

Condiciones de conservación:

A temperatura entre 2 y 8° C en oscuridad.

5.4 Estudio de supervivencia y estabilidad de los lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas

Las preparaciones farmacéuticas en óvulos almacenados a 4° C fueron examinados cada 20 días por un periodo de seis meses, con el fin de establecer su viabilidad y estabilidad. Se tomaron muestras del fondo, medio y superficie de los óvulos de cada formulación para confirmar la uniformidad del inóculo. De cada formulación se separó un óvulo de L23 y uno de L60, con el fin de mantenerlos a temperatura ambiente y evidenciar si se conservaban adecuadamente y si mantenían su actividad antimicrobiana a esa temperatura.

Para el recuento total de lactobacilos se utilizó el método de dilución en placas por duplicado sobre agar MRS (Maggi y col., 2000; Jiménez Pranteda y col., 2012). El método consistió en pesar 0,8 g de óvulo y disolverlos en 7,2 ml de caldo MRS. A continuación se efectuaron diluciones seriadas factor 10 y de las diluciones 1×10^{-3} ,

1×10^{-4} y 1×10^{-5} se sembró 100 μ L en superficie por duplicado con espátula de Drigalsky. Se incubaron las placas en microaerofilia durante 24 h, a 37° C. Finalmente se realizó el recuento de UFC/mL.

5.5 Preparación de suspensiones de L23 y L60 en distintas concentraciones de glicerina

Para comprobar el efecto de la glicerina sobre la viabilidad de los lactobacilos contenidos en las formulaciones farmacéuticas se realizaron suspensiones de cultivos de L23 y L60 con distintas concentraciones de glicerina. Las cepas de lactobacilos se inocularon en caldos estériles de MRS y se los incubó 24 h a 37° C en microaerofilia. Estos cultivos se utilizaron para ajustar la turbidez al tubo 1 de la escala de Mc Farland, y a estas suspensiones se le agregó glicerol estéril en distintas cantidades para obtener diferentes concentraciones finales de glicerina (Tabla 4). Se almacenaron a 4° C y se efectuó el control de viabilidad por la técnica de estrías por agotamiento cada 20 días, durante el tiempo que duró la experiencia. A las colonias desarrolladas se les realizó coloración de Gram.

Tabla 4 Preparación de las suspensiones de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* en glicerina.

Cultivo de L23 o L60 (mL)	Glicerol (mL)	Volumen final (mL)	% final de glicerol
3,0	12,0	15	80
4,5	10,5	15	70
6,0	9,0	15	60
7,5	7,5	15	50
9,0	6,0	15	40
10,5	4,5	15	30
12,6	2,4	15	16

5.6 Detección de la actividad antimicrobiana de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* en las formulaciones farmacéuticas

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los lactobacilos contenidos en las distintas formulaciones se utilizó como control una cepa de *Escherichia coli* aislada de tracto urogenital y sensible a las bacteriocinas de cada cepa. Para su cultivo se utilizó el medio de Agar Tripticosa Soya (ATS) de Britania®. La detección de actividad antimicrobiana de los lactobacilos se realizó por la técnica de estrías cruzadas (a) y por la técnica de difusión en pozos (b).

a) Técnica de estrías cruzadas

Se tomó un taco de 0,5 g de cada óvulo y se dejó disolver en forma de estría central sobre la superficie de una placa de agar MRS. Se incubó a 37° C en

microaerofilia durante 18h. El cultivo de la cepa productora se esterilizó por exposición a vapores de cloroformo durante 20 minutos. Posteriormente se sembró en línea perpendicular la cepa de *Escherichia coli* sensible cultivada previamente en caldo CTS durante 24 h a 37° C en aerobiosis. Se incubó a 37° C por 18 h y se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano (Pascual y col., 2008b; Barberis y col., 2003).

b) Técnica de difusión en pozos

Para realizar esta experiencia se debió obtener el sobrenadante libre de células (SLC) de L23 y L60 contenidas en los óvulos. Luego, se realizó el estudio de actividad antimicrobiana con *E. coli* para comprobar si las cepas mantenían dicha propiedad. (Pascual y col., 2008b). Este procedimiento se realizó con todas las formulaciones cada 20 días durante 6 meses.

b1) Obtención del sobrenadante libre de células

Se tomaron dos tacos de 0,5 g de los óvulos de L23 y L60, los cuales se inocularon en 2 ml de caldo MRS, se incubaron 18 h a 37° C en atmósfera húmeda y en microaerofilia (5% CO₂). Luego se colocó 0,5 ml el cultivo en 9,5 ml de caldo MRS (5% v/v), y se incubó en las mismas condiciones. Para la obtención del sobrenadante libre de células se centrifugaron los cultivos a 7.500 rpm a 4° C, durante 20 min. El SLC obtenido se fraccionó en viales estériles, se expuso a vapores de cloroformo durante 20 min y fue refrigerado a 4° C.

b2) Ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en pozos

Para realizar esta técnica se sembró homogéneamente con hisopo estéril la superficie de una placa de Agar Mueller Hinton con un cultivo de *E. coli* sensible en Caldo Trypticasa Soya (CTS) con una densidad óptica correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. A continuación se realizaron pozos de 7 mm en el agar. Los mismos fueron inoculados con 100 µL de sobrenadante libre de células de cada una de las cepas de lactobacilos presentes en las formulaciones farmacéuticas. A algunos sobrenadantes se les agregó hidróxido de sodio 1N hasta pH 6, para neutralizar los ácidos producidos por L23 y L60 y así evaluar sólo la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. Las placas fueron incubadas durante 18 h a 37° C en aerobiosis y posteriormente se midieron los halos de inhibición del crecimiento de la cepa.

5.7 Ensayo de producción de biofilm

Para evaluar si las cepas de las formulaciones mantenían la capacidad de producción de biofilm en el tiempo, se procedió a examinarlas cada 20 días, por un período de 6 meses. Se empleó el ensayo cuantitativo en tubo modificado utilizando el método de tinción con cristal violeta (Terraf y col., 2012; Ramos y col., 2015).

El método consistió en pesar 0,5 g de cada óvulo y realizar con él un cultivo overnight en caldo MRS (18 h, 37° C, microaerofilia). Los cultivos obtenidos se ajustaron a la turbidez correspondiente al tubo 1 de la escala de Mc Farland. Alícuotas de 200 µL fueron transferidos a tubos de hemólisis estériles y se incubaron a 37° C en microaerofilia durante 6 h y 24 h. Una vez finalizado el período de incubación, se descartó el medio de cultivo y se adicionaron 25 µL de cristal violeta al 1% agitando suavemente, dejándolo actuar 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se quitó el excedente de colorante con tres lavados con 200 µL de buffer fosfato salino (PBS), para remover las células no adheridas al fondo del tubo y quitar el exceso de colorante. Se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado este tiempo, el colorante adherido al biofilm en las paredes del tubo se extrajo con dos lavados de 200 µL de alcohol etílico y se traspasó a otro tubo conteniendo 1,2 mL de alcohol etílico. Se midió DO a 540 nm en espectrofotómetro UV. El proceso se realizó de la misma forma para los cultivos de 6h y 24h, y para los controles se utilizó caldo de cultivo estéril. Las cepas se clasificaron en altamente productoras de biofilm (DO mayor a 0,5), productoras (DO entre 0,5 y 0,1) y escasamente productoras (DO menor de 0,1).

5.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Cuando se hubo verificado que los datos se distribuían normalmente y tenían homogeneidad de varianza, se sometieron los mismos al test de múltiple comparación de Tukey (HSD). El nivel de significancia con el que se trabajó fue de $p \leq 0,05$.

Composición del caldo MRS. Para solidificar se agregó agar al 1,2% (Britania®)

Fórmula (gr/L)

Proteosa peptona N° 3	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Monoleato de sorbitán	1,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
pH final	6,5 ± 0,2

Composición del medio CTS. Para solidificar se agregó agar al 1,2% (Britania®).

Fórmula (gr/L)

Tripteína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Glucosa	2,5
pH final	7,3 ± 0,2

Composición del Agar Mueller Hinton (Britania®).

Fórmula (gr/L)

Infusión de carne	300,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	15,0
pH final	7,3 ± 0,1

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* y obtención de las formulaciones farmacéuticas

En el presente trabajo se utilizaron las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, debido a que en trabajos previamente realizados se comprobaron sus propiedades benéficas y probióticas frente a distintos microorganismos patógenos vaginales (Pascual y col. 2008a,b; Ruiz y col., 2009; Pascual y col. 2010; Asurmendi, 2010; Daniele y col., 2011; Ortiz y col., 2014). Para poder determinar si las cepas contenidas en óvulos mantienen su capacidad antimicrobiana *in vitro*, se procedió a incluirlas como principio activo dentro distintas formulaciones farmacéuticas.

A partir de los cultivos guardados a -20° C, se aislaron colonias circulares pequeñas, claras, convexas y con márgenes definidos en agar MRS (Fig. 3). La observación microscópica de la tinción de Gram reveló la presencia de bacilos Gram positivos de distinta longitud correspondientes a la morfología típica de lactobacilos (Fig. 4 y 5). Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes a lactobacilos para su identificación a nivel de género (Tabla 2). Mediante la utilización de galerías API 50 CH (bioMérieux®) de identificación de lectura automatizada, se identificó a nivel de especie a *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.



Figura 3 Colonias pertenecientes al género *Lactobacillus*, cultivadas en agar MRS.

