

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**DESARROLLO DE UN LUBRICANTE ÍNTIMO FEMENINO CON
BIOACTIVOS PARA LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES
UROGENITALES**

**Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en
Biotecnología**

Serrana Pérez Paradiso 187490

Camila Tub Caplan 178006

Tutor: Inés Tiscornia

Co-tutor: Rodrigo Achigar

2018

Declaración de autoría

Nosotras, Serrana Pérez Paradiso y Camila Tub Caplan, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera para obtención del título de Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Serrana Pérez Paradiso



Camila Tub Caplan

1° de agosto 2018

Dedicatoria

A nuestras familias y amigos.

Agradecimientos

En primer lugar, queremos agradecer a nuestra tutora Inés Tiscornia, por su tiempo, dedicación, paciencia y enseñanzas que nos aportó constantemente a lo largo del proyecto.

A Rossana Fernández, Coordinadora del Centro de Emprendimientos de la ORT (CIE), por sus consejos y excelente disposición en todo momento.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay por acompañarnos siempre, atender nuestras consultas y por su colaboración.

Por último pero no menos importante, a nuestras familias y amigos, por el apoyo incondicional no solo durante la elaboración de este trabajo final sino que también por su presencia y confianza durante toda la carrera.

¡Muchas gracias a todos!

Resumen

Las infecciones urogenitales representan el segundo proceso infeccioso de mayor incidencia, por detrás de las del aparato respiratorio. Constituyen la causa más frecuente de consulta ginecológica; las mismas afectan a un estimado de 1 billón de individuos por año a nivel mundial. Según encuestas realizadas a mujeres uruguayas (n=304), un 71,4% presentaron infecciones durante su vida. Además de su frecuencia, las infecciones urogenitales afectan enormemente la calidad de vida de la mujer. A partir de la encuesta mencionada, se conoce que un 64% de mujeres se mostró altamente afectada y manifestó una gran molestia tras la aparición.

Actualmente, es posible detectar una ineficiencia en su tratamiento, por lo que es imperativo buscar una alternativa profiláctica eficiente, dando origen a BIOLube, un gel lubricante íntimo con bioactivos que contribuyen positivamente a la salud íntima femenina. Por su formato, ingresa directamente a la zona de interés, además de que potencia la calidad de las relaciones íntimas.

Se seleccionaron las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus reuteri* B54, utilizadas previamente por el grupo de Gregor Reid, así como ácido láctico como posibles agentes bioactivos para la formulación del producto. Se realizaron ensayos de co-cultivo de las cepas probióticas con la línea celular HeLa, derivada de epitelio uterino. Además, se analizó el efecto del ácido láctico sobre el crecimiento de dos patógenos comunes de las infecciones urogenitales: *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Se desarrollaron dos formulaciones de BIOLube y se evaluaron estrategias de incorporación de las cepas probióticas, encapsulación y liofilizado.

La concentración de ácido láctico de 600 mM fue efectiva contra los patógenos más comunes, *E.coli* y *C.albicans*, inhibiendo su crecimiento en un 95% y 90% respectivamente. Esta concentración disminuyó la viabilidad de las HeLa a 45%. En cuanto a su formulación, BIOLube resultó eficaz según ensayos requeridos por la farmacopea USP, y se logró una formulación química adecuada y estable en términos organolépticos.

BIOLube se venderá tanto en pomos de 60 mL como sachet de 10 mL, con un precio de venta inicial de \$470 y \$62 pesos uruguayos respectivamente. Se proyecta producir 1379 unidades a cabo del primer año. El negocio supone una inversión inicial de \$618.932 que cubrirá la campaña inicial de marketing, diseño gráfico (prototipo y logo) y aspectos legales (patente y marca). En referencia a los costos, se estima \$895.800 iniciales destinados al alquiler del laboratorio, almacenamiento, rrhh, marketing y distribución.

Palabras clave

BAL, Probióticos, *L. rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* B-54, Ácido láctico, Lubricante íntimo, Infección urogenital, Cultivo celular, HeLa.

Abreviaturas

Abs: Absorbancia

ATCC: del inglés, *American Type Culture Collection*

BAL: Bacterias del Ácido Láctico

BCCM: del inglés, *Belgian Coordinated Collections of Microorganisms*

CF: Citometría de Flujo

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Food and Drug Administration

Fig.: Figura

GRAS: Generally Regarded As Safe

INE: Instituto Nacional de Estadística

IP: Ioduro de Propidio

ITU: infección urinaria

ITU-R: infección urinaria recurrente

hs: Horas LB: Luria-Bertani

L reu B-54: *Lactobacillus reuteri* B-54 L rh

GR-1: *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 min:

Minutos

MOI: Multiplicidad de infección

MRS: Man Rogose Sharpe

OIE: Organización Mundial para la Salud Animal

OMS: Organización Mundial de la Salud

O.N.: toda la noche

PBS: buffer de fosfatos salino

PDA: Potato Dextrose Agar

RAM: Resistencia a los antimicrobianos

SFB: Suero Fetal Bovino

Tamb: Temperatura ambiente

TSA: Trypticase Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

YPD: Yeast Extract Peptone Dextrose

UFC: unidad formadora de colonias

ÍNDICE

DESARROLLO DE UN LUBRICANTE ÍNTIMO FEMENINO CON	1
Declaración de autoría	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Palabras clave.....	6
Abreviaturas	7
1.Introducción	9
1.1 Infecciones urogenitales y microbiota vaginal	9
1.2 Profilaxis y tratamientos disponibles	11
1.3 Agentes bioactivos	12
1.4 Lubricantes íntimos	14
2. Objetivos:.....	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Metodología	17
3.1 Materiales.....	17
3.2 Métodos	21
4. Resultados y Discusión.....	33
4.1 Análisis de distintos parámetros del cocultivo de las cepas <i>L. rhamnosus</i> GR-1 y <i>L. reuteri</i> B-54 con células HeLa	33
4.2 Interacción de cepas probióticas con células HeLa	39
4.3 Efecto del ácido láctico como agente bioactivo.....	41
4.4 Formulación del producto.....	43
4.5 Estabilidad del producto final	47
4.6 Ensayo de eficacia	47
5. Modelo de negocios.....	50
5.1 Sector del producto	50
5.2 Dimensión del problema a nivel nacional	50
5.3 Profilaxis	51
5.4 Alternativa profiláctica propuesta.....	51
5.5 Objetivos del proyecto de modelo de negocios	52
5.6 Metodología de comercialización y validación.....	52
5.7 Comportamiento y acercamiento a las clientas	52
5.8 Análisis económico.....	53
6. Conclusiones	56
7. Acciones futuras:	58
8. Referencias Bibliográficas	60
9. ANEXO	65
Prototipo del lubricante.....	68

1.Introducción

1.1 Infecciones urogenitales y microbiota vaginal

Las infecciones urogenitales representan a nivel mundial el segundo proceso infeccioso de mayor incidencia, por detrás de las infecciones del aparato respiratorio. Constituyen la causa más frecuente de la consulta ginecológica; las mismas afectan a un estimado de 1 billón de individuos por año a nivel mundial. Es así que entre el 50-80% de las mujeres presentan por lo menos un episodio a lo largo de la vida y entre 20-30% presentan recurrencia. Además de su frecuencia, la profunda alteración en la calidad de vida de la mujer hace que este tema sea de gran importancia. En Estados Unidos, el costo anual que suponen a los servicios de salud alcanza los 2 billones de dólares, siendo de 6 billones a nivel mundial (1,2).

Se define como microbiota vaginal normal a aquellos microorganismos que habitualmente se encuentran en la vagina de mujeres sanas. Las bacterias del ácido láctico (BAL) son algunas de las principales bacterias responsables, en especial bacterias del género *Lactobacillus*. También las BAL incluye a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*. (3).

El aparato genital femenino atraviesa diversas etapas, controladas por la actividad endócrina, que van a condicionar su estructura y las condiciones en la cavidad vaginal. Esto provoca que la microbiota predominante, varíe en función de los cambios fisiológicos de cada periodo de la vida de la mujer (4).

El pH vaginal fluctúa entre 3,8 y 4,5, esta acidez natural es importante, ya que los microorganismos patógenos no proliferan con facilidad en un entorno ácido; razón por la cual un pH bajo es esencial para mantener el equilibrio entre bacterias benéficas y patógenas (5). A pesar de ello, en ocasiones el equilibrio se ve desplazado por microorganismos indeseables, lo que se asocia con la aparición de distintas infecciones tales como infecciones del tracto urinario, causadas sobre todo por enterobacterias de origen intestinal (*Escherichia coli* es responsable de al menos el 80% de los casos), vaginosis bacteriana (cuyo agente etiológico más habitual es la *Gardnerella vaginalis*), y vulvovaginitis (producida por *Candida albicans* en el 85% de los casos (2,6).

Existen factores adicionales que aumentan la probabilidad de contraer infecciones. Entre ellos se encuentran; tabaquismo, dieta, duchas vaginales y comportamiento sexual. El coito es una situación que implica cierta agresividad para la microbiota vaginal. No es casual que gran parte de las mujeres se quejen de molestias vaginales, expresadas como sensación de picor, sequedad o de incomodidad, horas o días después de mantener relaciones sexuales. Además, si se usan preservativos, las sustancias que recubren el látex pueden modificar transitoriamente el entorno en el que se desarrollan las BAL (7).

1.1.1 Infecciones del tracto urinario (ITU):

La infección del tracto urinario bajo, que incluye a la cistitis y uretritis, es la colonización bacteriana a nivel de uretra y vejiga que normalmente se asocia a la presencia de síntomas y signos urinarios, como urgencia, disuria, polaquiuria, turbidez y olor fétido de la orina (8).La infección urinaria es un problema serio, tanto desde el punto de vista social como médico. A las molestias propias del cuadro hay que añadir el ausentismo laboral, el gasto farmacéutico y la inducción de resistencia antimicrobiana (8).

En más del 95% de los casos un único microorganismo es el responsable de la ITU, siendo el agente etiológico más frecuente la bacteria *Escherichia coli*, responsable del 75% a 80% de casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomona aeruginosa*(8,9).

Debido a la separación entre la uretra y la vagina, la orina no lava esta última cavidad. Esto la hace susceptible a la infección, fundamentalmente desde el tracto entérico, debido a la proximidad de la vulva y el ano. La vagina es, además, una estación intermedia que facilita el acceso de la microbiota intestinal a la uretra, hasta el punto de que, casi invariablemente, la infección de la vejiga urinaria viene precedida por la presencia del agente causal en la vagina. La corta longitud de la uretra facilita también la llegada de microorganismos indeseables a la vejiga y la producción de cistitis y otras afecciones renales (10).

Se define que un paciente tiene infección urinaria recurrente (ITU-R) cuando presenta tres o más ITUs sintomáticas en el plazo de 12 meses o cuando presenta dos o más ITUs sintomáticas en seis meses. La recurrencia puede deberse a una re-infección o a una recaída. En la gran mayoría de los casos la ITU-R se debe a una reinfección (95%), la cual es producida por una bacteria proveniente desde fuera del tracto urinario, cuyo reservorio es la microbiota intestinal (10).

Los microorganismos que producen ITU-R se seleccionan de la microbiota intestinal por factores de virulencia que le permiten adherirse y colonizar la uretra y migrar al tracto urinario. Se produce, entonces, una interacción entre las cepas infectantes y la célula epitelial de la mujer, gracias a factores de adherencia bacteriana denominados pili o fimbria. La ITU-R en la mujer es un fenómeno muy frecuente que aumenta con la edad, con el mayor número de ITUs previas y cuando transcurre menos tiempo entre una y otra ITU. Una mujer tiene 50 a 70% riesgo de presentar una ITU durante la vida y 20 a 30% de riesgo de que se repita. En mujeres entre 65 y 70 años se ha detectado bacteriuria en 15 a 20% de los casos, lo que sube a 20 a 50% en las personas con más de 80 años (11,12).

1.1.2 Vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana es un proceso patológico que afecta la vagina y se considera un síndrome por alteraciones de la biota bacteriana que se traduce en cambios fisicoquímicos de las secreciones vaginales. Se caracteriza por presentar una secreción vaginal anormal con disturbios en el ecosistema donde la concentración de lactobacilos disminuye, a la vez que aumenta la de otras bacterias anaeróbicas como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella sp.* y *Mobiluncus sp* (12).

El diagnóstico clínico requiere que aparezcan alguno de los signos siguientes: exudado blanquecino y homogéneo, pH superior a 4,5 en dicho fluido y/o olor desagradable. Muchas veces no hay ninguna otra sintomatología asociada, pero otras veces puede aparecer picazón y molestias. Un problema adicional de la vaginosis es su relación con los partos prematuros, debido a que los microorganismos que la producen pueden ascender hasta el útero, atravesar las membranas que envuelven al feto e inducir el parto antes de tiempo (12,13).

Esta patología es universal, aunque antes se ignoraba por la comunidad médica o consideraba como una molestia menor para las mujeres, y afecta tanto a las mujeres de países industrializados como a la población femenina de países en vías de desarrollo.(13)

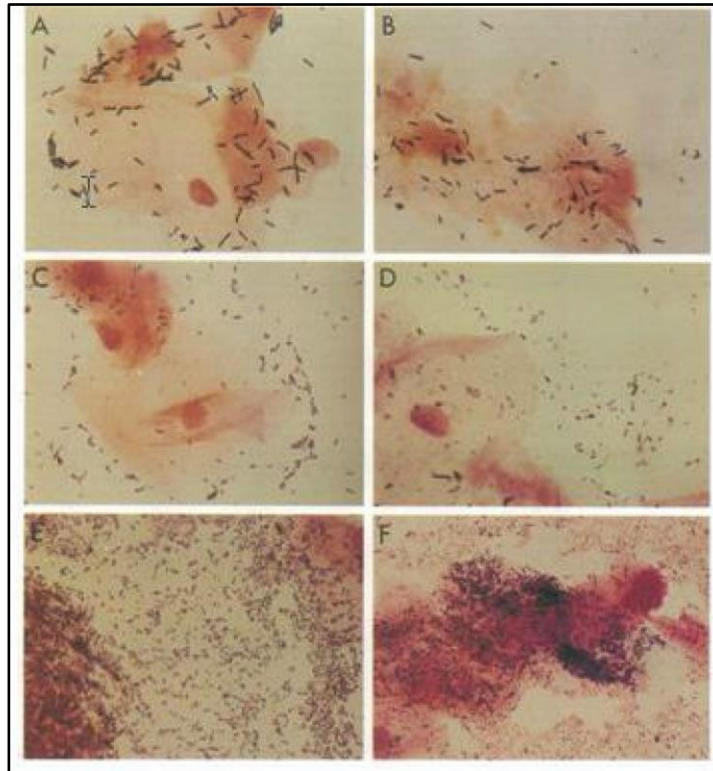


Figura 1: Coloración de Gram de exudado vaginal: A y B) flora vaginal normal. C y D) flora vaginal intermedia (disminución del número de lactobacilos con una mezcla de morfotipos). E y F) vaginosis bacteriana (14).

1.1.3 Vulvovaginitis

De los procesos infecciosos que ocurren en el tracto genital femenino, la vulvovaginitis aparece asiduamente. Se caracteriza por provocar dolor, prurito y ardor; una tríada de síntomas por los cuales las mujeres frecuentemente buscan ayuda médica. Estas manifestaciones a menudo se acompañan de flujo y disuria. Los agentes involucrados en esta entidad son *Candida* spp y *Trichomonas vaginalis*, los cuales se encuentran de forma habitual en la microbiota normal (15).

La candidiasis vulvovaginal es una infección cosmopolita, considerada como uno de los desórdenes más frecuentes en Obstetricia y Ginecología, que afecta principalmente a las mujeres sexualmente activas. *Candida albicans* se ha señalado como la especie involucrada en más del 90% de los casos. Se presenta inflamación, leucorrea espesa y grumosa, prurito intenso, sobre todo premenstrual, extensión de las lesiones a vulva y periné. La mucosa vaginal muestra placas blanquecinas, amarillentas o pseudomembranosas (15).

El mayor problema asociado es que los microorganismos responsables pueden ascender por el aparato genital y producir problemas serios como la enfermedad inflamatoria pélvica, que ya es un cuadro grave que puede generar infertilidad (16).

1.2 Profilaxis y tratamientos disponibles

Se conoce como profilaxis a aquello que se lleva a cabo o se utiliza para prevenir la aparición de una enfermedad o el surgimiento de una infección. Para prevenir infecciones urogenitales es importante la concientización para educar a las mujeres y lograr que incorporen hábitos de higiene íntima saludables, como son la micción luego de tener relaciones íntimas, mantener higiene íntima, utilizar jabones con pH adecuado, evitar duchas vaginales, y consumir prebióticos y/o probióticos oral o intravaginalmente; todos factores que contribuyen a que se reestablezca la microbiota vaginal normal con predominancia de lactobacilos.

Si bien los tratamientos con antibióticos a corto plazo son efectivos (Clindamicina, Metronidazol, Nitrofurantoina, Tindiazol), la creciente resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema candente, que de no combatirse a tiempo puede comprometer la salud de las generaciones futuras. Los microorganismos resistentes han aumentado dramática y exponencialmente en las últimas décadas como consecuencia del uso y abuso de antibióticos. La resistencia antimicrobiana ya no es solamente un dilema médico, sino una amenaza global que requiere, para su control, una acción coordinada de muchos y diferentes actores e instituciones. Además, sucede que al utilizar antibióticos de amplio espectro, se debilita la microbiota vaginal, favoreciendo la reincidencia de nuevas infecciones y convirtiendo a las infecciones urogenitales en la razón principal de consulta ginecológica (17,18).

Por lo mencionado, se considera de carácter fundamental apostar por la profilaxis para combatir las infecciones urogenitales.

1.3 Agentes bioactivos

1.3.1 Probióticos

El término probiótico se define como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud”(19). Fundamentalmente hay dos grupos microbianos de probióticos: los lactobacilos y las bifidobacterias, que forman parte de la microbiota autóctona y se las considera bacterias GRAS (*Generally Regarded As Safe*) según la nomenclatura de la FDA (*Food and Drug Administration*) norteamericana (20).

Como se mencionó anteriormente, los lactobacilos constituyen la microbiota endógena siendo los más frecuentes y predominantes en la vagina (constituyen del 50 al 90%) (6).

Los lactobacilos varían desde formas muy alargadas a bastante cortas y desde rectas a curvadas e incluso espiraladas. Se les incluye habitualmente en el grupo amplio y heterogéneo de las bacterias del ácido láctico (BAL). Se caracterizan por ser gram positivas y por poseer un catabolismo de azúcares estrictamente fermentativo, cuyo producto final principal es el ácido láctico (21). En general, son bacterias anaerobias aerotolerantes que presentan genomas pequeños, por lo que son muy exigentes nutricionalmente. Su inocuidad como agentes infecciosos se debe en parte a la escasez de información genética; por ejemplo, hasta el momento, no se han descrito genes codificantes para factores de virulencia en ninguna cepa BAL.(6) Las especies más habituales en la mucosa vaginal son *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* y *L. iners*.(22).

El **mutualismo *Lactobacillus*- mucosa vaginal** se expresa por tres mecanismos principales (Figura 2):

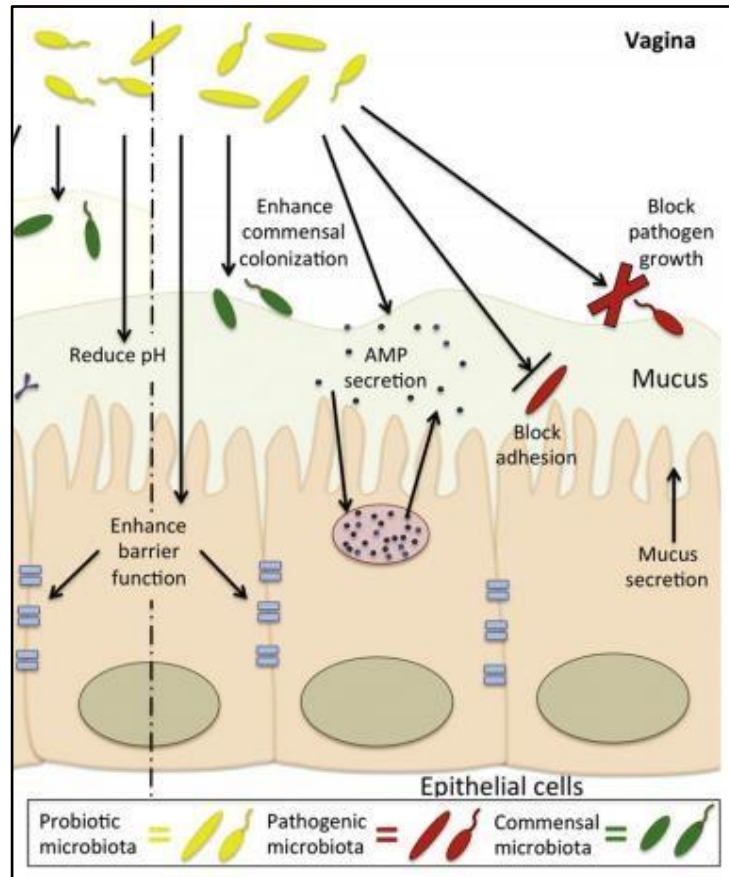


Figura 2: Mecanismos de acción de *Lactobacillus* en el epitelio vaginal. Tomado de Chase D *et al.* (23)

- 1) **Competencia:** la colonización depende del reconocimiento específico entre moléculas superficiales del microorganismo (adhesinas) y del hospedador (receptores) y de la adaptación a las condiciones del ambiente, incluyendo la utilización eficaz de los nutrientes disponibles. Los lactobacilos bloquean a las adhesinas del patógeno y así inhiben su unión a la mucosa vaginal. La microbiota endógena presenta un altísimo grado de adaptación lo que explica que la colonización por patógenos sólo ocurra cuando se ha diezmado la microbiota autóctona (por ejemplo, tras un tratamiento con antibióticos).(22)
- 2) **Producción de sustancias antimicrobianas:** son fundamentalmente tres: ácidos orgánicos de cadena corta (AGCC), (ej: ácido láctico), peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.(22)
- 3) **Inmunomodulación:** Son moduladores de la respuesta innata del sistema inmunológico, que consta de dos fases: en la primera se lleva a cabo el reconocimiento de moléculas comunes a los microorganismos, denominados patrones moleculares asociados a los microorganismos (PMAM); en la segunda fase, se lleva a cabo la respuesta efectora que es inmediata al reconocimiento de los PMAM. En ésta intervienen factores humorales con poca especificidad y una respuesta celular sin memoria inmunológica. La microbiota lactobacilar presente en la cavidad vaginal participa en la estimulación del sistema inmunológico ya que es capaz de inducir la producción de citoquinas, moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias para el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa vaginal, que regulan las vías de señalización desencadenadas por la unión de los PMAM (LPS, flagelo, etc.) a los receptores tipo Toll (24).

La mayor parte de los trabajos realizados en los últimos años para seleccionar cepas con propiedades probióticas han partido de muestras de mucosa vaginal, en general procedentes de mujeres sanas. Lógicamente, este origen aumenta las posibilidades de que las células se

adhieran bien a la mucosa, lo que facilita su implantación, y de que sean capaces de coagregar eficientemente con los patógenos más habituales, para maximizar el efecto del ácido láctico, el agua oxigenada y otros agentes antimicrobianos sobre ellos. Igualmente, ninguna de estas propiedades manifestadas in vitro garantiza una buena implantación y antagonismo frente a los microorganismos indeseados. Por ello, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos bien diseñados, incluyendo la metodología a doble ciego, para evaluar adecuadamente el potencial de las cepas candidatas a convertirse en probióticos urogenitales (6).

Existen estudios clínicos en los que se administraron en forma conjunta *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54 y/o *L. reuteri* RC-14 y se concluyó que su administración reduce el riesgo de infecciones y mejora el mantenimiento de la microbiota normal (25). La primera de estas cepas inhibe el desarrollo de algunas bacterias gram negativas y presenta resistencia a algunos espermicidas, mientras que las dos restantes son productoras de peróxido de hidrógeno (26). Es conocido que *L. rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* B-54 y RC-14 inhiben la adhesión de uropatógenos, entre ellos *Escherichia coli*. Hallazgos al respecto muestran que los *Lactobacillus* puede inducir estrés sobre la membrana externa de *Escherichia coli* afectando adversamente a la estructura de las fimbrias y sobregulando dos proteínas de la membrana externa, OmpA y OmpX, que juegan un papel en la respuesta al estrés (1).

Otro estudio sugirió que, mediante la administración vía vaginal una o dos veces por semana de cápsulas de gelatina que contenían alrededor de 10^9 bacterias viables liofilizadas de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B54, se consiguió descender la frecuencia de recurrencias de ITU desde 6 a 1,6 episodios al año, un valor semejante al observado cuando se llevaba a cabo un tratamiento profiláctico continuado con nitrofurantoína u otros antibióticos. Complementariamente, otro estudio semejante con 64 mujeres asintomáticas reveló que las que habían ingerido las cepas probióticas mencionadas presentaban un incremento significativo del grado de colonización por lactobacilos. Dicho incremento se acompañaba de la reducción de la colonización por *Cándida albicans* y uropatógenos (26,27).

De forma adicional, en otro trabajo se observó que al administrar a 55 mujeres las cepas *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* B-54, se redujo la incidencia de infección en un 79%. En dicho estudio se demostró que la administración de lactobacilos como supositorio vaginal después del tratamiento con agentes antimicrobianos disminuyó la velocidad de recurrencia a 21%, comparado con el 47% en el grupo control (28).

A pesar de que existe una gran cantidad de evidencia científica del efecto probiótico se las cepas mencionadas, no se ha encontrado reportes del estudio de las mismas sobre las células HeLa como modelo celular (29–31).

1.4 Lubricantes íntimos

En referencia a los lubricantes íntimos, su consumo es un hábito cultural nuevo que crece año a año. En los mercados más maduros se vende tanto como otros productos de uso diario, de hecho, las mujeres los auto-aplican después del baño, sea que tengan expectativas sexuales o no. Hace unos años, los lubricantes sólo se usaban en situaciones donde la lubricación natural no era suficiente, pero hoy por hoy son recomendados por ginecólogos y sexólogos ya que son una buena opción ante la sequedad vaginal y ayudan a que la relación íntima sea más placentera. Por ello, no sólo es un producto para mujeres de mediana edad, sino que los jóvenes también lo utilizan. Los mismos se comercializan en sex-shops, farmacias, supermercados o venta online y pueden ser de base acuosa o de base oleosa. Sin embargo, los profesionales en la materia aseguran que los lubricantes más recomendados son los acuosos ya que no alteran el pH vaginal, y de esta forma no dan lugar a infecciones (32).

Considerando tanto la frecuencia como la gran molestia que generan las infecciones urogenitales en la vida de las mujeres y entendiendo que la prevención de las mismas es la mejor forma de combatirlas, se propone evaluar en el marco del presente proyecto una alternativa profiláctica que ayude a mantener y restablecer el equilibrio de la microbiota vaginal. De aquí nace la idea de desarrollar un lubricante íntimo de base acuosa con bioactivos que cumpla con las características de los lubricantes comerciales, pero que cuente con una ventaja

frente a los mismos; que además de evitar la sequedad vaginal y potenciar las actividades íntimas, fortalezca la microbiota vaginal. En conjunto con buenas prácticas de higiene femenina, propone disminuir la incidencia de dichas molestas infecciones.

2. Objetivos:

2.1 Objetivo general

Desarrollar un gel lubricante íntimo con agentes bioactivos para la prevención de infecciones urogenitales en mujeres.

2.2 Objetivos específicos

- Analizar distintos parámetros del cocultivo de las cepas probióticas *L. rhamnosus* GR1 y *L. reuteri* B-54 con la línea celular HeLa proveniente de epitelio uterino.
- Evaluar el efecto del ácido láctico como agente bioactivo.
- Formular el producto.
- Desarrollar el modelo de negocios.

3. Metodología

El trabajo práctico se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay, con excepción del ensayo de citometría de flujo el cual se realizó en las instalaciones del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.1 Materiales

3.1.1 Cepas y reactivos generales

Las cepas probióticas *L reuteri* B-54 (LGM 8153) y *L rhamnosus* GR-1 (ATCC 5588) fueron compradas a BCCM (*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms*) y ATCC (*American Type Culture Collection*) respectivamente.

Las cepas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus niger* (ATCC 16404), así como la línea celular HeLa (ATCC CCL-2) se encontraban disponibles en el laboratorio de biotecnología de la Universidad ORT.

Los reactivos generales se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, EUA), Dorwill (Argentina), PanReac AppliChem (España) y de Merck (Alemania). Los medios de cultivo para bacterias y hongos se obtuvieron de Oxoid (Inglaterra) y los reactivos de cultivo celular (medios de cultivo y suero fetal bovino) de Capricorn (Alemania).

La glicerina, propilenglicol, metilparabeno y carbopol -componentes que fueron utilizados para la formulación de los lubricantes íntimos- fueron comprados en la Droguería Montevideo (Uruguay).

3.1.2 Medios de cultivo

MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Tabla 1: Composición de medio de cultivo MRS

Componentes	Concentración final
Peptona	10 g
Extracto de levadura	4 g
'Lab-Lemco' Powder	8 g
Glucosa	20 g
Monooleato de sorbitán	1 mL
Fosfato de hidrógeno di-potásico	2 g
Acetato de sodio trihidratado	5 g
Citrato tri-amonio	2 g
Sulfato de magnesio 7-hidratado	0.2
Sulfato de manganeso 4-hidratado	0.05 g
Agua destilada	csp* 1 L

* csp: cantidad suficiente para

Preparación de un litro de caldo MRS:

- 1) Disolver 52 g del polvo deshidratado comercial en agua destilada.
- 2) Separar 250 mL del caldo en botellas de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.

Preparación de un litro de medio de **MRS Agar**:

- 1) Disolver 52 g del polvo deshidratado comercial MRS y 15 g de Agar en agua destilada. 2) Fraccionar 250 mL del medio en frascos de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.
- 3) Repartir en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro a razón de unos 20 mL por cada unidad.
- 4) Almacenar en la heladera a 4 °C hasta su uso.

LB (Luria-Bertani):

Tabla 2: Composición de medio de cultivo LB

Componentes	Concentración final
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	csp* 1 L

* csp: cantidad suficiente para

Preparación de un litro de medio de **LB**:

- 1) Disolver los siguientes polvos comerciales deshidratados en un litro de agua destilada: -10 g de triptona
-5 g de extracto de levadura
-10 g de NaCl
- 2) Separar 250 mL del caldo en botellas de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.

YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose):

Tabla 3: Composición de medio de cultivo YPD

Componentes	Concentración final
-------------	---------------------

Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	csp* 1 L

*csp: cantidad suficiente para

Preparación de un litro de medio de **YPD**:

- 1) Disolver los siguientes polvos comerciales deshidratados en un litro de agua destilada:
 - 20 g de peptona
 - 20 g de glucosa
 - 10 g de extracto de levadura
- 2) Fraccionar 250 mL del caldo en frascos de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.

TSB (Tryptic Soy Broth):

Tabla 4: Composición de medio de cultivo TSB

Componentes	Concentración final
Digerido pancreático de caseína	15 g
Digerido papaínico de harina de soja	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	csp* 1 L

* csp: cantidad suficiente para

Preparación de un litro de medio de cultivo **TSB**:

- 1) Disolver 30 g del polvo deshidratado comercial TSB en agua destilada.
- 2) Repartir 250 mL del medio en botellas de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.

TSA (Trypticase Soy Agar):

Preparación de un litro de medio de cultivo **TSA**:

- 1) Disolver 30 g del polvo deshidratado comercial TSB y 15 g de Agar en agua destilada. 2) Fraccionar 250 mL del medio en frascos de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.
- 3) Repartir en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro a razón de unos 20 mL por cada unidad.
- 4) Almacenar en la heladera a 4 °C hasta su uso.