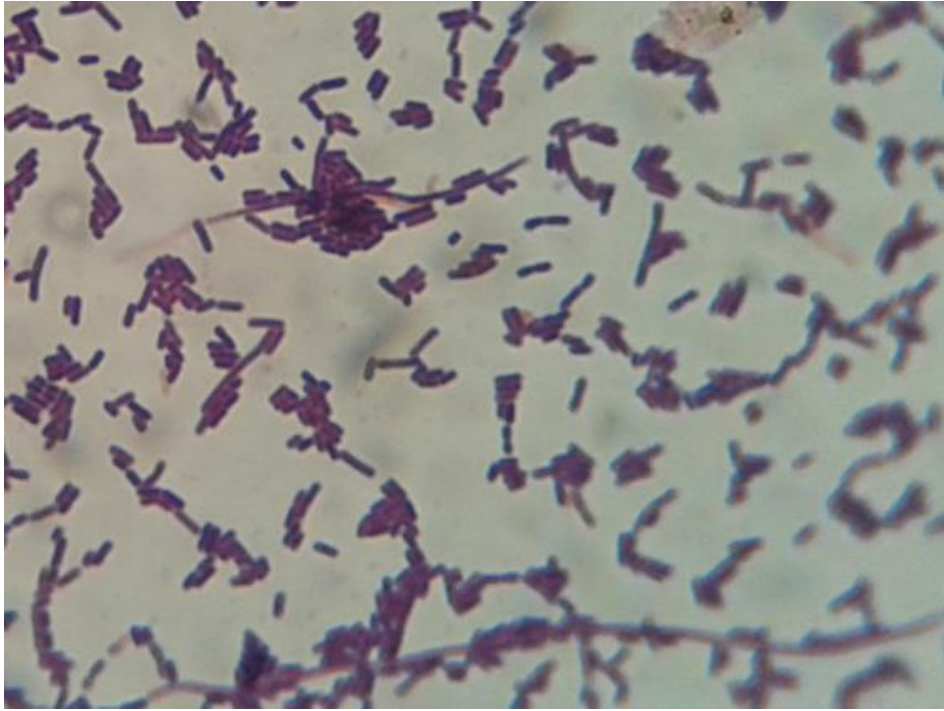


Figura 4 Microfotografía de un cultivo de *Lactobacillus fermentum* L23 (1000x).

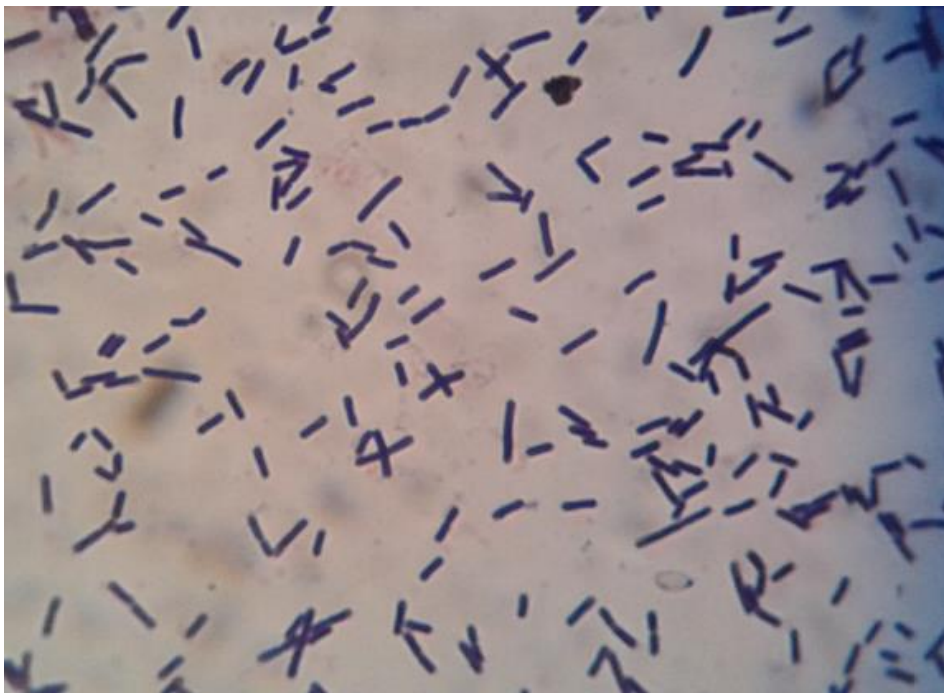


Figura 5 Microfotografía de un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* L60 (1000x).

6.2 Caracterización físico-química de las formulaciones farmacéuticas y control de calidad

Para cada formulación se realizaron 4 óvulos conteniendo *L. fermentum* L23 y 4 óvulos conteniendo *L. rhamnosus* L60. El inóculo bacteriano de las formulaciones se mantuvo constante en las tres fracciones de los óvulos (fondo, medio y superficie). El contenido de los óvulos presentó una consistencia uniforme, con ausencia de burbujas de aire. Todos los óvulos se fundieron bien a 37° C, aunque la F4 (16% glicerina) se disolvió más rápidamente que las demás (aproximadamente en 15 minutos). La F1 fue la que más tardó en fundirse (50% de glicerina), ya que demoró aproximadamente 45 minutos.

En este trabajo se tuvieron las mismas consideraciones que en lo publicado por Maggi y col. (2000): la optimización del proceso de producción es particularmente crítico para preservar la viabilidad bacteriana. En el presente estudio se utilizaron formulaciones de distribución uniforme, mientras que los autores mencionados utilizaron una formulación en doble capa, donde la más externa era de liberación rápida y la más interna de liberación prolongada.

La elección de los excipientes que se utilizarían a la hora de diseñar la composición química del producto se basó en la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados que se obtendrían al procesar los óvulos. Al igual que en este estudio, Vera Pingitore y col. (2014) eligieron gelatina como uno de los excipientes para las formulaciones con las cepas probióticas de *Lactobacillus* que ensayaron.

6.3 Viabilidad y estabilidad de las cepas de lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas

Los óvulos de la F1 conteniendo 50% de glicerol mostraron un recuento a tiempo cero de $9,60 \times 10^6$ UFC/ml para L23 y $2,03 \times 10^7$ UFC/ml para L60. Esta formulación no permitió la recuperación de lactobacilos luego de los 40 días. Para descartar que la ausencia de colonias se debiera a una mala distribución del inóculo bacteriano dentro del óvulo, se procedió a sembrar las tres fracciones del mismo (fondo, medio y superficie) en caldo MRS y agar MRS. No se aislaron colonias de ninguna fracción, por lo que se confirmó la pérdida de viabilidad a ese tiempo con la F1. De la misma forma ocurrió en la F1 mantenida a temperatura ambiente, ya que no se aislaron colonias típicas de lactobacilos y no se observó desarrollo de contaminantes en esta formulación. Por otro lado, la F2 no pudo evaluarse correctamente, debido a que los óvulos se contaminaron. Esta formulación fue descartada porque los resultados de la experiencia de

recuperación de lactobacilos a distintas concentraciones de glicerol demostraron que la concentración presente en la F2 no fue favorable para el crecimiento de lactobacilos. Por lo tanto, se decidió no seguir estudiando la F2 dado que la concentración de glicerina (50%) no permitió mantener la viabilidad de los lactobacilos en el tiempo. Los óvulos ensayados posteriormente correspondieron a las F3 y F4, cuyos resultados de recuento se muestran en las Figuras 6 y 7.

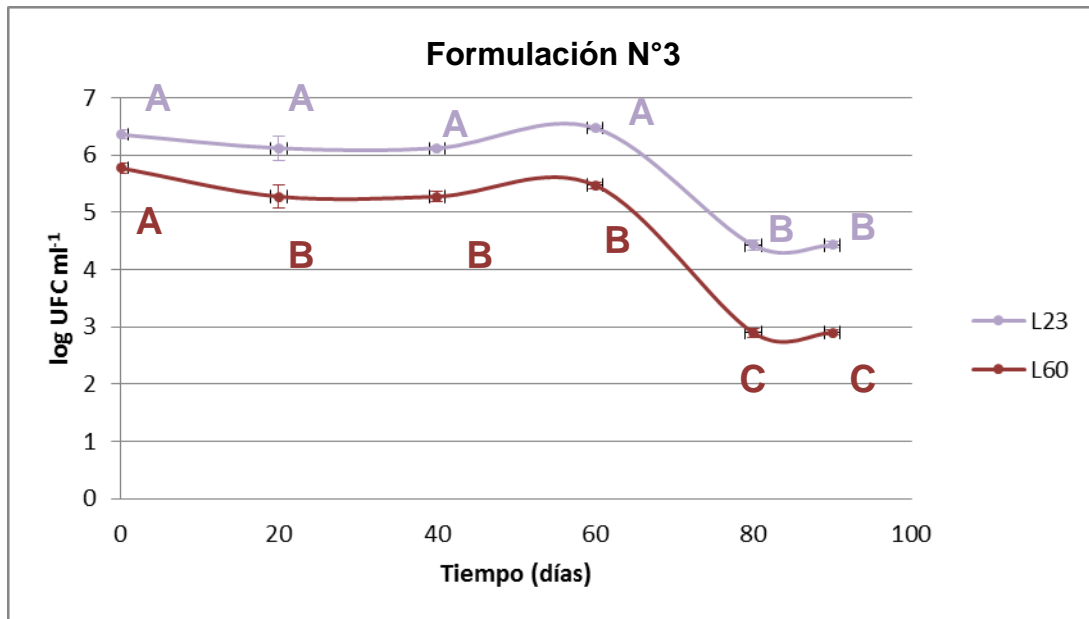


Figura 6 Recuento de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 en la Formulación N°3.