PDA (Potato Dextrose Agar)

Tabla 5: Composición de medio de cultivo PDA

Componentes	Concentración final
Extracto de papa	4 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	csp* 1 L

*csp: cantidad suficiente para

Preparación de un litro de medio de cultivo **PDA**:

- 1) Disolver 39 g del polvo deshidratado comercial PDA en agua destilada.
- 2) Fraccionar 250 mL del medio en frascos de 500 mL de capacidad para ser esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 1 atmósfera y a una temperatura de 121 °C.
- 3) Repartir en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro a razón de unos 20 mL por cada unidad.
- 4) Almacenar en la heladera a 4 °C hasta su uso.

3.1.3 Equipos

- Autoclave Wise Clave, modelo WAC-60. -Baño termostatzado QUIMIS modelo 9121340 -
- Centrífuga Thermo Scientific SL 16R.
- Centrífuga WiseSpin, modelo CF-10.
- Estufa incubadora QUIMIS, modelo Q316M2.
- Espectrofotómetro UNICO, modelo 2800.
- Freezer (-80 °C) Wisd SmartCryo SWUF-80.
- Heladera/Freezer James modelo RJ 35K NF-BL -Orbital
- Shaker-Incubator bioSan, modelo ES-20.
- Lector de placa Thermo Scientific/Multiskan Fc modelo 35790014
- pHmetro portátil OAKTON, serie Acorn
- Microscopio UNICO, serie G300
- Campana flujo laminar TEKSOL
- Liofilizador Telstar LyoQuest
- Citómetro de flujo CyAn™ ADP (DAKO) del Instituto Pasteur

3.2 Métodos

3.2.1 Generación de stock y criopreservación

Con el fin de iniciar un cultivo para criopresevar un microorganismo, se lo inocula en el medio adecuado y se lo incuba a una temperatura de crecimiento apropiada. A partir de éste, se siembra sobre una Placa de Petri con el medio de cultivo solidificado una estría. De dicha estría se hace el repique de una colonia en un nuevo caldo de cultivo, el cual se incuba O.N. Luego, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos, 5 mL del cultivo con el microorganismo del cual se desea congelar. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en una mezcla que contiene 500 μ L de glicerol al 30% y 500 μ L del medio de crecimiento del microorganismo. Posteriormente se realiza el fraccionamiento en criotubos de 2 mL de volumen (1 mL por criotubo) y se almacena en freezer a -80°C hasta su uso.

3.2.2 Tinción de Gram

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias gram negativas y bacterias gram positivas. Se basa en colocar como colorante primario al cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano. Luego se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta que satura los espacios del peptidoglicano. Enseguida, se coloca una mezcla de alcohol, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma. Las bacterias gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción. Como resultado de la técnica, las bacterias gram positivas quedan púrpuras mientras que las bacterias gram negativas rosadas (33).

Procedimiento para realizar la tinción:

- 1) Fijar la muestra en un portaobjetos con agua destilada mediante aplicación de calor
- 2) Cubrir con cristal violeta e incubar 1 minuto
- 3) Lavar con agua corriente
- 4) Colocar Lugol e incubar 1 minuto
- 5) Enjuagar con agua corriente
- 6) Lavar con Etanol 95% durante 30 segundos
- 7) Enjuagar con agua corriente
- 8) Teñir con safranina e incubar 1 minuto.
- 9) Lavar con agua corriente
- 10) Secar la muestra
- 11) Observar al microscopio en aumento de 100X con aceite de inmersión (34).

3.2.3 Recuento en placa por el método de la gota

El recuento en placa se utiliza para calcular el número de unidades formadoras de una colonia (UFC) en una suspensión bacteriana. Se basa en el crecimiento y desarrollo de colonias en un medio de cultivo por lo que sólo se detectan aquellas bacterias que están viables en las condiciones de trabajo (35).

Una de las técnicas cuyo uso se ha intensificado para el recuento bacteriano, es la técnica de goteo en placa debido a que es fácil, rápida y económica. Consiste en realizar diluciones seriadas (base 10) en PBS estéril de los cultivos y sembrar por triplicado 10 μ L por cada dilución. Una vez que se absorben las gotas, las placas se incuban entre $25-37^{\circ}\text{C}$ según el microorganismo que se esté cultivando durante un tiempo estimado de 24-48 horas. Luego de la incubación se cuenta para cada placa las colonias presentes en cada dilución y se realiza un promedio de las tres gotas. Dicho número multiplicado por el inverso del factor de dilución corresponde al número de UFC/mL del cultivo original (35,36).

3.2.4 Descongelado de la línea celular HeLa.

1. Descongelar rápidamente el vial de línea celular HeLa (ATCC CCL-2) mediante agitación suave en un baño de agua termostatzada a 37°C
2. Transferir el contenido del vial a un tubo cónico con 5 mL de medio DMEM previamente termostatzado a 37°C
3. Centrifugar 5 minutos a 250 g
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 1 mL del medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino
5. Tomar una alícuota y realizar recuento celular en cámara de Neubauer utilizando Azul de Tripán y calcular viabilidad según las fórmulas descritas a continuación:
6. Transferir 1 mL de la suspensión celular y 4 mL de medio de crecimiento suplementado a una botella plástica de 25 cm² de cultivo (T25) e incubar a 37° C en estufa con atmósfera de 5% de CO₂.

Cálculos:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células totales}} \times 100$$

$$\text{Recuento} = \text{promedio de células vivas de cuatro cuadrantes} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

3.2.5 Subcultivo de la línea celular HeLa empleando Tripsina-EDTA:

1. Cuando las células presenten 80% de confluencia, descartar el medio de cultivo de la botella.
2. Lavar la monocapa de células con PBS estéril 1X
3. Incubar 1 minuto
4. Descartar PBS
5. Agregar solución de tripsina-EDTA
6. Incubar la botella de cultivo a 37° C durante 5-10 minutos y observar las células al microscopio
7. Mover suavemente la botella cuando las células se observan separadas y redondeadas
8. Añadir medio DMEM 10% SFB y disgregar las células pipeteando suavemente
9. Tomar una alícuota y realizar recuento con Azul de Tripán en cámara de Neubauer
10. Agregar volumen suficiente de medio suplementado de crecimiento para ajustar a la concentración deseada en nuevos frascos de cultivo celular estériles (botellas T25 o T75) o placas según el ensayo
11. Incubar los cultivos a 37° C en estufa con atmósfera de 5% de CO₂.

3.2.6 Curva de crecimiento de la línea celular HeLa



1. Sembrar en placa de 12 pocillos, 12 pozos a una concentración de 2x10⁵ células/pozo, empleando 1 mL por pozo. Considerar triplicado para cada día y un total de cuatro días
2. Luego de 24 hs, chequear confluencia al microscopio
3. Descartar sobrenadante del pocillo correspondiente
4. Lavar con 500 µL de PBS
5. Incubar 1 minuto
6. Agregar 100 µL de tripsina-EDTA
7. Incubar 5-10 minutos
8. Neutralizar con 400 µL de DMEM suplementado con 10% SFB
9. Homogeneizar y tomar alícuota para recuento con Azul de Tripán

3.2.7 Curvas de crecimiento de bacterias

La cepa *L. rhamnosus* GR-1 crece a 37°C en condiciones de microaerofilia (jarra con vela) y *L. reuteri* B-54 crece a 37°C en condiciones de anaerobiosis (jarra con sobres de anaerobiosis). (Tabla 6).

A partir de cultivos O.N. se ajustó la concentración según la absorbancia medida inicialmente a 600 nm para inocular los respectivos matraces con un volumen final de 150 mL de caldo MRS. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 29, 49, 74 hs. Para cada tiempo, se midió por duplicado la absorbancia a 600 nm con el espectrofotómetro y se graficaron los datos.

Tabla 6: Condiciones adecuadas de crecimiento de *L.rhamnosus* GR-1 y *L.reuteri* B-54

Cepa	Condición óptima de crecimiento	Temperatura óptima de crecimiento	Ambiente óptimo de crecimiento
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1	Microaerofilia	37° C	 <p>Con velas</p>
<i>Lactobacillus reuteri</i> B-54	Anaerobiosis	37° C	 <p>Sobre de anaerobiosis</p>

3.2.8 Curva de correlación

A partir de cultivos O.N. de *L. rhamnosus* GR-1 y *L reuteri* B-54, se centrifugó a 3000 g 5 minutos, se lavó dos veces con PBS estéril, Posteriormente se realizaron diluciones seriadas al medio para cada cepa (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) y se midió la DO a 600 nm para cada dilución.

Finalmente, se realizó un recuento en placa por método de la gota para relacionar las UFC/mL con los valores de absorbancia de tal forma que cada vez que se desee conocer o estimar una concentración de microorganismos en determinada suspensión, con una medida rápida en el espectrofotómetro, la correlación permitirá aproximar las UFC/mL sin la necesidad de efectuar el recuento en placa cada vez. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta para las cepas ensayadas.

3.2.9 Ensayo de co-cultivo

En cultivo celular, a partir de un frasco de cultivo T75 de células HeLa confluentes, se lavó y se despegaron con tripsina-EDTA para hacer recuento en cámara de Neubauer con Azul de Tripán. Se realizaron los cálculos de forma de sembrar 2 placas de 12 pocillos (p12) con 3×10^5

células por pozo, cada pozo de 1 mL de DMEM 10% SFB y se incubaron ambas placas durante 24 horas en estufa a 37°C, 5% CO₂.

Paralelamente, se descongelaron las bacterias a evaluar (30 µL en 3 mL de caldo de cultivo MRS) y se incubaron en estufa a 37°C. A las 24 horas, se realizó un repique de 100 µL en 9,9 mL de caldo MRS y se incubó durante 24 horas a la misma temperatura. Luego, las bacterias fueron lavadas con PBS estéril dos veces (centrifugación 3000 g, 5 minutos) y finalmente resuspendidas en 5 mL de dicha solución. A continuación, utilizando la ecuación de la recta obtenida de las curvas de correlación (DO 595 nm en función de UFC/mL) de cada bacteria, se calculó la concentración de las suspensiones bacterianas y se ajustó de manera de tener una relación bacteria: célula de 10:1 y de 50:1, una MOI (del inglés, Multiplicity of Infection) de 10 y de 50 respectivamente.

En el día del co-cultivo, en cada placa, se renovó el medio de las células y se adicionaron 2 mL de DMEM 10% SFB, 1% Hepes conteniendo las bacterias en una relación bacteria: HeLa de 10:1 y 50:1. Se sembró cada MOI por triplicado, así como las células solas como control. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia en estufa a 37°C.

A continuación, se muestra el diseño de placas:

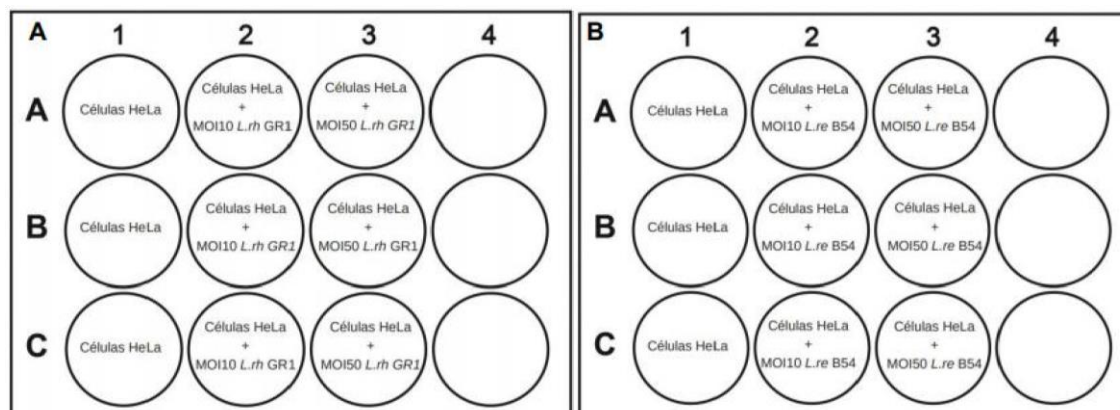


Figura 3: Diseño de placa de 12 pocillos para ensayo de co-cultivo de A) *L. rhamnosus* GR-1 y B) *L. reuteri* B-54, con células HeLa. Se evaluaron los siguientes parámetros:

- pH vs tiempo
- DO a 595 nm vs tiempo
- Recuento bacteriano (UFC/mL)
- Viabilidad de las células HeLa

Para ello, se tomaron muestras en los tiempos: 0, 2, 4, 6, 18 y 24 hs y se midió con el lector de placas la DO a 595 nm así como el pH con papel indicador.

Se realizó recuento en placa de las cepas bacterianas a las 4 y 18 hs mediante el método de la gota para evaluar concentración (UFC/mL)

La viabilidad celular se analizó por microscopía óptica mediante recuento por Azul de Tripán en el último tiempo.

3.2.10 Ensayo de interacción de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54 con células HeLa por citometría de flujo.

Se partió de cultivos O.N. a 37°C de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54, los cuales se centrifugaron y lavaron con PBS estéril dos veces para eliminar el resto de medio de cultivo. A continuación, se utilizó el espectrofotómetro para realizar la medida de la absorbancia a 595 nm. A partir de dicha medida y junto con la ecuación de la recta de la curva de correlación de ambas cepas, se realizaron los cálculos para obtener una MOI de 50. Se tomó el volumen necesario se centrifugó y se resuspendió cada suspensión bacteriana en 500 µL de PBS. Se adicionó CFSE a una concentración de 15 µM y se incubaron 30 minutos a 37°C con agitación. El reactivo CFSE que se añadió hace que las bacterias presenten una tinción fluorescente verde que puede analizarse en el canal FL1 del Citómetro de flujo. Una vez finalizada la incubación, los tubos fueron centrifugados a máxima velocidad durante 4 minutos y lavados con PBS 1X. Dicho proceso fue realizado tres veces.

Las células HeLa, previamente despegadas con tripsina-EDTA y contadas con Azul de Tripán fueron sembradas en tubos de 1,5 mL a razón de 5×10^5 células vivas por tubo, en 300 uL de DMEM 10% SFB 1% Hepes. Se adicionaron las bacterias teñidas en una relación de 50:1 y se dejaron tubos únicamente con células como control. Se realizó triplicado de cada condición y se incubaron a 30 minutos a 37°C con agitación. Luego se realizaron dos lavados con PBSBSA 1% y las células fueron resuspendidas en 500 uL PBS-BSA 1%. Las preparaciones se transportaron refrigeradas al Instituto Pasteur de Montevideo para realizar la adquisición en el citómetro de flujo. Se utilizó un equipo CyAn™ ADP (DAKO) con un láser de 488 nm y uno de 635 nm. Al momento de realizar la adquisición, se adicionó Ioduro de Propidio a una concentración de 2,5 µg/mL a cada tubo para evaluar la viabilidad celular. Aquellas células que no son viables incorporan el colorante y presentan señal positiva en el canal FL2 ó FL3 del citómetro.

Para cada muestra celular se colectaron 10.000 eventos de la población de interés y se utilizó un umbral de 5%. Se realizaron gráficos de puntos de FSC vs SSC (tamaño vs granularidad) y se excluyeron los dobletes mediante gráficos de FSC vs ancho de pulso. Se realizaron gráficos de puntos de CFSE y Ioduro de Propidio y se analizó el % de células vivas positivas para CFSE. Además, se analizó el histograma de CFSE del cual se obtuvo el valor de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF). Para la adquisición de datos y su posterior análisis se empleó el programa Summit versión 4.3 (36).

3.2.11 Ensayo de crecimiento de *E. coli* y *C. albicans* en presencia del ácido láctico.

Para evaluar el efecto del ácido láctico en *E.coli* y *C.albicans*, primeramente se dejó incubando O.N. cultivos de *E.coli* (ATCC 8739) en LB y de *C.albicans* (ATCC 10231) en YPD y a 37°C y 25°C respectivamente. También se realizaron diluciones de ácido láctico 85% 11,4 M (previamente filtrado con un filtro estéril de 0.22 µm) por duplicado en LB e YPD de forma de obtener las siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 100, 150 y 600 mM.

Finalmente, se realiza la co-incubación en dos placas de 96 pocillos. Para ello, se sembró *E.coli* y *C.albicans* (por separado) al 2% en cada pocillo, junto con las diferentes concentraciones de ácido láctico (20 µL por pocillo). Además, se sembraron los siguientes controles:

- Medio solo (LB, YPD)
- Medio + 2% de cultivo de *E.coli* y *C.albicans* sin ácido láctico -
Medio + ácido láctico en su dilución más concentrada (600 mM).

A continuación, se muestra el diseño de la siembra en placa de 96 pocillos:

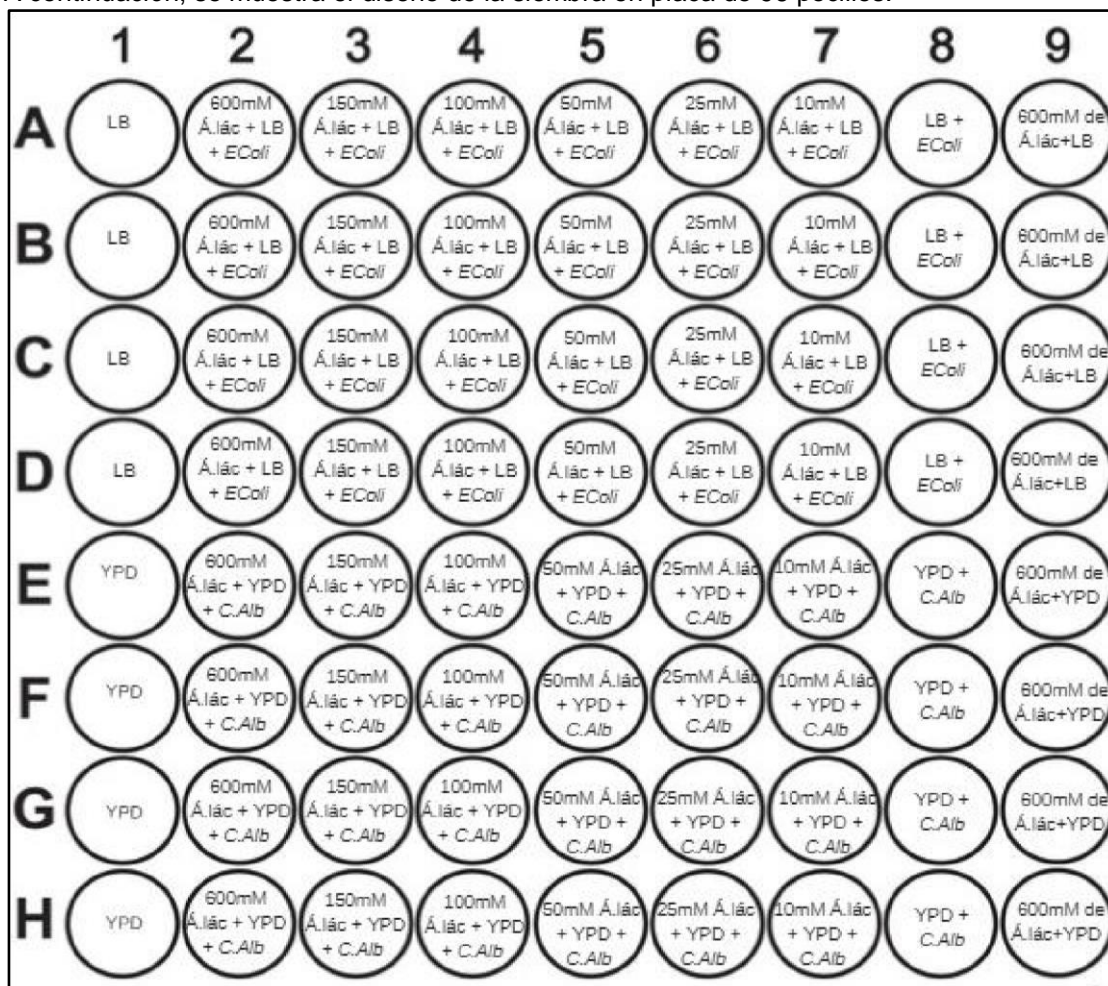


Figura 4: diseño de la placa p96 del co-cultivo con ácido láctico.

Se tomó medidas de la absorbancia a 600nm en tiempo 0, y luego se incubó a 25°C y 37°C (cada placa a una temperatura) durante 18 horas, donde se volvió a realizar otra medida de absorbancia a la misma longitud de onda.

3.2.12 Ensayo de citotoxicidad con cristal violeta

Se partió de una botella de cultivo T25 con células HeLa que fueron despegadas y contadas según lo descrito en la sección 3.2.5. Se realizó la siembra de células en placa de 96 pocillos en un volumen de 100 µL en cada pozo con una concentración de 5×10^4 células/pozo. La placa se dejó incubando 24 horas en estufa a 37°C con 5% CO₂.

En el día del ensayo, se realizaron diluciones de ácido láctico estéril en medio de crecimiento DMEM suplementado 10% SFB para obtener las siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 75, 100, 150 Y 600 mM. Se retiró el medio de cultivo y se sembró 100 µL de cada concentración en la placa de 96 pocillos conteniendo las células HeLa creciendo en adherencia.

Se utilizaron los siguientes controles:

- Células HeLa + medio de crecimiento DMEM suplementado 10% SFB sin ácido láctico como control de células (100% de viabilidad)
- Ácido láctico 600 mM sin células como control de interferencia.
- Medio de crecimiento DMEM suplementado 10% SFB sin células como control de interferencia del medio.

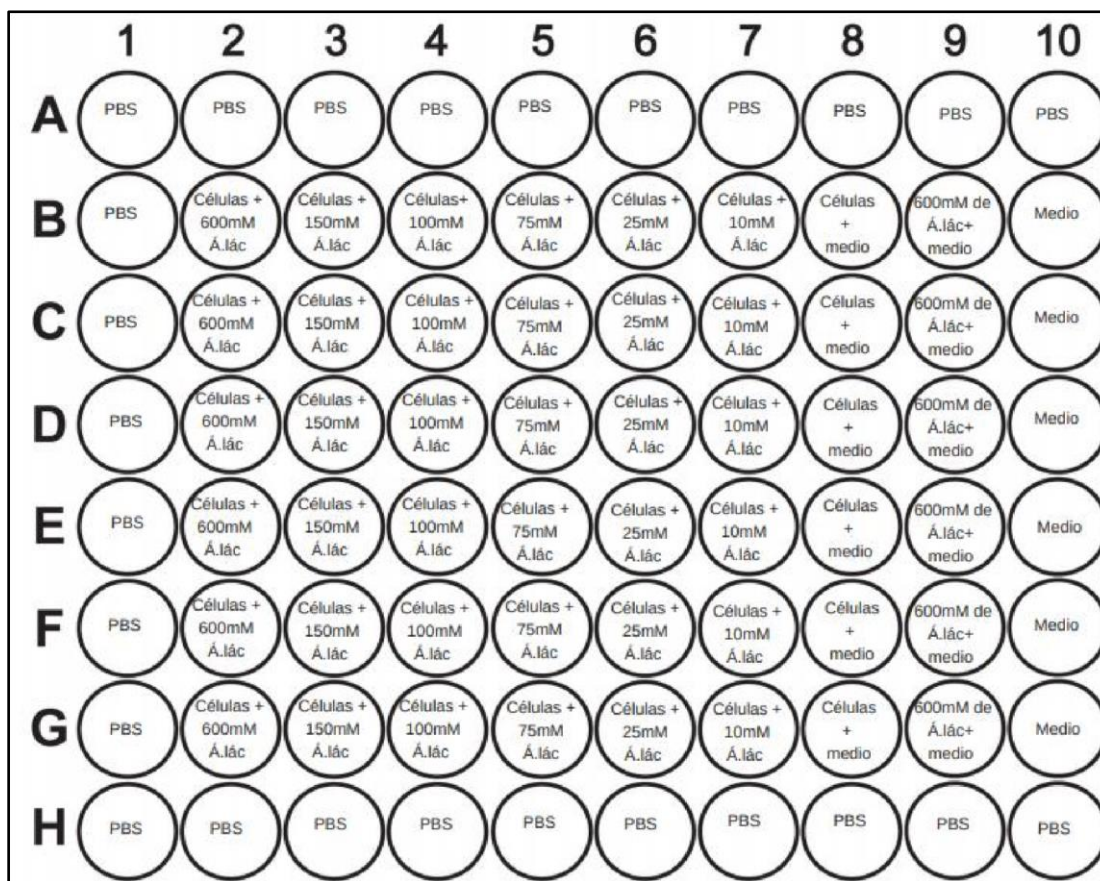


Figura 5: Diseño de placa de 96 pocillos para ensayo citotoxicidad

Luego de 24 hs de incubación se realizó el revelado de la placa con cristal violeta siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Chequear estado de células al microscopio óptico
2. Descartar medio
3. Lavar con 100 µL de PBS estéril, con cuidado de no despegar las células
4. Agregar 50 µL de cristal violeta 0,75% en MeOH 40% por pocillo, e incubar 20 minutos a 37°C
5. Descartar el colorante en la pileta
6. Eliminar exceso de colorante lavando la placa con agua
7. Retirar el agua y escurrir bien la placa
8. Agregar 250 µL de ácido acético al 20% por pocillo y homogeneizar
9. Medir absorbancia a 595 nm.

3.2.13 Formulación del producto

Se evaluaron dos posibles formulaciones químicas con ácido láctico, y se evaluó la microencapsulación y liofilización de probióticos.

3.2.14 Formulación química

A partir de distintas patentes reportadas en la literatura, se propuso desarrollar un gel lubricante íntimo que contenga aproximadamente de 5% a 50% en peso de glicerina y de 2% a 40% aproximadamente en peso de propilenglicol. Por otro lado, considerando que se desea que el lubricante sea de tipo gel, se describe el carbopol como un polímero carboxivinílico ampliamente utilizado en formulaciones cosméticas y que en concentraciones del 1-2% es empleado para obtener geles idóneos en cuanto a consistencia (media-alta). A su vez,

contemplando obtener un lubricante de base acuosa es que se agrega a la composición agua purificada (37,38).

En cuanto a los conservantes, es importante incorporarlos con el fin de preservar la estabilidad de la composición y prevenir así el crecimiento de microorganismos. En los lubricantes comerciales se utilizan conservantes conocidos, tales como metilparabeno, ácido benzoico, ácido sórbico, ácido gálico o propilparabeno en una concentración de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,75% (38).

También se adiciona a la formulación ácido láctico a 600 mM como agente bioactivo. Dicha concentración se eligió en base a resultados de previos ensayos.

Teniendo de base la información encontrada en literatura se plantearon dos posibles formulaciones de un lubricante comercial utilizando un tipo distinto de conservante para cada formulación (metilparabeno y ácido benzoico). Para un volumen de 50 mL por formulación:

Tabla 7: Porcentaje y volumen de cada componente de la formulación 1

Componente	Porcentaje	Volumen
Glicerina	40%	20 mL
Propilenglicol	10%	5 mL
Metilparabeno	0,4%	0,2 g
Ácido láctico	5%	2,5 mL
Carbopol	1,8%	0,9 g
Agua	42,8%	21,4 mL

Tabla 8: Porcentaje y volumen de cada componente de la formulación 2

Componente	Porcentaje	Volumen
Glicerina	40%	20 mL
Propilenglicol	10%	5 mL
Ácido benzoico	0,4%	0,2 g
Ácido láctico	5%	2,5 mL
Carbopol	1,8%	0,9 g
Agua	42,8%	21,4 mL

3.2.15 Preparación del lubricante:

Primero se añadió glicerina y propilenglicol en los porcentajes en peso descritos en las Tablas 8 y 9, Dichos componentes se mezclan y se agrega el respectivo conservante (metilparabeno /ácido benzoico) así como el ácido láctico. Posteriormente se agrega el carbopol y se agita 10 minutos para obtener una suspensión. Se midió el pH de cada formulación a temperatura ambiente sumergiendo directamente un electrodo de pH, sin necesidad de ajustar el pH, ya que

debido al agregado de ácido láctico, la solución ya contaba con el valor de pH deseado (<4). Para finalizar se agrega agua purificada y, dentro de quince a treinta minutos, la combinación forma un gel transparente que se esteriliza en la autoclave a 121°C durante 15 minutos, a 1 atmósfera.

3.2.16 Prueba de microencapsulación con alginato de sodio

Con el fin de evaluar la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 se utilizó la técnica de gelificación iónica o método de goteo. La misma consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular (bacterias) en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla, mediante goteo, sobre una solución acuosa de CaCl₂ que se encuentra sometida a una determinada velocidad de agitación. Al entrar la gota de alginato sódico en contacto con Ca²⁺, se produce la gelificación instantánea de la misma, obteniéndose una membrana o cubierta de alginato cálcico que es insoluble en agua pero permeable (Figura 6)

(39)

Preparación de alginato de sodio 2%: En un matraz de 100 mL de capacidad se disolvió 1 g de alginato de sodio en 50 mL de agua miliQ y se autoclavó a 121°C durante 15 minutos, a 1 atmósfera.

Preparación de cloruro de calcio (CaCl₂) al 2%: En un vaso de bohemia con capacidad de 250 mL, se disolvió 1 g de cloruro de calcio en 50 mL de agua miliQ y se filtró la solución con un filtro estéril de 0,22 um sobre un tubo cónico estéril.

Se partió de un cultivo O.N. a 37°C de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 al cual se le midió la DO a 600 nm y se lo centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Luego se lavó con PBS estéril y se inoculó una concentración bacteriana de 1,0x10⁸ UFC/mL en el matraz conteniendo la solución de alginato de sodio al 2% previamente calentada en baño maría a 42°C.

Para la microencapsulación de las bacterias, se enfrió durante 15 minutos la solución de cloruro de calcio al 2% y se tomaron 5 mL de la solución de alginato de sodio con bacterias en el émbolo de una jeringa con una aguja de 0,8 mm x 40 mm. A una altura oscilante de 2.0 cm a 6.0 cm se dejó gotear constantemente sobre la solución de cloruro de calcio en agitación mecánica, y así sucesivamente hasta terminar la solución de alginato de sodio. Se dejó reposar por 1 hora y finalmente se extrajeron las microcápsulas obtenidas utilizando un tamiz.

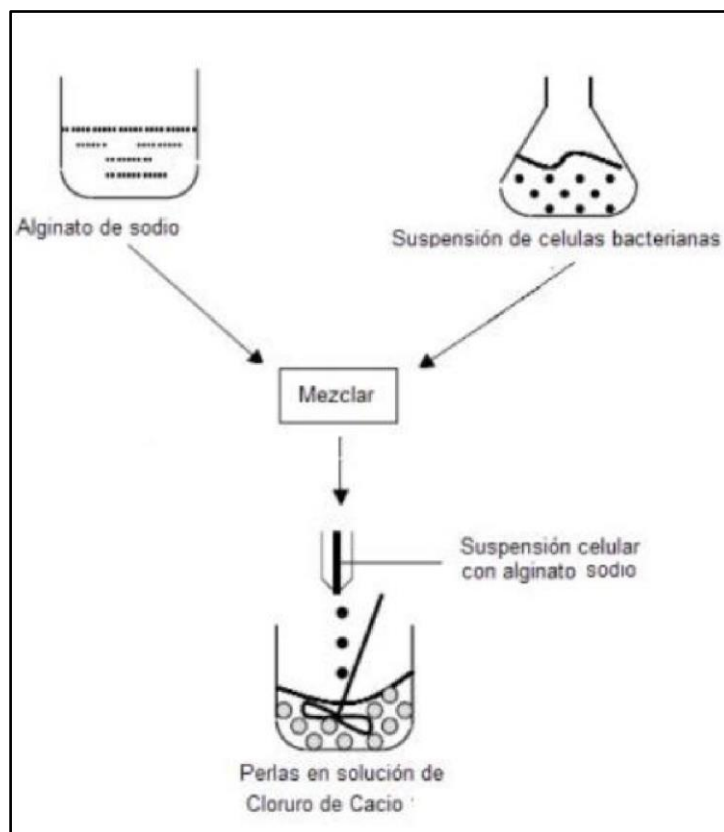


Figura 6: Esquema de la microencapsulación de bacterias por método de goteo a partir de la mezcla de alginato de sodio con una suspensión de células bacterianas. Tomado de Ramírez *et al* (39).