Referencias: medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

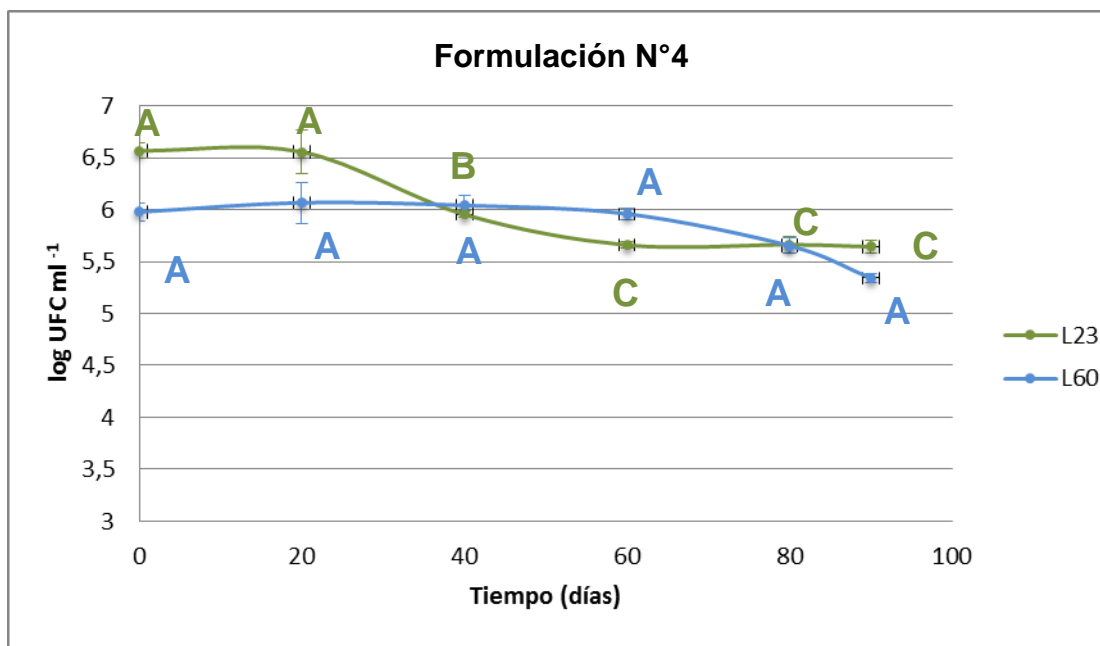


Figura 7 Recuento de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 en la Formulación N°4.

Referencias: medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Como puede observarse, ambas formulaciones permitieron recuperar colonias viables de lactobacilos a los 90 días desde su elaboración, donde el recuento promedio se encontró en el orden de 10^5 UFC/ml en la F4 y de 10^3 - 10^4 UFC/ml en la F3. Aunque los resultados no se muestran en los gráficos, la experiencia se continuó hasta los 180 días (seis meses), tiempo en el cual se siguieron recuperando colonias de lactobacilos. Estos datos comprueban que la viabilidad de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se conserva mucho mejor en las F3 y F4 que en la F1.

El elevado contenido de glicerol de la F1 disminuye la actividad acuosa del óvulo, factor importante para la viabilidad y desarrollo de la mayoría de los microorganismos (Madigan y col., 2004). Las F3 y F4 conteniendo 30% y 16% de glicerina respectivamente no evidencian disminución significativa del recuento de lactobacilos durante los primeros 40 días (Anexo 9.1 y 9.2). Por el contrario, la F1 conteniendo glicerina al 50% provocó la pérdida de viabilidad de los lactobacilos en ese tiempo.

El recuento de lactobacilos en la F3 mostró una disminución muy significativa en el recuento de L23 y L60 luego de los 60 días (Anexo 9.1.1 y 9.1.2). La F4 mientras tanto tuvo un descenso estadísticamente significativo en el número de UFC/ml de L23 luego de los 40 días (Anexo 9.2.1). Por otra parte, a los

90 días de elaboración el recuento de las cepas de lactobacilos en la F4 se mantuvo en el orden de 10^5 UFC/mL, mientras que en la F3 fue de 10^3 - 10^4 UFC/mL. Estos resultados sugieren que la mejor formulación para mantener la viabilidad de los lactobacilos es la F4. El logaritmo del número de UFC/mL de L60 en la F4 se mantuvo constante a través del tiempo sin diferencias estadísticamente significativas, con un valor de significancia de $p \leq 0,05$ (Anexo 9.2.2).

Los resultados de este estudio confirman lo hallado por Uehara y col. (2006), donde evaluaron la viabilidad en el tiempo de una cepa de *Lactobacillus crispatus* contenida en óvulos vaginales. Dichos autores evidenciaron que partiendo de un recuento inicial de 10^8 UFC/ml, el lactobacilo permanecía viable sin disminución significativa de su recuento durante 8 semanas, guardando el óvulo a 4° C. Es importante destacar que en la F4 de este estudio se recuperó a *L. rhamnosus* L60 viable con inóculo inicial de 10^6 UFC/ml sin disminución significativa del recuento hasta los 90 días (12 semanas) (Anexo 9.2.2).

La marca comercial de óvulos Lactinex® (Laboratorios Omega) contiene *L. acidophilus* con un recuento del orden de 10^8 UFC/óvulo, inóculo muy similar al utilizado en las formulaciones de este trabajo (aproximadamente 10^7 UFC/mL). Por otra parte, Lactinex® contiene como excipientes dióxido de silicio y Witepsol S55, compuestos que determinan un mayor costo final al consumidor que los excipientes elegidos en este estudio.

En la presente experiencia se evaluó la viabilidad de cada cepa de lactobacilos en óvulos separados, en contraste con Maggi y col. (2000) que ensayaron comprimidos preparados con una mezcla de tres cepas de *Lactobacillus*. Al igual que en este trabajo, los autores buscaban una fórmula farmacéutica capaz de restaurar la microbiota genitourinaria en mujeres con infecciones del tracto urogenital.

6.4 Estudio de la viabilidad de los lactobacilos L23 y L60 con distintas concentraciones de glicerina

Como fue descripto en materiales y métodos, el glicerol forma parte de la composición de las formulaciones testeadas, por lo que se procedió a evaluar cuál era el porcentaje de glicerina adecuado para ser empleado en las formulaciones y de esta manera garantizar la recuperación de los lactobacilos de los óvulos. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 Crecimiento de las cepas L23 y L60 en suspensiones a distintas concentraciones de glicerol.

Glicerol	0 días		20 días		40 días		60 días	
	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60
80%	C	C	C	C	SC	SC	SC	SC
70%	C	C	C	C	SC	SC	SC	SC
60%	C	C	C	C	SC	C	SC	SC
50%	C	C	C	C	SC	C	SC	SC
40%	C	C	C	C	C	C	SC	SC
30%	C	C	C	C	C	C	C	C
16%	C	C	C	C	C	C	C	C

Referencias: C: se observó desarrollo de colonias con morfología de bacilos Gram positivos en agar MRS; SC: no se observó desarrollo de colonias.

Al analizar los resultados obtenidos, puede afirmarse que luego de los 20 días de elaboración de las suspensiones las concentraciones 30% y 16%, que corresponden a las F3 y F4 respectivamente, fueron las más adecuadas para ser utilizadas en la preparación de los óvulos, ya que permiten la recuperación de los lactobacilos por más tiempo.

Fonseca y col., (2006) utilizaron una cepa de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* para estudiar los efectos de la cinética de congelación y temperaturas de almacenamiento posteriores, utilizando suspensiones de glicerol como crioprotector. Ellos determinaron que la suspensión con glicerol al 10% v/v era la ideal para mantener viables a los lactobacilos en el tiempo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este experimento.

6.5 Detección de la actividad antimicrobiana de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* presentes en los óvulos a través del tiempo mediante las técnicas de estrías cruzadas y de difusión en pozos

Las sustancias antimicrobianas producidas por *L. fermentum* y *L. rhamnosus* presentes en las formulaciones farmacéuticas inhibieron el desarrollo de *E. coli*, es decir, las cepas contenidas en los óvulos mantienen la actividad antimicrobiana *in vitro* a través del tiempo (Fig. 8) (Tabla 6). Este efecto se mantuvo a lo largo del período ensayado para todas las formulaciones, independientemente del recuento obtenido en cada instancia.

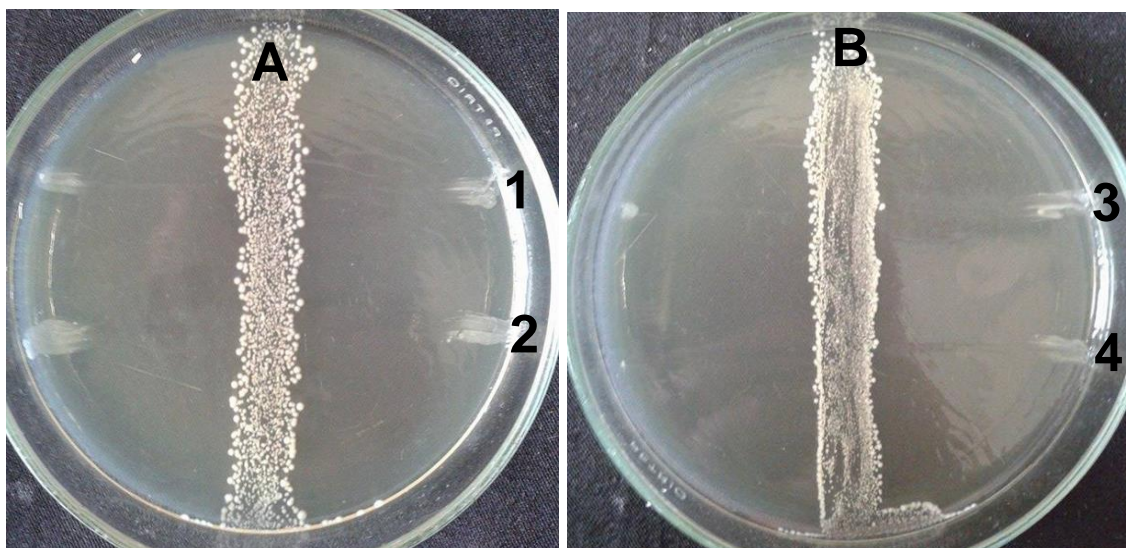


Figura 8 Fotografía de la técnica de estrías cruzadas para la determinación de actividad antimicrobiana.

Referencias: (A): *L. fermentum* L23. (B): *L. rhamnosus* L60. (1),(2),(3) y (4): cepa de *E. coli* sensible.

Tabla 6 Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 presentes en los óvulos frente a una cepa de *E. coli* sensible por el método de estrías cruzadas.

Tiempo	Halos de inhibición del crecimiento (mm)					
	Media \pm SD					
	F1		F3		F4	
	L23	L60	L23	L60	L23	L60
T0	23,5 \pm 0,5	20,0 \pm 0,5	13,5 \pm 0,5	13,5 \pm 2,5	35,0 \pm 0,5	34,0 \pm 1,0
T1	22,2 \pm 1,2	23,5 \pm 0,5	27,0 \pm 0,5	20,0 \pm 0,5	34,0 \pm 1,0	33,5 \pm 1,5
T2	SC	SC	16,0 \pm 1,0	11,5 \pm 0,5	26,0 \pm 1,0	30,0 \pm 1,0
T3	SC	SC	27,5 \pm 1,5	24,0 \pm 1,0	17,0 \pm 0,5	18,0 \pm 3,0
T4	SC	SC	14,5 \pm 1,0	14,5 \pm 0,5	26,0 \pm 0,5	33,5 \pm 1,5
T5	SC	SC	21,5 \pm 1,5	17,5 \pm 0,5	23,0 \pm 0,5	30,0 \pm 0,5

Referencias: SC: sin crecimiento. T0: cero días. T1: 20 días. T2: 40 días. T3: 60 días. T4: 80 días. T5: 90 días.

Aunque los datos no se muestran en la Tabla 6, la experiencia se realizó durante 180 días, tiempo en el cual los lactobacilos seguían manteniendo su actividad antimicrobiana.

El grupo de investigación del laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo ha realizado numerosas investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de L23 y L60 frente a diversos agentes patógenos *in vitro* e *in vivo* (Pascual y col., 2008a,b; Ruiz y col., 2009; Asurmendi, 2010; Pascual y col., 2010; Ruiz y col., 2012; Ruiz y col., 2015),

y a partir de los resultados de este trabajo se comprobó que las cepas de lactobacilos contenidas en los óvulos vaginales siguieron presentando actividad inhibitoria sobre la cepa sensible durante los seis meses que duró este ensayo. En el año 2014, Vicariotto y col. evaluaron la efectividad de dos cepas de lactobacilos: *L. fermentum* LF15 y *L. plantarum* contenidos en óvulos vaginales de liberación lenta sobre el crecimiento *in vivo* de *G. vaginalis*, previos ensayos *in vitro* contra *E. coli*, resultados que concuerdan con lo hallado en este estudio. A su vez, Verdenelli y col. (2014) comprobaron que cinco cepas de *Lactobacillus* contenidas en la marca comercial de óvulos Synbio® presentaban propiedades inhibitorias sobre el crecimiento de cepas de *Candida* utilizando el método de estrías cruzadas, y que a su vez el efecto es dependiente de la cepa ensayada.

La técnica de difusión en pozos reveló que tanto el SLC como el SLCN de los lactobacilos en todas las formulaciones presentaron actividad antimicrobiana *in vitro* contra la cepa de *E. coli* sensible. El halo de inhibición del crecimiento bacteriano disminuye en los SLCN con respecto a los SLC, ya que los neutralizados no tienen actividad antimicrobiana debida a ácidos orgánicos (Fig. 9).

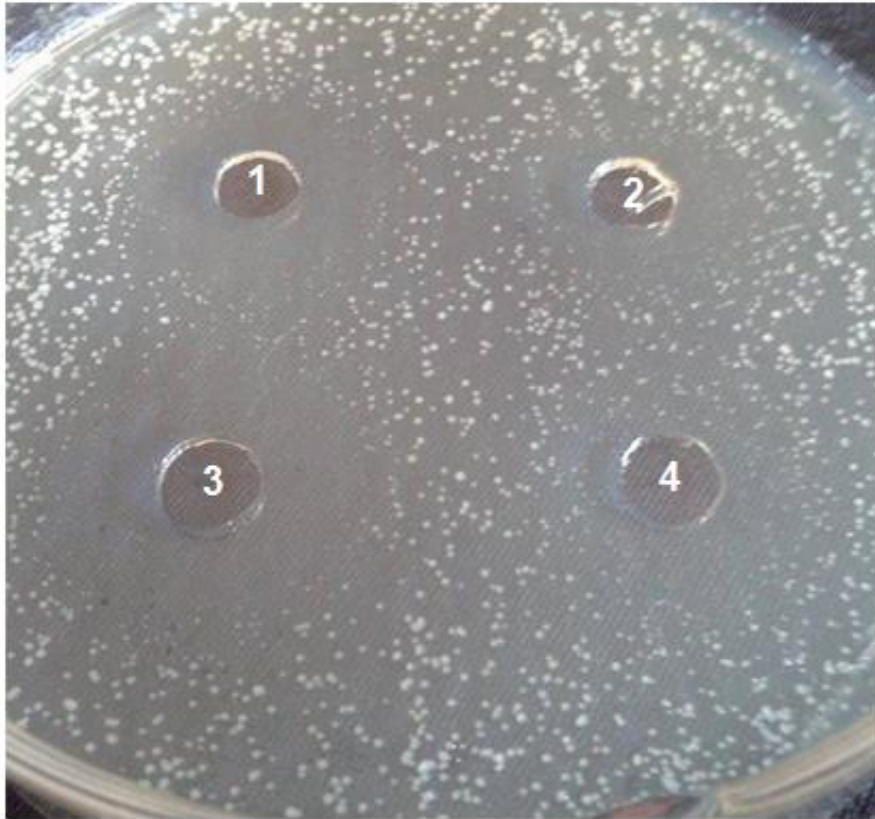


Figura 9 Fotografía de la técnica de difusión en pozos con los sobrenadantes de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.

Referencias: (1): SLC de *L. fermentum*. (2): SLCN de *L. fermentum*. (3): SLC de *L. rhamnosus*. (4): SLCN de *L. rhamnosus*.

El tamaño de los halos de inhibición de los SLC y SLCN correspondientes a *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 contenidos en las formulaciones por el método de difusión en pozos se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7 Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 contenidos en las distintas formulaciones por un periodo de 180 días, por el método de difusión en pozos.

Tiempo	Halos de inhibición del crecimiento (mm)											
	Media \pm SD											
	Formulación N°1				Formulación N°3				Formulación N°4			
	L23		L60		L23		L60		L23		L60	
SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	
T0	22,6 \pm 1,5	16,7 \pm 0,4	21,7 \pm 1,6	16,0 \pm 0,7	22,7 \pm 0,9	14,7 \pm 0,4	19,0 \pm 0,7	13,0 \pm 0,7	18,7 \pm 0,4	13,3 \pm 0,4	18,7 \pm 1,1	13,3 \pm 0,4
T1	23,0 \pm 0,6	16,3 \pm 1,1	22,0 \pm 0,7	14,3 \pm 1,1	28,0 \pm 0,7	18,0 \pm 0,7	28,0 \pm 0,7	17,0 \pm 0,7	24,0 \pm 0,7	18,0 \pm 0,7	24,7 \pm 0,4	17,7 \pm 0,4
T2	SC	SC	SC	SC	19,3 \pm 0,4	14,0 \pm 0,7	19,7 \pm 0,4	14,0 \pm 0,7	28,3 \pm 0,9	14,0 \pm 0,7	28,3 \pm 0,4	19,7 \pm 1,1
T3	SC	SC	SC	SC	23,0 \pm 1,3	15,0 \pm 0,7	20,3 \pm 1,1	15,3 \pm 0,4	21,3 \pm 0,4	16,0 \pm 0,7	20,0 \pm 0,7	14,0 \pm 0,7
T4	SC	SC	SC	SC	22,3 \pm 1,1	18,0 \pm 0,7	22,7 \pm 1,1	18,0 \pm 0,7	28,0 \pm 0,7	14,3 \pm 0,4	24,3 \pm 1,6	13,7 \pm 0,4
T5	SC	SC	SC	SC	23,7 \pm 1,6	17,0 \pm 0,7	26,3 \pm 1,1	16,3 \pm 1,1	21,0 \pm 0,7	13,7 \pm 0,4	21,3 \pm 0,4	14,3 \pm 1,6
T6	SC	SC	SC	SC	24,7 \pm 1,4	15,5 \pm 1,5	24,3 \pm 0,9	15,0 \pm 1,0	20,0 \pm 1,5	14,5 \pm 0,5	21,7 \pm 0,8	12,0 \pm 0,7

Referencias: SLC: sobrenadante libre de células. SLCN: sobrenadante libre de células neutralizado. SC: sin crecimiento. T0: cero días. T1: 20 días. T2: 40 días. T3: 60 días. T4: 80 días. T5: 90 días. T6: 180 días.