3.2.17 Prueba de liofilización

Se partió de un cultivo O.N. a 37°C de *L.rhamnosus* GR-1. Luego se midió la absorbancia a 600 nm para conocer la concentración bacteriana de partida, y se realizó un recuento en placa por método de la gota. A continuación, se centrifugó a 4500 g, durante 10 minutos y se lavó dos veces con PBS estéril. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 mL de los siguientes lioprotectores:

- Leche descremada al 10%
- Sacarosa al 10%

Como control se liofilizaron los mismos medios lioprotectores descritos pero carentes de bacterias.

Las preparaciones fueron colocadas en viales de vidrio, lavados y esterilizados previamente a 121°C, durante 15 minutos y 1 atmósfera. A su vez, dichos viales fueron tapados parcialmente con tapones de butilo con muesca también esterilizados en las mismas condiciones. Finalmente se colocaron los viales con sus respectivas preparaciones así como los viales control en el freezer a -80°C durante 24 horas y luego se setearon las condiciones de liofilización según el manual del fabricante (Liofilizador Testar LyoQuest).(40)

3.2.18 Ensayo de estabilidad

El estudio de estabilidad proporciona información que indica el grado de estabilidad relativa de un producto en las variadas condiciones a las que pueda estar sujeto desde su fabricación hasta su expiración. Resulta relevante realizar este estudio durante el desarrollo de nuevas formulaciones y de lotes-piloto de laboratorio (41).

Las pruebas deben ser conducidas bajo condiciones que permitan proporcionar información sobre la estabilidad del producto en el menor tiempo posible. Para ello, las muestras deben ser almacenadas en condiciones que aceleren los cambios posibles de ocurrir, pero tampoco que dichas condiciones sean tan extremas que, en vez de acelerar el envejecimiento, provoquen alteraciones que no ocurrirían en el mercado (41).

En este ensayo, se pretendió evaluar la estabilidad de este producto en cuanto a parámetros organolépticos como aspecto, color, olor y valor de pH. En primer lugar, se prepararon 20 mL de cada una de las dos formulaciones propuestas, las cuales fueron esterilizadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta el inicio del ensayo.

Las formulaciones estériles se incubaron durante cuatro semanas, en ciclos de 24 horas a 40°C, y 24 horas a 4 °C. Luego de cada ciclo, se registraron los parámetros organolépticos.

3.2.19 Ensayo de eficacia antimicrobiana del producto según farmacopea de Estados Unidos. (42,43)

Se prepararon los medios a utilizar (TSB, YPD, PDA y TSA), tal como se describió previamente. También se prepararon 30 mL de las dos formulaciones propuestas de producto, y se autoclavaron a 121°C durante 15 minutos a 1 atmósfera. Una vez estériles, se fraccionó cada lubricante en 5 tubos conteniendo 5 mL cada uno.

Para determinar la eficacia del producto, se emplearon cultivos de *Cándida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Se criopreservó en criotubos cada uno de los microorganismos mencionados con glicerol al 15% y a la temperatura de 80°C, así como también se realizó la medida de absorbancia a 595 nm y la siembra de distintas diluciones en placa para obtener la correlación entre absorbancia y concentración (UFC/mL) inicial para los respectivos microorganismos.

A partir de estos datos, se realizaron los cálculos correspondientes para inocular en el producto una concentración de 5×10^5 UFC/mL, es decir $2,5 \times 10^6$ UFC totales en un volumen final de 5 mL (5 tubos por cada formulación).

Cada tubo se inoculó con 25 μ L (0,5% del producto) a la concentración de microorganismos descrita anteriormente. Las formulaciones inoculadas se dejaron incubando a 25°C y a los 14 y 28 días de transcurrido el ensayo se tomaron muestras y se realizó recuento en placa por método de la gota, tal como lo indica la farmacopea de USA para productos de la categoría 2. Esta categoría incluye a “productos empleados de manera tópica preparados con bases o vehículos acuosos que se aplican a membranas mucosas”, por lo que el lubricante pertenece a dicha categoría.

3.2.20 Análisis Estadístico

Los datos analizados estadísticamente se reportan como la media +/- el desvío estándar (SD) de dos o tres experimentos independientes. Salvo que se especifique lo contrario, cada condición fue realizada por duplicado o triplicado en cada ensayo.

Para la comparación entre grupos, se realiza el análisis estadístico ANOVA one-way con post test Dunnett´s con valor $p < 0.05$ para determinar diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó el software GraphPad Prism v5 para el análisis.

4. Resultados y Discusión

4.1 Análisis de distintos parámetros del cocultivo de las cepas *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54 con células HeLa

4.1.1 Curva de crecimiento de *L. rhamnosus* GR-1 y *L.reuteri* B-54

Se evaluó el crecimiento de las cepas bacterianas mencionadas en distintos tiempos (0,1, 2, 3, 4, 5, 24, 29, 49, 74 hs). Tal como se observa en la Figura 7 del crecimiento de dichos microorganismos vs tiempo, ambos cultivos bacterianos presentan una fase lag que comprende las primeras tres horas iniciales de cultivo. A partir de la cuarta/quinta hora, se aprecia un salto en ambas curvas (aunque para la B-54 es considerablemente menor). Éste salto indica el comienzo de la fase exponencial de crecimiento que se extiende hasta las 29 hs, donde a partir de dicho tiempo los cultivos se mantienen en fase estacionaria.

El pico máximo de crecimiento tanto para *L.rhamnosus* GR-1 como para *L.reuteri* B-54 fue a las 74 hs de transcurrido el ensayo; de 6.4 y 4.8 respectivamente. Es importante mencionar que en las 74 hs de ensayo no se llegó a apreciar la fase de muerte que sufren las poblaciones bacterianas y que está ampliamente reportado en la literatura. En el caso de que se deseara visualizar todas las fases de crecimiento, el ensayo debería extenderse en el tiempo.

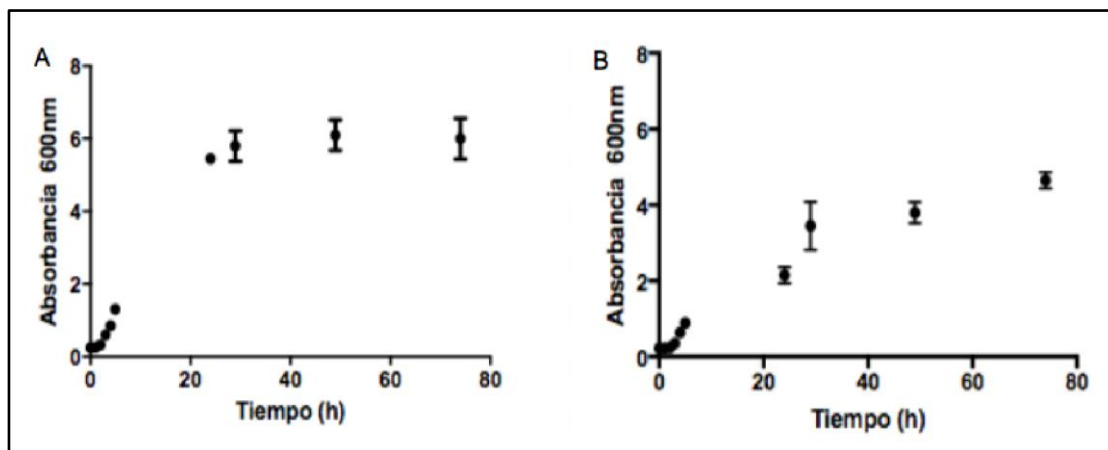


Figura 7: Curva de crecimiento de absorbancia a 600 nm en función del tiempo (h). A) *L.rhamnosus* GR-1 y B) *L.reuteri* B-54. Cada curva se realizó por triplicado, se visualiza un gráfico representativo.

Si se compara los resultados obtenidos del presente ensayo con los reportados, se observa - en el tiempo que dura el ensayo - que el crecimiento demostrado para dichas cepas en medio MRS caldo son similares (44,45). Para los ensayos posteriores se utilizaron cultivos en fase estacionaria de 30 hs de incubación.

4.1.2 Curva de correlación de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54

A fin de poder utilizar la absorbancia como una medida rápida y sencilla de la concentración de las cepas bacterianas, se elaboró para cada cepa una curva estándar que relaciona las medidas indirectas de densidad óptica (absorbancia) a 595 nm con las medidas directas de recuento en placa (UFC/mL), de forma tal de obtener una correlación entre ellas (46).

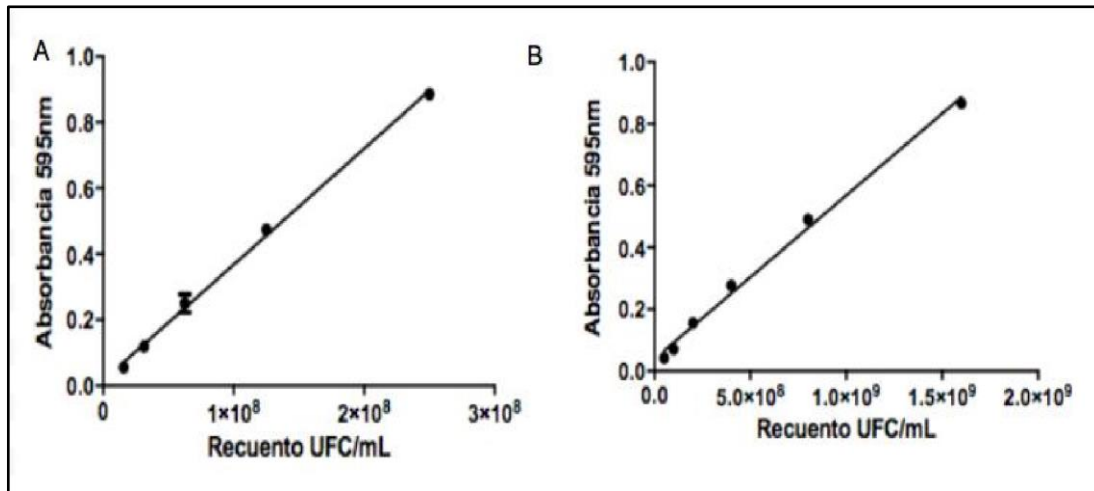


Figura 8: Curva de correlación de absorbancia a 595 nm y recuento (UFC/mL) A) *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, B) *Lactobacillus reuteri* B-54. Cada curva se realizó por triplicado, se visualiza un gráfico representativo.

Se obtuvo de cada curva de correlación, una ecuación de la recta, a partir de la cual se obtuvo el valor de UFC/mL en los ensayos posteriores. Para *L.rhamnosus* GR-1, dicha ecuación es de la forma: $y = 0,0035x + 0,015$ y para *L.reuteri* B-54, es: $y = 0,0053x + 0,039$, y ambas obtuvieron un coeficiente de relación lineal R^2 de 0,99.

Ambas cepas bacterianas manifestaron un comportamiento esperado, donde el aumento de la absorbancia medida por espectrofotometría se corresponde con un mayor recuento de bacterias (UFC/mL). Se observa un mayor número de UFC/mL para el caso de *L.reuteri* B-54 en comparación con *L.rhamnosus* GR-1 para una absorbancia dada, lo que podría deberse a una morfología diferente entre ambas cepas.

4.1.3 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram para ambas cepas bacterianas. Por un lado, se pretendió visualizar la morfología de las colonias - y verificar que se corresponden con las características reportadas en la literatura - así como asegurarse de la pureza de los cultivos. Tal como se esperaba, se observaron colonias de coloración violeta, indicando que son bacterias gram positivas, así como una morfología de bacilo alargado propio del género *Lactobacillus*. Se puede visualizar en la Figura 9 una clara diferencia entre la cepa GR-1 y B-54; donde la primera presenta una morfología de bacilo más alargada, forma cadenas y de tamaño mayor. Esta diferencia es coherente con lo observado en las curvas de correlación en donde se obtuvo menor recuento de la cepa GR-1 para una misma absorbancia.

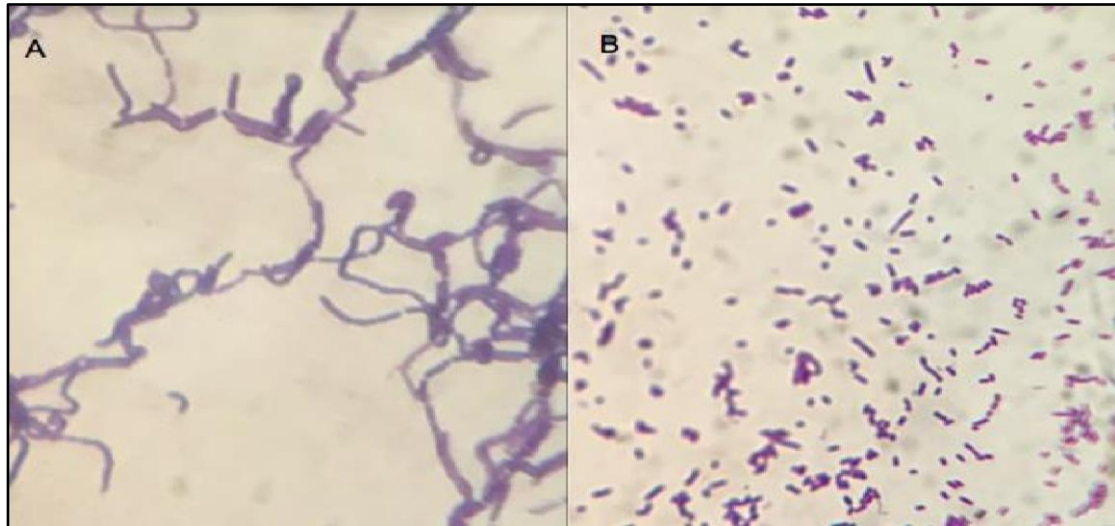


Figura 9: Microscopía óptica (aumento 1000X) de cepas probióticas de A) *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y B) *Lactobacillus reuteri* B-54. Se realizó tinción de gram y las muestras se visualizaron empleando aceite de inmersión.

4.1.4 Curva de crecimiento de HeLa

En el marco de este proyecto se eligió utilizar las células HeLa debido a que son un aproximado del modelo *in vitro* del epitelio uterino, zona cercana donde actuaría el lubricante íntimo que se desea desarrollar. No se contaba en el laboratorio con un modelo de línea celular de epitelio vaginal, lo que hubiera sido ideal para la realización de estos ensayos.

Debido a que los ensayos de co-cultivo se realizaron en condiciones de microaerofilia debida a que no se dispone de una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ para ensayos de co-cultivo con bacterias, se realizó una curva de crecimiento en condiciones óptimas para la línea celular HeLa que nos permitiera comparar luego si las células se veían afectadas durante el co-cultivo debido a la condición de incubación. Estos ensayos se realizaron empleando medio de cultivo conteniendo HEPES (N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-etano ácido sulfónico), que es un agente buffer que se emplea en medios de cultivo celular. Su adición proporciona una mayor capacidad de taponamiento cuando el cultivo celular requiere largos periodos de manipulación fuera de una incubadora CO₂ (47).

Se realizó la curva de crecimiento durante 4 días, donde se sembró en dos placas de doce pocillos (por duplicado) una concentración de 2×10^5 células HeLa/pozo en medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% SFB (Figura 10). A partir de la Figura 10, se observa la ausencia de etapa lag, iniciándose la fase exponencial desde el inicio del cultivo. Esto puede explicarse debido a que las células HeLa fueron incubadas en un medio en el cual ya estaban acostumbradas (de pasajes anteriores), y/o que las condiciones de cultivo así como la manipulación fue apropiada por lo cual no les fue necesario la adaptación y continuaron creciendo.

La viabilidad y la concentración celular fueron parámetros que se monitorearon durante 4 días (cada día 3 pocillos y por duplicado) y se observó que las células se mantuvieron en la etapa exponencial durante el periodo de estudio. La etapa estacionaria y la subsiguiente etapa de muerte no fueron alcanzadas a los 4 días. En el caso de que se quisiese determinar todas sus fases de crecimiento, la planificación del ensayo debería contemplar más días.