Independientemente del recuento de bacterias en cada tiempo ensayado, las cepas presentes en los óvulos mantuvieron la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos, evidenciado por los halos de inhibición total del crecimiento de la cepa control. Saadatzadeh y col. (2013) evaluaron tanto el efecto de los SLC como de los SLC liofilizados de un cultivo de *L. casei*. Al igual que en el presente estudio, los autores afirman que los SLC de *L. casei* poseen una fuerte actividad antimicrobiana contra los agentes patógenos que ensayaron. También comprobaron que el SLC liofilizado presentó, además del efecto antimicrobiano, actividad antioxidante y mayor estabilidad en el tiempo que el SLC sin liofilizar.

El efecto inhibitorio debido a la actividad de la bacteriocina de cada cepa de lactobacilo aislada de los óvulos osciló entre el 60% y más del 80% en las distintas formulaciones (Tabla 8) (Fig. 10 y 11).

Tabla 8 Porcentajes de inhibición del crecimiento de *E. coli* por los SLC y SLCN de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 en las distintas formulaciones, por un período de 180 días.

Tiempo	Porcentaje de inhibición del crecimiento											
	Formulación N°1				Formulación N°3				Formulación N°4			
	L23		L60		L23		L60		L23		L60	
	Ác.	B	Ác.	B+P	Ác.	B	Ác.	B+P	Ác.	B	Ác.	B+P
T0	26	74	26	74	35	65	32	68	29	71	29	71
T1	29	71	35	65	36	64	39	61	25	75	28	72
T2	SC	SC	SC	SC	27	73	29	71	51	49	30	70
T3	SC	SC	SC	SC	35	65	25	75	25	75	30	70
T4	SC	SC	SC	SC	19	81	21	79	49	51	44	56
T5	SC	SC	SC	SC	26	74	38	62	35	65	33	67
T6	SC	SC	SC	SC	37	63	38	62	27	73	45	55
Promedio	29	71	31	69	30	70	32	68	31	69	32	68

Referencias: B+P: bacteriocina y peróxido de hidrógeno. Ác.: ácidos orgánicos. B: bacteriocina. T0: cero días. T1: 20 días. T2: 40 días. T3: 60 días. T4: 80 días. T5: 90 días. T6: 180 días. SC: sin crecimiento.

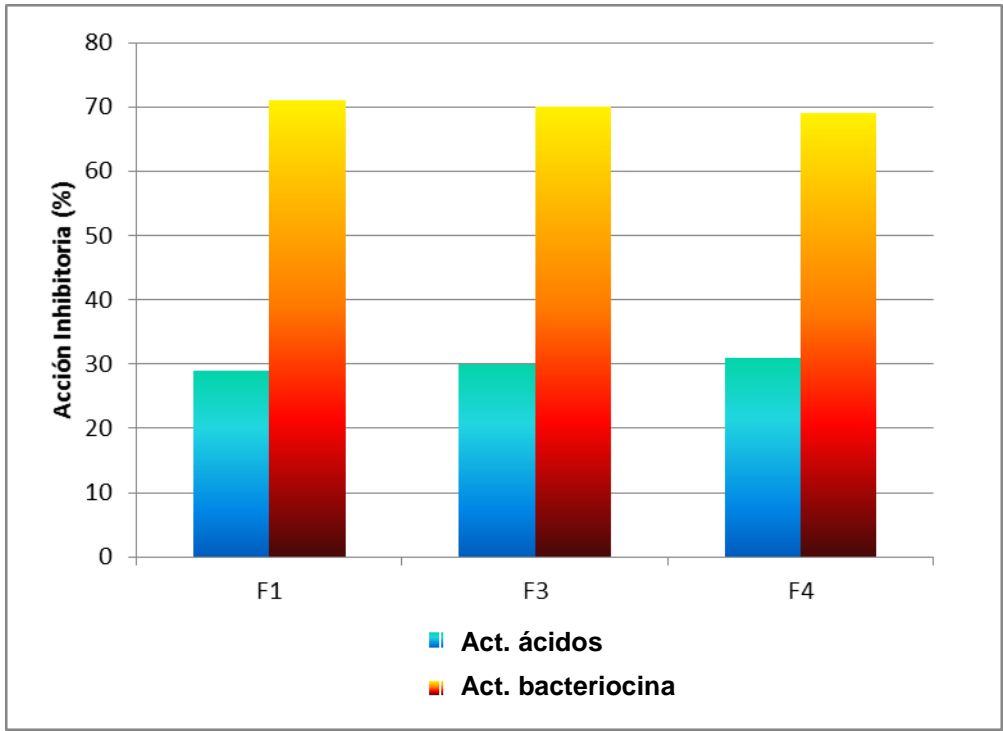


Figura 10 Porcentajes promedio de la actividad inhibitoria de los metabolitos producidos por la cepa *L. fermentum* L23 en las distintas formulaciones.

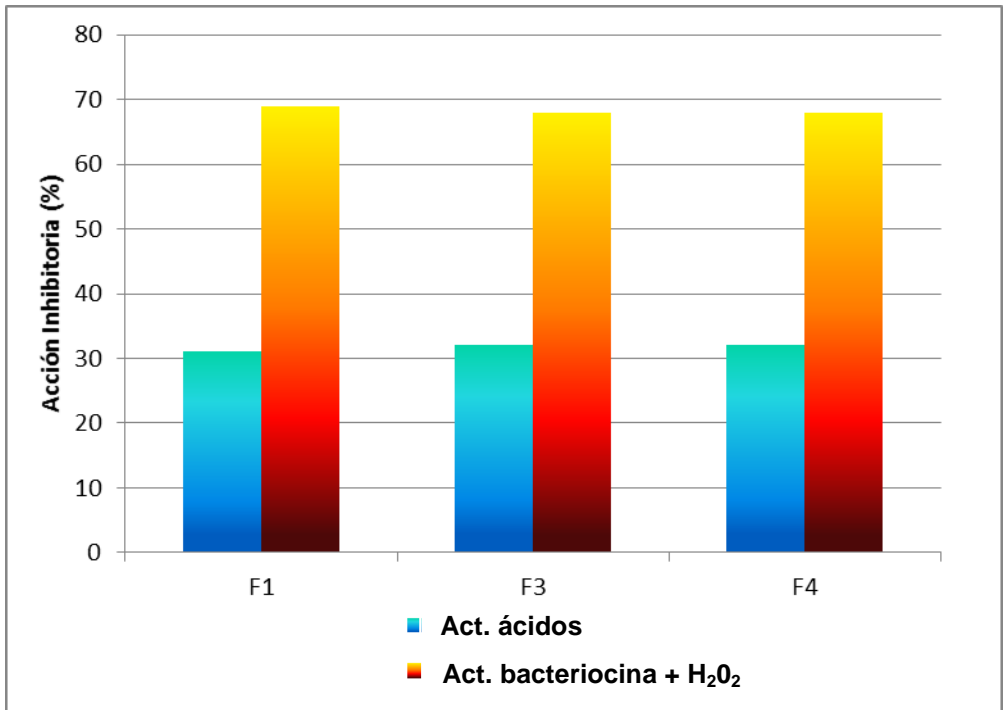


Figura 11 Porcentajes promedio de la actividad inhibitoria de los metabolitos producidos por la cepa *L. rhamnosus* L60 en las distintas formulaciones.

Los resultados obtenidos al procesar las distintas formulaciones confirman lo hallado en las experiencias previas de actividad antimicrobiana de los distintos metabolitos secundarios realizadas por el grupo de investigación. En este estudio se comprobó que ambas cepas de lactobacilos mantienen su actividad antimicrobiana en los óvulos vaginales durante los 6 meses en que se desarrolló este estudio. Esta actividad inhibitoria se debió en su mayoría a la bacteriocina, resultados que se observaron en ambas cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. Los lactobacilos en los óvulos siguen expresando sus características inhibitorias independientemente del tiempo y la composición química del mismo. La bacteriocina producida por las cepas de los óvulos mantiene su actividad antimicrobiana en todas las formulaciones farmacéuticas ensayadas y a través del tiempo (durante 6 meses). Vera Pingitore y col. (2014) comprobaron que si en óvulos vaginales a base de gelatina se combina la bacteriocina de *L. salivarius* (salivaricina CRL 1328) con la cepa productora, ácido ascórbico, lactosa o inulina, se consigue que la bacteriocina mantenga su actividad dentro del óvulo por un período de 360 días.