En cuanto a la viabilidad, se mantiene alta y constante a lo largo del ensayo, alrededor del 95%. En referencia a la concentración celular, la misma fue aumentando exponencialmente y alcanzó una concentración celular máxima de $1,3 \times 10^6$ cel/pozo en el día 4. Ambos resultados son coherentes debido las células se mantuvieron en fase exponencial durante todo el ensayo. Los valores son similares a los reportados en bibliografía (48,49).

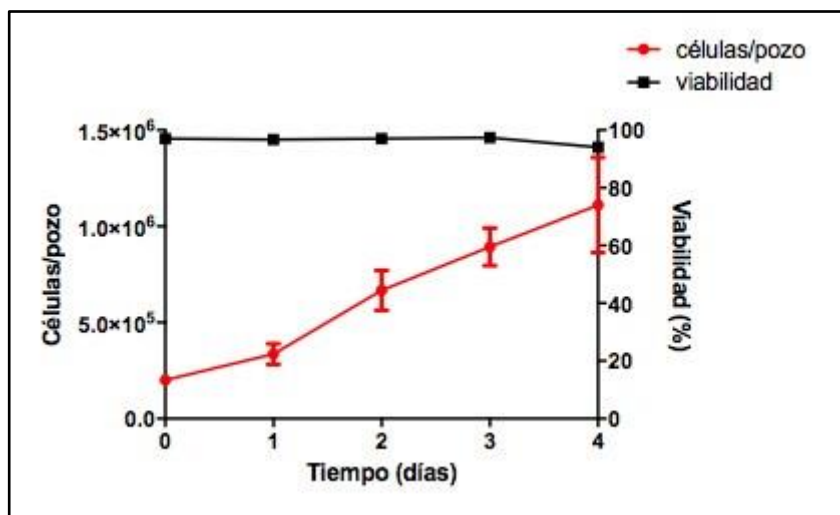


Figura 10: Curva de crecimiento de células HeLa: Concentración (células/pozo) y Viabilidad (%) en función del tiempo (días). La curva se realizó por duplicado y se visualiza un gráfico representativo.

4.1.5 Ensayo de co-cultivo

Se llevó a cabo el ensayo de co-cultivo de células HeLa con las cepas bacterianas *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* B-54 para optimizar tiempos de co-cultivo en sistema de microaerofilia a 37°C. Se evaluaron dos relaciones bacteria: célula, 10:1 y 50:1. Se tomaron muestras en distintos tiempos y se evaluó la variación del pH, DO 595 nm, recuento bacteriano (UFC/mL) y de la viabilidad celular.

A partir de las representaciones gráficas de la absorbancia en función del tiempo para ambas cepas, se observa que si bien ambas cepas bacterianas pertenecen al mismo género *Lactobacillus*, al crecer en un sistema de microaerofilia en co-cultivo con células HeLa, presentan diferencias considerables en lo que respecta al crecimiento.

La cepa B-54, que crece en condiciones de anaerobiosis, no presenta crecimiento alguno tanto para la MOI 10 como para la MOI 50 en el periodo de tiempo evaluado, lo que puede explicarse por la presencia de oxígeno en las condiciones del ensayo. Esto se visualiza en el gráfico como un incremento leve en la medida de absorbancia a lo largo del tiempo. No así sucede para la cepa GR-1, la cual sí presenta aumento de la absorbancia, indicando el crecimiento de la cepa y que, además, el mismo es distinto para las MOI estudiadas; donde la MOI 50 presenta mayor absorbancia (como se espera, debido a que tiene mayor concentración bacteriana) que la MOI 10. Si bien existe dicha diferencia durante todo el ensayo, ésta se acentúa en el último tiempo (t=24 hs).

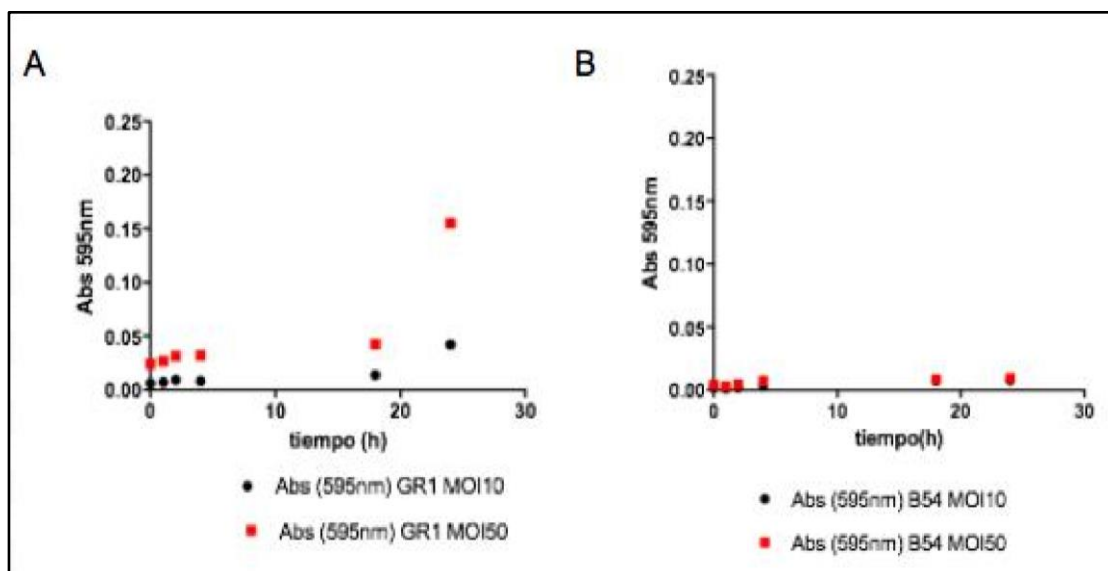


Figura 11: Absorbancia a 595 nm en función del tiempo. A) *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, B) *Lactobacillus reuteri* B-54. Se visualiza un gráfico representativo de tres experimentos independientes.

En la Tabla 9 se indican los valores de la medida de pH del medio obtenidos en distintos tiempos. Se aprecia una concordancia entre los resultados de pH y de DO 595 nm para las respectivas cepas; por un lado la cepa GR-1 creció considerablemente y dado que es productora de ácido láctico, el medio se acidificó y consecuentemente, el valor de pH disminuyó. Inicialmente el medio de cultivo partía de un pH entre 8 y 8,5 y en la medida de pH final el valor disminuyó a 5,5-6. Por otro lado, la cepa B-54 no manifestó variación de pH del medio; resultado esperado ya que tampoco creció.

Tabla 9: Variación de pH del medio de co-cultivo en el tiempo para cada cepa.

Tiempo (hs)	GR-1	B-54
0	8 - 8.5	8 - 8.5
1	8 - 8.5	8 - 8.5
2	8 - 8.5	8 - 8.5
4	8 - 8.5	8 - 8.5
18	7.5 - 8	8 - 8.5
24	5.5 - 6	8 - 8.5

En referencia a la viabilidad de las células, es posible señalar que el sistema de microaerofilia empleado en el presente ensayo no les generó dificultad de crecimiento ya que como se puede visualizar en la Figura 12, en la barra control de las HeLa en ausencia de bacterias, las mismas tuvieron una viabilidad mayor al 90% a pesar de no haber crecido en las condiciones habituales controladas a 5% de CO₂, las cuales presentan una viabilidad cercana al 100%.

Adicionalmente, se observa que en el co-cultivo con la cepa B-54, la viabilidad celular se mantuvo alta, posiblemente debido a que tanto para MOI 10 como para MOI 50, dicha cepa no demostró crecimiento aparente. La viabilidad del control de las células sin bacterias respecto a las co-incubadas con B-54 fue apenas un poco mayor. Para la otra cepa estudiada, GR-1, la viabilidad celular en co-cultivo disminuyó. Ésta resultó ser de 76% para MOI 10 y de 18% para la MOI 50, resultado que muestra que la viabilidad celular resulta considerablemente afectada en función de la concentración bacteriana con la que es co-incubada. Con una concentración

de diez veces más bacterias que células (MOI 10), las células todavía tienen viabilidad relativamente alta, mientras que con una concentración bacteriana cincuenta veces mayor (MOI 50) la viabilidad decrece sustancialmente.

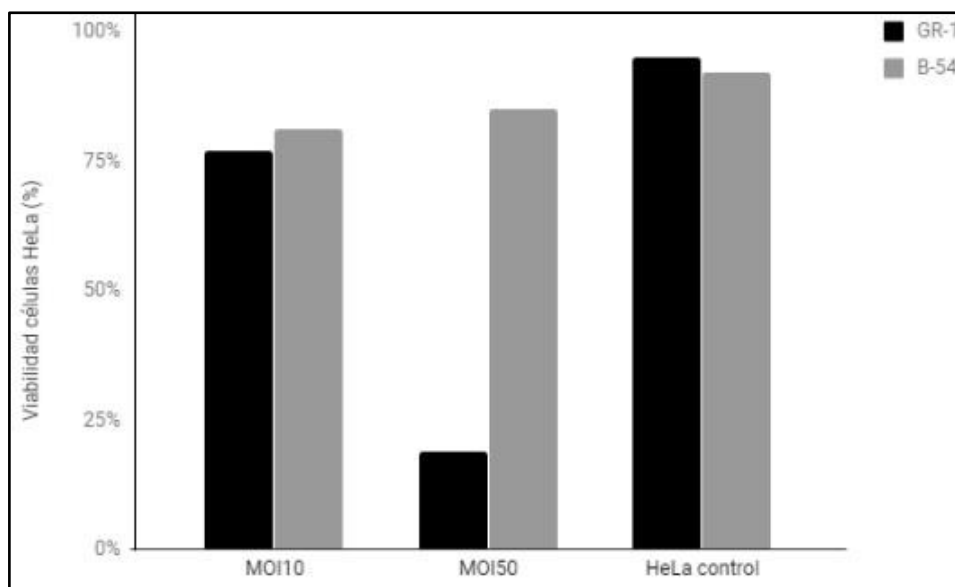


Figura 12: Viabilidad celular de HeLa en presencia de las diferentes MOI de *L.rh* GR-1 y *L.reu* B-54. Se visualiza un gráfico representativo de tres experimentos independientes.

En el ensayo en cuestión también se realizó el recuento (UFC/mL) de cada multiplicidad de infección, para cada cepa en el co-cultivo con células HeLa, en tiempo 4 y 24 horas de incubación (Figura 13).

Para la cepa *L.rh* GR-1, a las 4 horas, el crecimiento es muy similar entre la MOI 10 y MOI 50 donde el recuento es del mismo orden, correspondiente a 10^6 . A las 24 horas si se puede visualizar que presentan gran diferencia en el crecimiento entre las distintas MOI. En la MOI 10, en tiempo 4 y 24 hs, el recuento (UFC/mL) se mantiene en el mismo orden. Para la MOI50, el resultado es que aumenta un orden el recuento a las 24 hs con respecto a las 4 hs. En una relación bacteria: célula, 50:1, la velocidad de crecimiento es mayor que en la relación bacteria: célula 10:1

Para la cepa *L.reuteri* B-54, en co-cultivo con las células HeLa, el recuento es muy similar tanto para las 4 y 24 hs como para las distintas MOI estudiadas. En la MOI 10, a las 4 y 24 hs se mantiene el orden del recuento en 10^5 , y para la MOI 50 también se mantiene el orden, pero en 10^6 . Inversamente a la que sucede con la GR-1, el recuento de ambas MOI en el tiempo 24 hs es menor que para el tiempo 4 hs, sugiriendo que no solo no crece sino que entra en la fase de muerte. Para dicha cepa, no hay diferencia en la velocidad de crecimiento para cada MOI.

Se entiende dicho resultado como coherente, debido a que existe una correspondencia entre la medida de absorbancia a 595 nm y la medida de recuento UFC/mL para ambas cepas.

En base a los resultados obtenidos, para la incorporación de probióticos en el lubricante íntimo, se elegiría una relación bacteria: célula 10:1 para GR-1. La relación de 50:1 se descarta ya que en este caso, la viabilidad celular disminuye un 75% aproximadamente. En cuanto a la B54, no se puede definir una concentración óptima para utilizar en la formulación del lubricante, dado que en las condiciones de microaerofilia ensayadas, no presentó crecimiento. Esta cepa requiere de un ambiente anaeróbico para crecer. Esta reportado que el ambiente vaginal es anaeróbico, por lo que se incluiría a la cepa *L.reu* B-54 en la formulación a pesar de que en el ensayo en cuestión no haya crecido. A su vez, ambas cepas bacterianas están reportadas en ensayos clínicos por sus efectos probióticos benéficos en la microbiota vaginal (50,51).

Como perspectiva del ensayo realizado, si bien se incluyó el control de las células HeLa sin bacterias (tres pocillos por cada placa), se propone agregar otro control que corresponda a las bacterias sin co-incubación con las células y así tener otra referencia con que comparar los parámetros analizados. Además, sería interesante realizar el ensayo de co-cultivo en condiciones de anaerobiosis para evaluar el crecimiento de la cepa B-54 y que se realice con células que soporten dicha condición (52,53).

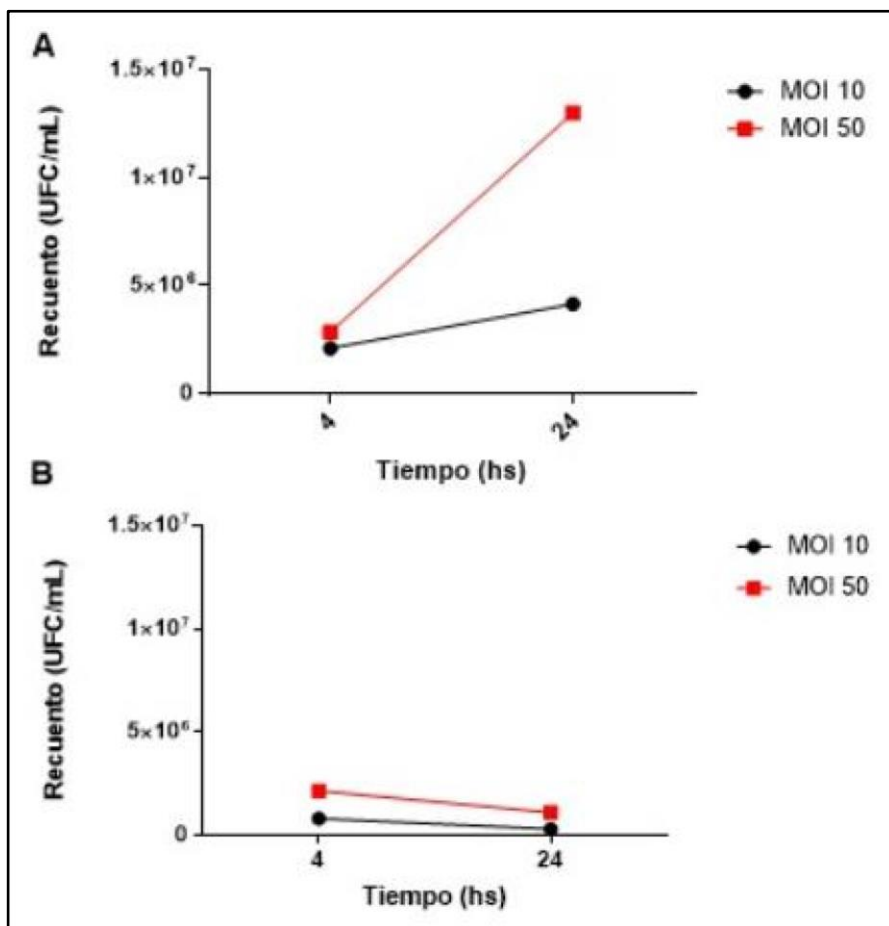


Figura 13: Gráfico de recuento (UFC/mL) en tiempo 4 y 24 hs, para cada MOI. A) *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y B) *Lactobacillus reuteri* B-54. Se visualiza un gráfico representativo de tres experimentos independientes.