Kaewnopparat y col. en 2013 midieron la actividad antimicrobiana de una cepa de *L. fermentum* contra *E. coli* por la técnica de difusión en pozos. Los resultados de estos autores se asemejan a los hallados en este estudio pero es importante destacar que la actividad antimicrobiana detectada en este trabajo fue mucho mayor a los valores encontrados por Kaewnopparat y col., quienes expresan un tamaño promedio de halo de inhibición del crecimiento de *E. coli* de 13,5 mm mientras que en el presente trabajo se obtuvieron halos de hasta 28,3 mm.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo publicado durante 2005 por Kale y col., quienes ensayaron bacterias probióticas contenidos en tres formulaciones farmacéuticas, cada una conteniendo un componente de base distinto: manteca de cacao, gelatina glicerizada o polietilenglicol 1000. Ellos demostraron que, al igual que en este estudio, la formulación conteniendo la gelatina glicerizada fue la que arrojó mejores resultados para el tratamiento de infecciones vaginales, ya que los lactobacilos mantienen sus propiedades antimicrobianas dentro de los óvulos de gelatina glicerizada.

6.6 Producción de biofilm

El estudio de la presencia de exopolisacáridos mediante la técnica de cristal violeta reveló la presencia de biofilm en los tubos de hemólisis. A continuación se detallan los resultados obtenidos (Tabla 9).

Tabla 9 Producción de biofilm en las cepas L23 y L60 presentes en los óvulos a través del tiempo.

Tiempo	DO _{540nm}											
	Formulación N°1				Formulación N°3				Formulación N°4			
	L23		L60		L23		L60		L23		L60	
	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
T1	0,047	0,035	0,071	0,058	0,058	0,056	0,065	0,053	0,048	0,036	0,022	0,055
T2	SC	SC	SC	SC	0,048	0,040	0,058	0,082	0,035	0,070	0,043	0,049
T3	SC	SC	SC	SC	0,066	0,047	0,035	0,071	0,039	0,065	0,031	0,058
T4	SC	SC	SC	SC	0,073	0,067	0,040	0,070	0,079	0,109	0,113	0,110
T5	SC	SC	SC	SC	0,044	0,060	0,120	0,123	0,086	0,106	0,088	0,064
T6	SC	SC	SC	SC	0,057	0,054	0,063	0,079	0,049	0,056	0,028	0,047

Referencias: SC: sin crecimiento. T1: 20 días. T2: 40 días. T3: 60 días. T4: 80 días. T5: 90 días. T6: 180 días.

Los controles de producción de biofilm de las cepas guardadas a -20° C arrojaron los resultados de la Tabla 10.

Tabla 10 Ensayo de producción de biofilm por las cepas L23 y L60 control.

	L23 6 h	L23 24 h	L60 6 h	L60 24 h
DO _{54nm}	0,054	0,060	0,051	0,053

Las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 son escasamente productoras de biofilm cuando están contenidas en los óvulos (DO_{540nm} menor a 0,1). Sin embargo, es importante destacar que dicha propiedad se mantuvo durante el período de tiempo ensayado en este estudio.

El presente trabajo evaluó la formación de biofilm por lactobacilos *in vitro*, en contraste con el estudio más reciente llevado a cabo por Ventolini y col. en enero de 2015, donde reportaron *in vivo* la formación de biofilm por distintas especies de *Lactobacillus*.

El pasado año 2014, por otra parte, Leccese Terraf y col. reportaron que una cepa de *L. rhamnosus* presentaba genes para la producción de proteínas de superficie relacionadas al biofilm. Estos resultados no pueden compararse con este estudio

debido a que aquí se estudió la producción de biofilm por *L. rhamnosus* L60 por una técnica fenotípica. Lo que sí se puede comparar es que en ambos estudios la especie *L. rhamnosus* es capaz de producir biofilm.

7. CONCLUSIONES

- ✓ La Formulación N°1, con alto contenido de glicerol, no permitió la recuperación de los lactobacilos después de 40 días.
- ✓ Las Formulaciones N°3 y N°4 permitieron recuperar viables los lactobacilos *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 hasta los 180 días.
- ✓ La composición química de las Formulaciones N°3 y N°4 fue más beneficiosa para la viabilidad de los lactobacilos que la composición de la Formulación N°1.
- ✓ La mejor formulación para el mantenimiento de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 en los 6 meses de estudio fue la Formulación N°4.
- ✓ Se vio más afectada la viabilidad de los lactobacilos por la concentración de glicerina que por la concentración de gelatina.
- ✓ La actividad antimicrobiana de los lactobacilos se mantiene constante en todas las formulaciones farmacéuticas a través del tiempo.
- ✓ La mayor actividad antimicrobiana observada en las cepas aisladas de las distintas formulaciones farmacéuticas se debió a la acción de bacteriocinas.
- ✓ Las cepas probióticas contenidas en los óvulos mantienen su capacidad de producir biofilm a través del tiempo.

*Este estudio permitió comprobar que las cepas probióticas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 contenidas en las formulaciones farmacéuticas son capaces de permanecer viables, mantener su actividad antimicrobiana y su capacidad de producir biofilm a través del tiempo.*

8. BIBLIOGRAFÍA

-Alpay Karaoğlu, S.; Aydin, F.; Kiliç, S.; Kiliç, A.; 2002. *Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli*. Turkish Journal of Medical Sciences. 33:7-12.

-Arakawa, K.; Matsunaga, K.; Takihiro, S.; Moritoki, A.; Ryuto, S.; Kawai, Y.; Masuda, T.; Miyamoto, T.; 2014. *Lactobacillus gasseri requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk*. Journal of Dairy Science. 98(3):1593-1603.

-Asurmendi, P.; 2010. *Acción bioterapéutica de Lactobacillus fermentum y Lactobacillus rhamnosus sobre diferentes cepas de Neisseria gonorrhoeae*. Tesina de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

-Balamurugan, R.; Chandragunasekaran, A. S.; Chellappan, G.; Rajaram, K.; Ramamoorthi, G.; Ramakrishna, B. S.; 2014. *Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India*. The Indian Journal of Medical Research. 140(3):345-55.

-Barberis I. L.; Pájaro, M. C.; Godino S.; Pascual, L.; 2003. *Inhibición in vitro del crecimiento de Gardnerella vaginalis por bacteriocinas producidas por bacterias del género Lactobacillus*. Revista UNRC. 22(1-2):63-70.

-Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994, 9^{na} Edición. Editado por Holt, J. G.; Williams & Wilkins, B. pp 562,566,568.

-Boris, S.; Suárez, J. E.; Barbés, C.; 1997. *Characterization of the aggregation promoting factor from Lactobacillus gasseri, a vaginal isolate*. Journal of Applied Microbiology. 83(4):413-20.

-Boris, S.; Suárez, J. E.; Vázquez, F.; Barbés, C.; 1998. *Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens*. Infection and Immunity. 66(5):1985-9.

-Castro, A.; González, M.; Tarín, J. J.; Cano, A.; 2015. *Role of probiotics in Obstetrics and Gynecology*. Nutrición Hospitalaria. 31 Suppl 1:26-30.

-Castro, J.; Henriques, A.; Machado, A.; Henriques, M.; Jefferson, K. K.; Cerca, N.; 2013. *Reciprocal interference between Lactobacillus spp. and Gardnerella vaginalis*

on initial adherence to epithelial cells. *International Journal of Medical Science*. 10(9):1193-8.

-Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P.; 2005. *Bacteriocins: developing innate immunity for food.* *Nature Reviews. Microbiology*. 3(10):777-88.

-Coudeyras, S.; Jugie, G.; Vermerie, M.; Forestier, C.; 2008. *Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens.* *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2008:549640.

-Daniele, M.; Pascual, L.; Barberis, L.; 2014. *Curative effect of the probiotic strain *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal infection by *Gardnerella vaginalis*.* *Letters in Applied Microbiology*. 59(1):93-8.

-Daniele, M.; Ruiz, F.; Pascual, L.; Barberis, L.; 2011. *Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis sensitivity to bacteriocins produced by two Lactobacilli strains.* *Current Microbiology*. 63(4):360-5.

-Datcu, R.; 2014. *Characterization of the vaginal microflora in health and disease.* *Danish Medical Journal*. 61(4):B4830.

-De Gregorio, P. R.; Juárez Tomás, M. S.; Santos, V.; Nader Macías, M. E.; 2012. *Beneficial lactobacilli: effects on the vaginal tract in a murine experimental model.* *Antonie Van Leeuwenhoek*. 102(4):569-80.

-Dobson, A.; Cotter, P. D.; Ross, R. P.; Hill, C.; 2012. *Bacteriocin production: a probiotic trait?* *Applied and Environmental Microbiology*. 78(1):1-6.

-Donders, G.; Neven, P.; Moegele, M.; Lintermans, A.; Bellen, G.; Prasauskas, V.; Grob, P.; Ortmann, O.; Buchholz, S.; 2014. *Ultra-low-dose estriol and *Lactobacillus acidophilus* vaginal tablets (*Gynoflor*(®)) for vaginal atrophy in postmenopausal breast cancer patients on aromatase inhibitors: pharmacokinetic, safety, and efficacy phase I clinical study.* *Breast Cancer Research and Treatment*. 145(2):371-9.

-Ekmekci, H.; Aslim, B.; Ozturk, S.; 2009. *Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*.* *Microbiology and Immunology*. 53(2):59-65.

-Farmacopea Argentina; 2012. *Formulario Provincial de Productos Sanitarios Oficiales Normalizados.* Guía de Buenas Prácticas de la Actividad Farmacéutica. Resolución 152/2012 – Dirección de Jurisdicción de Farmacias. pp 1-60.