4.2 Interacción de cepas probióticas con células HeLa

Para realizar una aproximación al estudio de la interacción de las cepas probióticas con las células HeLa, se realizó un ensayo de co-incubación con bacterias teñidas con CFSE y posterior análisis por citometría de flujo. Como se indica en la Figura 14, para el caso de GR1 hay un alto porcentaje de interacción (99%) y para la B-54 la interacción fue de 60%. Para identificar si la interacción es a nivel de membrana o hay internalización de las cepas, se realizó una incubación con Azul de Tripán que permite *quenchar* (apagar) la fluorescencia externa de las células. Los resultados obtenidos, aunque preliminares, sugieren que ambas cepas son internalizadas por las células HeLa (Figura 15). Se realizó un control de *quenching* de la fluorescencia de las bacterias teñidas (en ausencia de células) para confirmar que se apagara la fluorescencia en presencia del Azul de Tripán (datos no mostrados) y que el resultado

observado no fuera debido a una falla en el protocolo. Este resultado debería confirmarse realizando un nuevo ensayo de citometría y análisis de microscopía confocal.

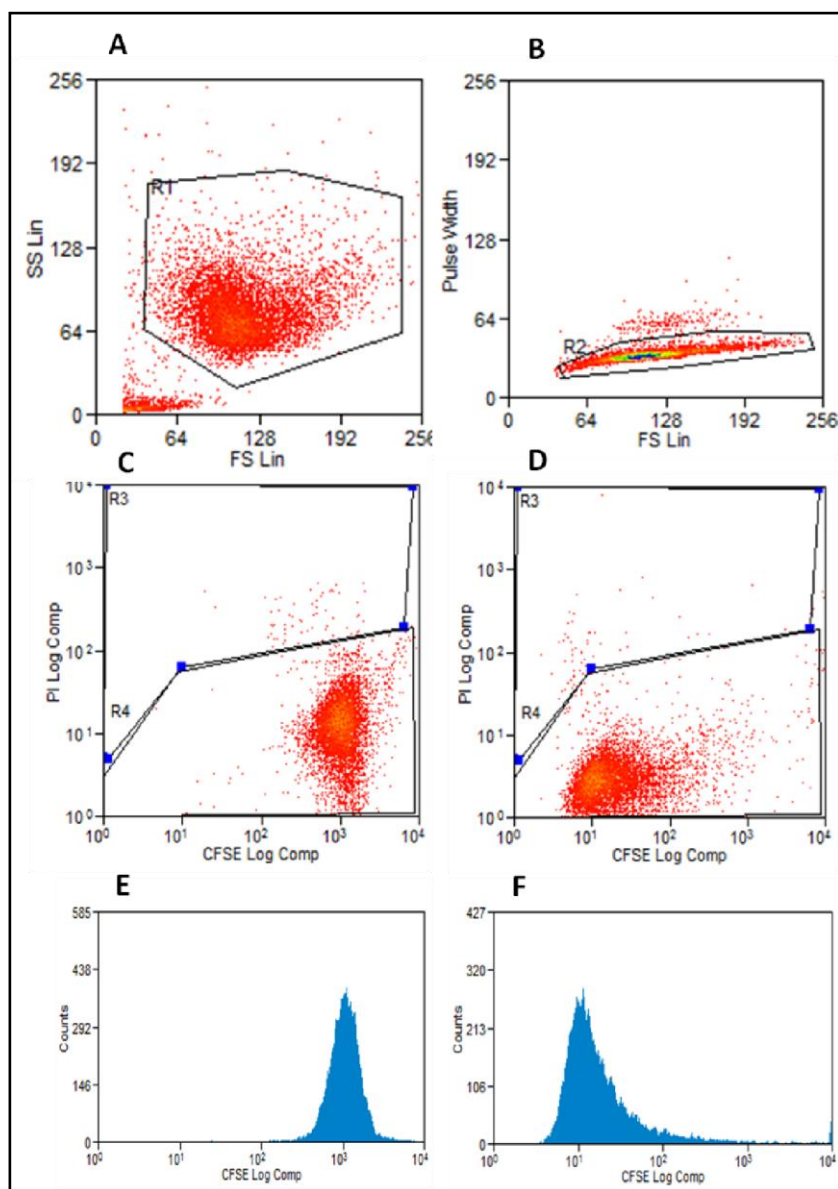


Figura 14: Gráficos de citometría de flujo de interacción de cepas probióticas con células HeLa. A) Tamaño en función de complejidad celular mostrando la región de análisis (R1). B) Ancho de pulso en función de tamaño para eliminar los acúmulos de células del análisis. C y E) Ioduro de propidio en función de CFSE e histograma CFSE para GR-1 D y F) Ioduro de propidio en función de CFSE e histograma CFSE para B-54. El análisis se realizó para la población celular ubicada en la región R1+R2.

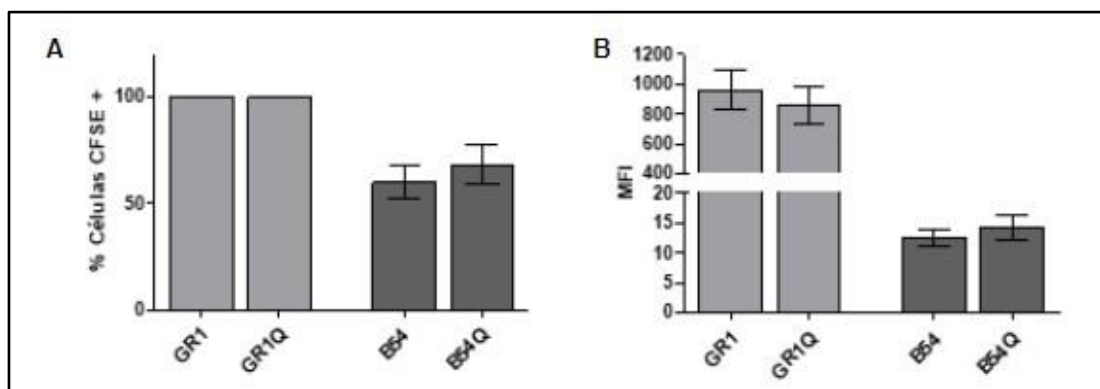


Figura 15: A) Porcentaje de células que expresa CFSE para cada cepa, se indica el nombre de la cepa y la Q corresponde a la incubación con azul de tripán. B) Mediana de la intensidad de la fluorescencia. No se ve diferencia al *quenchea*r, lo que sugiere que las bacterias fueron internalizadas.

4.3 Efecto del ácido láctico como agente bioactivo

4.3.1 Co-incubación del ácido láctico con *E.coli* y *C.albicans*

Dado que se plantea incorporar al ácido láctico como agente bioactivo en el lubricante íntimo por sus efectos benéficos que restauran el equilibrio y mantienen una microbiota vaginal saludable, se realizaron ensayos con ácido láctico en co-incubación con los patógenos más comunes en infecciones urogenitales: *E.coli* y *C.albicans*. Se utilizaron las cepas no patógenas *E.coli* (ATCC 8739) y *C.albicans* (ATCC 10231) como modelo. Además, se evaluó el efecto en células HeLa como aproximación *in vitro* de las células a la cual estaría destinado el lubricante. Las concentraciones evaluadas se seleccionaron en base a las comúnmente utilizadas en productos cosméticos comerciales, según datos reportados por bibliografía (54,55).

En cuanto al crecimiento de *E.coli* en distintas concentraciones del agente y a diferentes temperaturas de incubación, se puede inferir que a 25°C a una concentración de 10 mM de ácido láctico, éste agente no provoca ningún efecto en el crecimiento de *E.coli* dado que la absorbancia a 600 nm para dicha concentración es la misma que sin ácido láctico (control). En las mismas condiciones, a partir de 25 mM de ácido láctico ya es posible apreciar un efecto; el crecimiento bacteriano disminuye al medio respecto al control. A partir de los 50 mM hasta la concentración máxima ensayada (600 mM), el patógeno no presenta crecimiento apreciable. (Figura 16, A).

Al analizar el comportamiento del mismo microorganismo incubado a 37°C (Figura 16, B), es posible resaltar que dicha temperatura favorece el crecimiento de *E.coli* sobre los 25°C; ya que los valores de absorbancia a 600 nm son levemente mayores (aumenta 8,5% el crecimiento de *E.coli* cuando se incuba a 37°C). A dicha temperatura, el patógeno presenta un crecimiento similar para las mismas concentraciones de ácido láctico que el descrito a 25°C, aunque en este caso tanto la concentración de 10 mM como la de 25 mM no altera el crecimiento (misma absorbancia que el control), y es recién con ácido láctico a 50 mM que se empieza a detectar el efecto. Quizás esta diferencia se explique debido a que 37°C es su temperatura óptima y por ello son más resistentes al efecto del ácido láctico (necesitan concentraciones más altas para que afecte el crecimiento). Sin embargo, tanto a 37°C como a 25°C, a una concentración de 600 mM, *E.coli* disminuye su crecimiento (con respecto al control) un 95%.

Si bien la temperatura óptima de crecimiento de *C.albicans* es de 25°C, también se realizó el ensayo a 37°C debido a que es la temperatura corporal humana. No se observaron diferencias en el crecimiento a las distintas temperaturas (Figura 16, C y D). El patógeno en cuestión crece prácticamente igual que el control para las concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 150 mM. Es

con una concentración de 600 mM donde se puede visualizar la disminución de 90.7% en el crecimiento de *Cándida albicans*.

Es interesante destacar que al comparar los patógenos estudiados, *E.coli* resulta considerablemente más susceptible al ácido láctico que *C. albicans*. En el primero, se requiere menores concentraciones de ácido láctico para que se genere el efecto deseado (25-50 mM versus 600 mM).

El resultado obtenido a partir del ensayo es de gran utilidad a la hora de formular el lubricante íntimo ya que se va a contemplar emplear una concentración del agente bioactivo tal que inhiba el crecimiento de ambos patógenos. A continuación, se evalúa cual es la concentración máxima de ácido láctico que inhiba el crecimiento de dichos patógenos y que provoque el mínimo perjuicio en el crecimiento de las células HeLa.

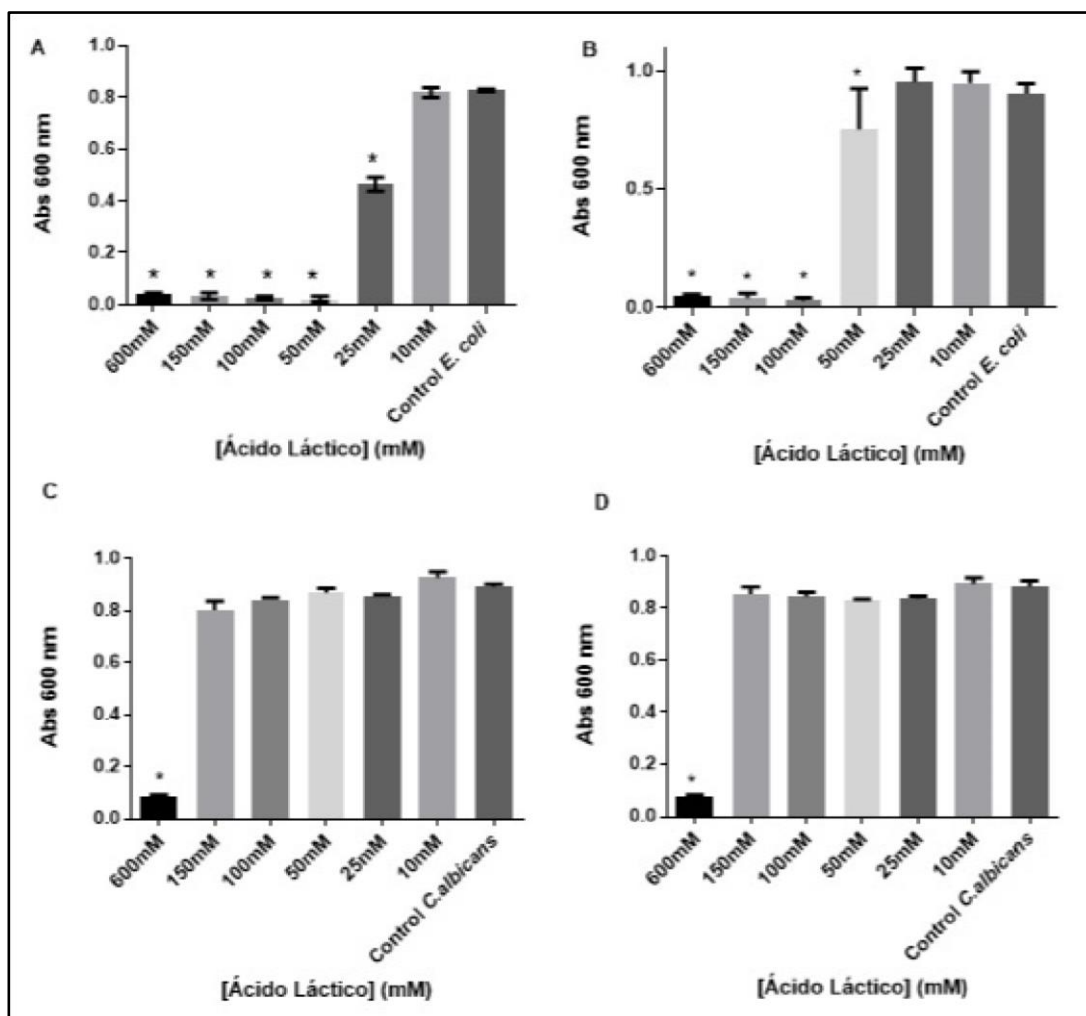


Figura 16: Efecto del ácido láctico sobre el crecimiento A y B) *E.coli* C y D) *C. albicans*. El ensayo se realizó a las temperaturas de 25°C (A y C) y 37°C (B y D) y se realizaron tres experimentos independientes, se realizaron seis réplicas de cada condición. * indica diferencia significativa (p < 0.05 respecto al control utilizando ANOVA one-way con post test de Dunnett's).

4.3.2 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa

Se evaluó la citotoxicidad de las concentraciones de ácido láctico evaluadas en la sección anterior en células HeLa.

A medida que aumenta la concentración, en general, se detecta un descenso en la absorbancia a partir de los 25 mM de ácido láctico, siendo la concentración más alta de 600 mM la que posee la menor absorbancia. A una concentración de 10 mM, no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al control, según indica el análisis estadístico ANOVA one-way con post test Dunnett's con el control. (Figura 17, A).

Se calculó la concentración que reduce a la mitad la viabilidad celular (IC50) tras 24 hs de incubación con ácido láctico y corresponde a 148mM. Esto indica que una concentración entre 100-150 mM resulta perjudicial para el crecimiento de las células HeLa, que son un aproximado del modelo *in vitro* del epitelio uterino.

La única concentración que en este caso inhibe el crecimiento de *E.coli* y *C. albicans* es la de 600 mM, según el ensayo reportado en este proyecto. Si bien dicha concentración es citotóxica para las células HeLa y disminuye su viabilidad a 45%, es importante contemplar que dichas células no tendrán contacto directo con el ácido láctico a esta concentración, debido a su ubicación en el aparato genital femenino. Sin embargo, se conoce que las células del epitelio vaginal, que son las que entrarán directamente en contacto con ácido láctico, soportan mayor acidez, por lo que se elige la incorporación en el lubricante de ácido láctico a una concentración de 600 mM (56).

Idealmente, el presente ensayo se debe realizar sobre una línea celular del epitelio vaginal.