- Fonseca, F.; Marin, M.; Morris, G. J.; 2006.** *Stabilization of frozen Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects.* Applied and Environmental Microbiology. 72(10):6474-82.
- Gerbaldo, G. A.; Barberis, C.; Pascual, L.; Dalcerro, A.; Barberis, I. L.; 2012.** *Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties.* FEMS Microbiology Letters. 332(1):27-33.
- Gong, Z.; Luna, Y.; Yu, P.; Fan, H.; 2014.** *Lactobacilli inactivate Chlamydia trachomatis through lactic acid but not H₂O₂.* PLoS One. 9(9):e107758.
- Hurtado Escamillo, S. T.; Benites Castillo, S.; Rivera Espinola, C. N.; Hurtado Escamillo, F. E.; 2011.** *Effect of vaginal re-colonization by potential probiotic Lactobacillus sp. in women with bacterial vaginosis.* UCV-Scientia. 3(1):35-41.
- Jiménez Pacheco, A.; Jiménez Pacheco, A.; 2013.** *El uso de probióticos como alternativa en la prevención de las infecciones urinarias recurrentes en mujeres.* Revista Médica de Chile. 141(6):809-10.
- Jiménez Pranteda, M. L.; Poncelet, D.; Náder Macías, M. E.; Arcos, A.; Aguilera, M.; Monteoliva Sánchez, M.; Ramos Cormenzana, A.; 2012.** *Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers.* Journal of Bioscience and Bioengineering. 113(2):179-84.
- Juárez Tomás, M. S.; Bru, E.; Wiese, B.; de Ruiz Holgado, A. A.; Nader Macías, M. E.; 2002.** *Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal Lactobacillus salivarius CRL 1328.* Journal of Applied Microbiology. 93(4):714-24.
- Juárez Tomás, M. S.; Wiese, B.; Nader Macías, M. E.; 2005.** *Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal Lactobacillus johnsonii.* Journal of Applied Microbiology. 99(6):1383-91.
- Kaewnopparat, S.; Dangmanee, N.; Kaewnopparat, N.; Srichana, T.; Chulasiri, M.; Settharaksa, S.; 2013.** *In vitro probiotic properties of Lactobacillus fermentum SK5 isolated from vagina of a healthy woman.* Anaerobe. 22:6-13.
- Kale, V. V.; Trivedi, R. V.; Wate, S. P.; Bhusari, K. P.; 2005.** *Development and evaluation of a suppository formulation containing Lactobacillus and its application in vaginal diseases.* Annals of the New York Academy of Sciences. 1056:359-65.

- Klaenhammer, T. R.; 2001.** *Probiotics and prebiotics*. Editado por Beauchat & Montville. Food Microbiology. ASM Press, Washington, D. C. pp. 797-812.
- Larsson P. G.; Bergström, M.; Forsum, U.; Jacobsson, B.; Strand, A.; Wölner Hanssen, P.; 2005.** *Bacterial vaginosis. Transmission, role in genital tract infection and pregnancy outcome: an enigma*. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 113(4):233-45.
- Law, B. A.; Kolstad, J.; 1983.** *Proteolytic systems in lactic acid bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek. 49(3):225-45.
- Leccese Terraf, M. C.; Mendoza, L. M.; Juárez Tomás, M. S.; Silva, C.; Nader Macías, M. E.; 2014.** *Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli*. The Journal of General and Applied Microbiology. 117(6):1761-72.
- Madhivanan, P.; Raphael, E.; Rumphs, A.; Krupp, K.; Ravi, K.; Srinivas, V.; Arun, A.; Reingold, A. L.; Klausner, J. D.; Riley, L. W.; 2014.** *Characterization of culturable vaginal Lactobacillus species among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study*. Journal of Medical Microbiology. 63:931-5.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.; 2004.** *Brock Biología de los Microorganismos*, 10ª edición. Pearson-Prentice Hall. Capítulos 12 y 21. pp 159,160,399,402,721.
- Maggi, L.; Mastromarino, P.; Macchia, S.; Brigidi, P.; Pirovano, F.; Matteuzzi, D.; Conte, U.; 2000.** *Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 50(3):389-95.
- Malik, S.; Petrova, M. I.; Claes, I. J.; Verhoeven, T. L.; Busschaert, P.; Vanechoutte, M.; Lievens, B.; Lambrichts, I.; Siezen, R. J.; Balzarini, J.; Vanderleyden, J.; Lebeer, S.; 2013.** *The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal Lactobacillus plantarum strain CMPG5300 is sortase dependent*. Applied and Environmental Microbiology. 79(15):4576-85.
- Martín, R.; Sánchez, B.; Suárez, J. E.; Urdaci, M. C.; 2012.** *Characterization of the adherence properties of human Lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics*. FEMS Microbiology Letters. 328(2):166-73.

- Martín, R.; Soberón, N.; Vázquez, F.; Suárez, J. E.; 2008.** *La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas.* Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 26(3):160-167.
- Martínez Martínez, W.; 2013.** *Actualización sobre vaginosis bacteriana.* Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. 39(4):427-441.
- Mastromarino, P.; Di Pietro, M.; Schiavoni, G.; Nardis, C.; Gentile, M.; Sessa, R.; 2014.** *Effects of vaginal lactobacilli in Chlamydia trachomatis infection.* International Journal of Medical Microbiology. 304(5-6):654-61.
- Mastromarino, P.; Macchia, S.; Meggiorini, L.; Trinchieri, V.; Mosca, L.; Perluigi, M.; Midulla, C.; 2008.** *Effectiveness of Lactobacillus-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis.* Clinical Microbiology and Infection. 15(1):67-74.
- Mastromarino, P.; Macchia, S.; Meggiorini, L.; Trinchieri, V.; Mosca, L.; Perluigi, M.; Midulla, C.; 2009.** *Effectiveness of Lactobacillus-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis.* Clinical Microbiology Infections. 15(1):67-74.
- Mastromarino, P.; Vitali, B.; Mosca, L.; 2013.** *Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics.* The New Microbiologica. 36(3):229-38.
- Matu, M. N.; Orinda, G. O.; Njagi, E. N.; Cohen, C. R.; Bukusi, E. A.; 2010.** *In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women.* Anaerobe. 16(3):210-5.
- Mejía Rodríguez, J. A.; Chacón Rueda, Z.; Guerrero Cárdenas, B.; Rojas, J. O.; López Corcuera, G.; 2007.** *Obtention of Lactobacillus strains. In-vitro characterization as potentials probiotic.* FCV-LUZ. 17(2):178-185.
- Murina, F.; Graziottin, A.; Vicariotto, F.; De Seta, F.; 2014.** *Can Lactobacillus fermentum LF10 and Lactobacillus acidophilus LA02 in a slow-release vaginal product be useful for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis?: A clinical study.* Journal of Clinical Gastroenterology. 48 Suppl 1:102-5.
- Nader Macías, E. N.; Ocaña, V. S.; Juárez Tomás, M. S. Silva de Ruiz, C.; 2007.** *Bacterias Lácticas Probióticas en el tracto urogenital.* Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de Bacterias Lácticas. Editorial Reverte. pp 17-20.

- Nes, I. F.; Yoon, S. S.; Diep, D. B.; 2007.** *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review.* Food Science and Biotechnology. 16(5):675–690.
- Ocaña, V. S.; Nader Macías, M. E.; 2002.** *Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability.* British journal of biomedical science. 59(4):183-190.
- Ortiz, L.; Ruiz, F.; Pascual, L.; Barberis, L.; 2014.** *Effect of two probiotic strains of Lactobacillus on in vitro adherence of Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, and Staphylococcus aureus to vaginal epithelial cells.* Current Microbiology. 68(6):679-84.
- Parma, M.; Dindelli, M.; Caputo, L.; Redaelli, A.; Quaranta, L.; Candiani, M.; 2013.** *The role of vaginal Lactobacillus rhamnosus (Normogin®) in preventing Bacterial Vaginosis in women with history of recurrences, undergoing surgical menopause: a prospective pilot study.* European Review for Medical and Pharmacological Science. 17(10):1399-403.
- Pascual, L. M.; 2004.** *Bacteriocinogenia en el género Lactobacillus: características benéficas de lactobacilos de vagina humana.* Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- Pascual, L. M.; Daniele, M. B.; Giordano, W.; Pájaro, M. C.; Barberis, I. L.; 2008a.** *Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by Lactobacillus fermentum L23.* Current Microbiology. 56(4):397-402.
- Pascual, L. M.; Daniele, M. B.; Giordano, W.; Pájaro, M. C.; Barberis, I. L.; 2008b.** *Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from the human vagina.* The Journal of General and Applied Microbiology. 54(3):141-8.
- Pascual, L. M.; Daniele, M. B.; Pájaro, C.; Barberis, L.; 2006.** *Lactobacillus species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance.* Contraception. 73(1):78-81.
- Pascual, L. M.; Ruiz, F.; Giordano, W.; Barberis, I. L.; 2010.** *Vaginal colonization and activity of the probiotic bacterium Lactobacillus fermentum L23 in a murine model of vaginal tract infection.* Journal of Medical Microbiology. 59(3):360-4.
- Pendharkar, S.; Magopane, T.; Larsson, P. G.; de Bruyn, G.; Gray, G. E.; Hammarström, L.; Marcotte, H.; 2013.** *Identification and characterisation of vaginal*

lactobacilli from South African women. BMC Infectious Diseases. doi: 10.1186/1471-2334-13-43.

-Pérez Leonard, H.; 2007. *Lactobacillus Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales*. Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. 10(1):6-13.

-Pérez, R. H.; Zendo, T.; Sonomoto, K.; 2014. *Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications*. Microbial Cell Factories. 13 Suppl 1:S3.

-Poornachandra Rao, K.; Chennappa, G.; Suraj, U.; Nagaraja, H.; Charith Raj, A. P.; Sreenivasa, M. Y.; 2015. *Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Sorghum-Based Traditional Fermented Food*. Probiotics and Antimicrobial Proteins. Published online.

-Ramos, A. N.; Sesto Cabral, M. E.; Arena, M. E.; Arrighi, C. F.; Arroyo Aguilar, A. A.; Valdéz, J. C.; 2015. *Compounds from Lactobacillus plantarum culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds*. Pharmaceutical Biology. 53(3):350-8.

-Reid, G.; Bruce, A. W.; Taylor, M.; 1992. *Influence of three-day antimicrobial therapy and lactobacillus vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections*. Clinical Therapeutics. 14(1):11-6.

-Reid, G.; Burton, J.; 2002. *Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria*. Microbes and Infection. 4:319–324.

-Reid, G.; Jass, J.; Sebulsky, M. T.; McCormick, J. K.; 2003. *Potential uses of probiotics in clinical practice*. Clinical Microbiology Reviews. 16(4):658-72.

-Rodrigues, F.; Maia, M. J.; das Neves, J.; Sarmiento, B.; Amaral, M. H.; Oliveira, M. B.; 2014. *Vaginal suppositories containing Lactobacillus acidophilus: development and characterization*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 29:1-8.

-Rodríguez González, M.; 2009. *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. Tesis Doctoral. Departament de Genètica i Microbiologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, España. pp 3-5.

- Ruiz, F. O.; Gerbaldo, G.; Asurmendi, P.; Pascual, L. M.; Giordano, W.; Barberis, I. L.; 2009.** *Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between lactobacillus strains.* Current Microbiology. 59(5):497-501.
- Ruiz, F. O.; Gerbaldo, G.; García, M. J.; Giordano, W.; Pascual, L. M.; Barberis, I. L.; 2012.** *Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by Lactobacilli strains with inhibitory activity for Streptococcus agalactiae.* Current Microbiology. 64(4):349-56.
- Ruiz, F. O.; Pascual, L.; Giordano, W.; Barberis, I. L.; 2015.** *Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against Neisseria gonorrhoeae.* Pathogens and Disease. Published online.
- Saadatzadeh, A.; Fazeli, M. R.; Jamalifar, H.; Dinarvand, R.; 2013.** *Probiotic properties of lyophilized cell free extract of Lactobacillus casei.* Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 8(3):131-7.
- Samaniego Fernández, L. M.; Sosa del Castillo, M.; 2000.** *Lactobacillus spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora.* Reseña. Centro de estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Cuba. Editorial Universitaria. pp 3-4.
- Sharma, D.; Saharan, B. S.; Chauhan, N.; Bansal, A.; Procha, S.; 2014.** *Production and structural characterization of Lactobacillus helveticus derived biosurfactant.* The Scientific World Journal. 2014:493548.
- Shigemura, K.; Fujisawa, M.; 2014.** *History and epidemiology of antibiotic susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae.* Current Drug Targets. 15:1-9.
- Stapleton, A. E.; Au-Yeung, M.; Hooton, T. M.; Fredricks, D. N.; Roberts, P. L.; Czaja, C. A.; Yarova Yarovaya, Y.; Fiedler, T.; Cox, M.; Stamm, W. E.; 2011.** *Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a Lactobacillus crispatus probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection.* Clinical Infectious Diseases. 52(10):1212–1217.
- Stern, N. J.; Svetoch, E. A.; Eruslanov, B. V.; Perelygin, V. V.; Mitsevich, E. V.; Mitsevich, I. P.; Pokhilenko, V. D.; Levchuk, V. P.; Svetoch, O. E.; Seal, B. S.; 2006.** *Isolation of a Lactobacillus salivarius strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to Campylobacter jejuni in the chicken gastrointestinal system.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50(9):3111-6.

- Strus, M.; Brzychczy Włoch, M.; Gosiewski, T.; Kochan, P.; Heczko, P. B.; 2006.** *The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities.* FEMS Immunology and Medical Microbiology. 48(1):56-63.
- Terraf, M. C.; Juárez Tomás, M. S.; Nader Macías, M. E.; Silva, C.; 2012.** *Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components.* Journal of Applied Microbiology. 113(6):1517-29.
- Uehara, S.; Monden, K.; Nomoto, K.; Seno, Y.; Kariyama, R.; Kumon, H.; 2006.** *A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection.* International Journal of Antimicrobial Agents. 28(1):30-34.
- van de Wijkert, J. H.; Borgdorff, H.; Verhelst, R.; Crucitti, T.; Francis, S.; Verstraelen, H.; Jespers, V.; 2014.** *The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?* PLoS One. 9(8):e105998.
- Velraeds, M. M.; van der Mei, H. C.; Reid, G.; Busscher, H. J.; 1996.** *Inhibition of initial adhesion of uropathogenic Enterococcus faecalis by biosurfactants from Lactobacillus isolates.* Applied and Environmental Microbiology. 62(6):1958-63.
- Ventolini, G.; Mitchell, E.; Salazar, M.; 2015.** *Biofilm formation by vaginal Lactobacillus in vivo.* Medical Hypotheses. pii: S0306-9877(15)00003-1.
- Vera Cusme, M. A.; 2013.** *Obtención de cepas de Lactobacillus spp. con potencial probiótico a partir del tracto reproductor femenino bovino.* Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Felix López", Calceta, Ecuador.
- Vera Pingitore, E.; Juárez Tomás, M. S.; Wiese, B.; Nader Macías, M. E.; 2014.** *Design of novel urogenital pharmabiotic formulations containing lactobacilli, salivaricin CRL 1328 and non-microbial compounds with different functionalities.* Drug Development and Industrial Pharmacy. 14:1-11.
- Verdenelli, M. C.; Coman, M. M.; Cecchini, C.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cresci, A.; 2014.** *Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human Lactobacillus strains for vaginal formulations.* Journal of Applied Microbiology. 116(5):1297-307.
- Verdenelli, M. C.; Ghelfi, F.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cecchini, C.; Cresci, A.; 2009.** *Probiotic properties of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei isolated from human faeces.* European Journal of Nutrition. 48(6):355-63.

- Vicariotto, F.; Del Piano, M.; Mogna, L.; Mogna, G.; 2012.** *Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study.* Journal of Clinical Gastroenterology. 46 Suppl:S73-80.
- Vicariotto, F.; Mogna, L.; Del Piano, M.; 2014.** *Effectiveness of the two microorganisms *Lactobacillus fermentum* LF15 and *Lactobacillus plantarum* LP01, formulated in slow-release vaginal tablets, in women affected by bacterial vaginosis: a pilot study.* Journal of Clinical Gastroenterology. 48(1):106-12.
- Vilela, S. F. G.; 2013.** *Influência de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilme formado por *Candida albicans* in vitro e infecção em modelo de invertebrado.* Tesis doctoral. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP.
- Wang, Y.; Ametaj, B. N.; Ambrose, D. J.; Gänzle, M. G.; 2013.** *Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*.* BMC Microbiology. doi: 10.1186/1471-2180-13-19.
- World Health Organization; 2006.** *Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.* FAO Food and Nutrition. 85:1-46. ISBN 92-5-305513-8.
- World Health Organization; 2008.** *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections.* WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. pp 1-28. ISBN 978 92 4 150383 9.
- Younes, J. A.; van der Mei, H. C.; van den Heuvel, E.; Busscher, H. J.; Reid, G.; 2012.** *Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli.* PLoS One. 7(5):e36917.
- Zendo, T.; 2013.** *Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria.* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 77(5):893-9.
- Zhong, L.; Zhang, X.; Covasa, M.; 2014.** *Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer.* World Journal of Gastroenterology. 20(24):7878-86.

9. ANEXO

9.1 Recuento de lactobacilos en la Formulación N°3 a través del tiempo (90 días)

9.1.1 Recuento de *L. fermentum* L23

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45963

Error: 0,0281 gl: 12

Días	Medias	n	E.E.	
80	4,43	3	0,10	B
90	4,43	3	0,10	B
40	6,12	3	0,10	A
0	6,36	3	0,10	A
20	6,42	3	0,10	A
60	6,48	3	0,10	A

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

9.1.2 Recuento de *L. rhamnosus* L60

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,28873

Error: 0,0111 gl: 12

Días	Medias	n	E.E.	
80,00	2,90	3	0,06	C
90,00	2,90	3	0,06	C
20,00	5,25	3	0,06	B
40,00	5,27	3	0,06	B
60,00	5,47	3	0,06	B
0,00	5,77	3	0,06	A

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

9.2 Recuento de lactobacilos en la Formulación N°4 a través del tiempo (90 días)

9.2.1 Recuento de *L. fermentum* L23

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20947

Error: 0,0058 gl: 12

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	5,64	2	0,04	C
80,00	5,66	2	0,04	C
60,00	5,69	2	0,04	C
40,00	5,95	2	0,04	B
20,00	6,55	2	0,04	A
0,00	6,56	2	0,04	A

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

9.2.2 Recuento de *L. rhamnosus* L60

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,02588

Error: 1,2173 gl: 12

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	5,32	2	0,64	A
80,00	5,63	2	0,64	A
60,00	5,96	2	0,64	A
0,00	5,97	2	0,64	A
40,00	6,03	2	0,64	A
20,00	6,06	2	0,64	A

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