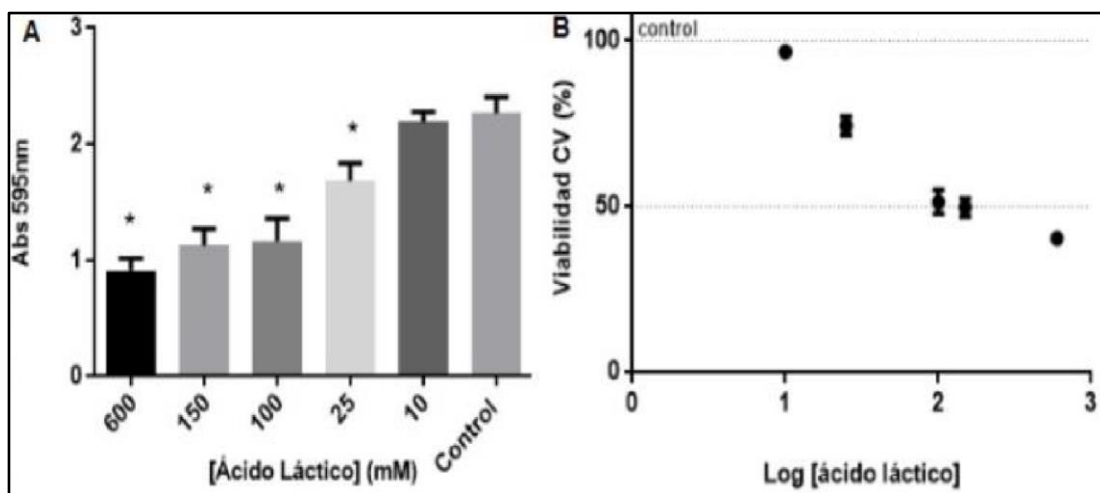


Figura 17: Efecto del ácido láctico sobre las células HeLa. A) Absorbancia a 595 nm en función de distintas concentraciones de ácido láctico B) Porcentaje de viabilidad en función del log de la concentración de ácido láctico. El IC50 se alcanza con la concentración de 148 mM. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$ respecto al control utilizando ANOVA one-way con post test de Dunnett's).

4.4 Formulación del producto

4.4.1 Microencapsulación y liofilización de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1

Con el fin de incorporar probióticos al lubricante a desarrollar, se evaluaron las técnicas de microencapsulación y liofilización de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1.

4.4.2 Microencapsulación

La microencapsulación se define como el proceso con el cual se rodea una sustancia activa con una pared porosa que la protege (57). La microencapsulación ha permitido inmovilizar bacterias probióticas en una matriz de alginato debido a la simplicidad del proceso de preparación de las

microcápsulas, su biocompatibilidad y alta retención de microorganismos. Por estas razones, la microencapsulación de probióticos ha sido investigada con la finalidad de proteger y mejorar la biodisponibilidad de los microorganismos (58).

La técnica empleada para la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 fue la emulsificación-gelificación iónica interna por goteo de una solución de alginato de sodio al 2% con bacterias sobre una solución de cloruro de calcio también al 2%.

En este caso, se trata de un producto de uso íntimo, con atributos apropiados en términos de estética, debiendo ser discreto y de una textura acorde similar a los lubricantes comerciales existentes. Por ello es que se deseaba obtener microcápsulas lo más pequeñas posible, de forma de no ser apreciables sensorialmente dentro del lubricante por lo que se esperaba obtener un tamaño menor a 1 mm. El tamaño de la boquilla de la jeringa es determinante para la variación de la forma y el tamaño de las microcápsulas obtenidas, así como la distancia de separación de la boquilla al baño (líquido solidificante), el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución, la concentración de alginato, la carga bacteriana y el tiempo de exposición al cloruro de calcio (58).

Se realizó el ensayo variando el diámetro de la boquilla de la jeringa (aguja) así como la distancia de goteo. Como resultado, utilizando la boquilla de la jeringa (5 mL) únicamente, se obtuvieron microcápsulas muy grandes de aproximadamente 1 cm, por lo que se realizó nuevamente con una aguja de 0,8 mm x 40 mm. En esta prueba preliminar, si bien se obtuvieron cápsulas regulares de forma esférica, considerablemente más pequeñas y de aspecto poroso (lo cual facilitaría la salida de probióticos hacia el exterior), el tamaño obtenido fue aún demasiado grande respecto al deseado, aproximadamente entre 3 mm y 5 mm. Debido a este motivo se descartó el método de microencapsulación por goteo para la incorporación de los probióticos y tampoco se evaluaron parámetros como la viabilidad y difusión de los microorganismos (58).



Figura 18: Cápsulas de alginato obtenidas por método de goteo. A) cápsulas grandes de aproximadamente 1 cm obtenidas con boquilla de jeringa. B y C) cápsulas de 3-5mm obtenidas con una aguja de 0,8 mm x 40 mm. Se obtuvieron capsulas de mayor tamaño al esperado.

4.4.3 Liofilización

Al igual que con la técnica de microencapsulación, se realizó la liofilización del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 para así evaluar su posible incorporación en el lubricante con el fin de mantener a los lactobacilos metabólicamente inactivos pero viables durante el almacenamiento del producto en góndola.

La liofilización es un método eficaz utilizado durante décadas para la preservación, transporte y almacenamiento de microorganismos a largo plazo. En el proceso de liofilización, inicialmente el material es congelado, causando una separación física entre el agua y los sólidos. En una segunda etapa del proceso, el hielo es removido del producto mediante conversión directa a vapor (sublimación). Luego de la eliminación de los cristales de hielo, lo que queda del producto

es una fase de soluto concentrado que se convertirá, al final del proceso, en el material liofilizado (40).

El parámetro a evaluar fue el aspecto físico del producto de liofilización final (producto seco). Para ello se observó estructura y presencia o no de material residual en el vial.

En este caso, se esperaba obtener como producto final un producto seco, uniforme, y sin material residual, que cuando se le vuelva a añadir agua o disolvente (reconstitución del vial), presente las mismas características que en su estado original. Sin embargo, los productos liofilizados no presentaron el aspecto físico deseado, debido a que mostraron espuma esparcida por el vial y además, frente al agregado de agua, no mostraron las características del estado original. Tampoco se obtuvo un producto seco y homogéneo ni una estructura compacta (torta), sino que pedazos de material distintamente distribuidos en el vial, tanto para las suspensiones bacterianas en sus respectivos lioprotectores, como para el control (solo lioprotector). Los resultados obtenidos indican que habría que seguir ajustando las condiciones de la liofilización, ya sea mediante el empleo de otros medios lioprotectores y/o distintas condiciones de programación del equipo liofilizador.

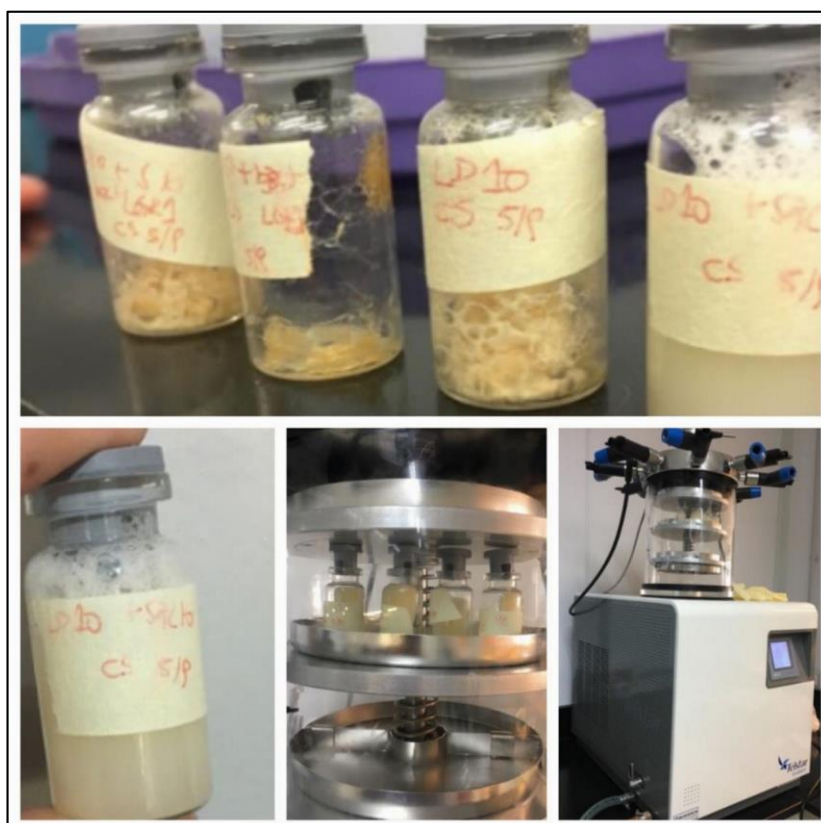


Figura 19: Imágenes del proceso de liofilización de la cepa GR-1.

Entendiendo que en el marco del proyecto se necesita obtener un producto que además de ser seguro y eficaz, sea comercializable, es decir, que cumpla con requisitos estéticos previamente determinados, así como teniendo en cuenta los aspectos económicos y logísticos (alto costo de liofilización y microencapsulación a gran escala, requerimientos de comercialización de probióticos según MSP), se decidió tras obtener resultados indeseados en la microencapsulación y la liofilización de probióticos, proceder a formular el lubricante íntimo con ácido láctico como bioactivo.

4.4.4 Formulación química

Los lactobacilos son capaces de fermentar glucógeno (producido por las células epiteliales de la mucosa vaginal) en ácido láctico. Por consiguiente, el resultado final de la vía metabólica es un pH ácido, con valores entre 3.5 y 4.5. Un pH bajo reduce el riesgo de colonización por agentes patógenos y un pH vaginal elevado es perjudicial para la supervivencia de lactobacilos (59).

Por lo tanto, dado que la acidificación local con ácido láctico o lactobacilos es útil para la restauración del ecosistema vaginal se considera en lo que respecta a la formulación, que ésta tenga pH ácido también. Asimismo, se encontraron en datos bibliográficos diferentes valores de pH en el rango de 3 a 5, utilizados en lubricantes comerciales conocidos (60).

En este caso se eligió desarrollar un lubricante con pH 3,5 a base de agua, ya que a diferencia de los que son a base de aceites o siliconas, no manchan, son fáciles de limpiar y seguros de utilizar junto con preservativos de látex.

Debido a que el agregado de aromas y sabores al lubricante favorece la reproducción de hongos y bacterias, pueden irritar fácilmente y además, que el lubricante propuesto tiene como objetivo la profilaxis, se formuló un lubricante incoloro, inodoro, discreto y de textura de tipo gel.

De acuerdo a datos bibliográficos de patentes de lubricantes comerciales, se eligió el porcentaje de composición de cada reactivo. Se prepararon dos formulaciones distintas, variando el conservante, tal como se explica en el punto 3.2.14 de metodología. El conservante a agregar debe ser compatible con los componentes de la formulación y envasado, no producir ninguna reacción de sensibilización, ser irritante o tóxico; además debe sea resistente a condiciones extremas de pH y temperatura. Al ser la fase acuosa la más susceptible de contaminación microbiana, el conservante debe ser capaz de alcanzar una concentración protectora en dicha fase, al mismo tiempo que no debe alterar las características organolépticas del producto (61).

Desde hace unos años es frecuente ver publicidad de productos "0% parabenos" o recibir consultas en la farmacia sobre productos cosméticos sin los mismos. Los parabenos son moléculas ampliamente utilizadas como conservantes en medicamentos, alimentos y productos cosméticos. Su uso es cuestionado debido a la posibilidad de que produzca efectos adversos como disruptor endócrino, lo que conlleva a otros problemas como reproductivos y/o efectos carcinógenos, y también a nivel tópico, provocando dermatitis y otros problemas. Sin embargo, no son motivo de preocupación si se usan en las concentraciones permitidas, que corresponde a un máximo del 0,8% de concentración en un producto (62). Para obtener un lubricante sin parabenos se decidió realizar una formulación alternativa, utilizando ácido benzoico como conservante.

El ácido benzoico es un conservante activo en medio ácido, generalmente por debajo de pH 5, y en algunas especies solamente por debajo de pH 4. Llega a inhibir el crecimiento de algunas especies de microorganismos con concentraciones de solamente 0,01%, pero generalmente son necesarias concentraciones superiores. Actúa inhibiendo el metabolismo del acetato y la fosforilación oxidativa. A su vez es atractivo desde el punto de vista comercial ya que es un conservante económico (63).

Se obtuvieron finalmente las formulaciones acordes a lo deseado. Es decir, con pH óptimo (ácido), consistencia de gel, que no es ni muy viscoso ni tampoco muy líquido. También, de un aspecto sensorialmente agradable; transparente, discreto e inodoro. No se observó diferencia visual entre ambas formulaciones, por lo que el hecho de variar el conservante no cambia el aspecto del lubricante.



Figura 20: Textura y color de las formulaciones realizadas (A). Se visualiza también una imagen de un gel comercial (B).

4.5 Estabilidad del producto final

Como la aplicación de productos cosméticos implica el contacto directo con el cuerpo humano, los cosméticos deben someterse a ensayos para proteger a los usuarios de contaminaciones microbiológicas y químicas, y de otros efectos tóxicos. Los ensayos de estabilidad evalúan los cambios en las características clave del producto que pueden darse durante la vida útil del producto y que podrían suponer un impacto negativo en el uso del consumidor. Los factores clave de estabilidad del producto pueden incluir el color, la textura y el olor. Los ensayos de estabilidad pueden realizarse a tiempo real, que son los que mejor imitan el uso real, pero tardan más, o bien de forma “acelerada” exponiendo los productos a altas temperaturas en periodos cortos de tiempo (64).

Para el ensayo de estabilidad, las formulaciones estériles se incubaron durante cuatro semanas, en ciclos de 24 horas a 40°C y 24 horas a 4°C (41). Se espera que durante el período de incubación y en sus distintas condiciones, el producto no muestre cambios en términos de pH, así como en aspecto, color y olor.

Como resultado del ensayo, para las dos formulaciones de lubricantes, y en las dos condiciones evaluadas (T: 40°C y 4°C), no se evidenciaron cambios en el valor de pH, el cual se mantuvo alrededor de 3.5-4.0 a lo largo del ensayo. Tampoco se apreciaron diferencias en las propiedades organolépticas. Ambas formulaciones se mantuvieron incoloras, inodoras y con la consistencia de gel moderadamente viscosa tal como lo eran en el día 1. Por tanto, es posible mencionar que ambos lubricantes son estables en los ciclos estudiados a las temperaturas indicadas y durante un mes.

4.6 Ensayo de eficacia

Se realizó el ensayo de la eficacia antimicrobiana siguiendo los lineamientos de la farmacopea USP. Se utilizaron las cinco cepas de ATCC que indica la farmacopea: *Escherichia coli* (ATCC 8739) como representante de bacilos Gram negativos fermentadores, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) debido a su patogenicidad, presencia en diferentes ambientes y por su capacidad de adaptación a varios sustratos. También se trabajó con *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) como representante de cocos Gram positivos que son patógenos y pueden presentar inconvenientes en los productos cosméticos durante el uso, también con *Candida albicans* (ATCC 10231) debido a su patogenicidad y porque representa resistencia a los conservantes y

finalmente con *Aspergillus niger* (ATCC 16404) debido a que, a menudo son agentes causales de daño a productos preservados (65).

Para este ensayo, se inocularon las dos formulaciones del producto con cada microorganismo, y se dejaron incubando a 25°C. En el día 14 y 28 se realizó el recuento en placa de cada microorganismo para determinar su concentración.

Como resultado, se puede afirmar que tanto la formulación 1 (con metilparabeno como conservante) como la formulación 2 (ácido benzoico como conservante) son eficaces ya que cumplen con el criterio de aceptación establecido por la farmacopea USP; es decir, que a los 14 días de incubación se observa para cada microorganismo testeado una reducción logarítmica de al menos dos órdenes y ningún incremento del recuento de día 14 en el día 28. No solo no hubo incremento, sino que, dependiendo del microorganismo, dicha reducción se mantuvo o continuó disminuyendo. (Tabla 10 y Figura 21)

Tabla 10: Órdenes logarítmicos reducidos del recuento en día 14 y 28 en cada microorganismo para formulación 1 y 2.

	Reducción logarítmica			
	Formulación 1		Formulación 2	
	Día 14	Día 28	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	3,1	0,0	2,2	1,1
<i>S. aureus</i>	2,4	0,0	2,1	0,1
<i>P. aeruginosa</i>	3,1	0,2	2,0	0,3
<i>C. albicans</i>	2,6	0,9	2,0	0,2
<i>A. niger</i>	2,1	1,1	2,1	0,2

El comportamiento general fue muy similar para ambas formulaciones, ya que ambos resultaron eficaces frente a la eliminación o inhibición de la proliferación para los microorganismos estudiados. Igualmente, se puede apreciar que en la formulación 2 y en el tiempo que se realizó el ensayo, los microorganismos presentaron mayor viabilidad, excepto en *S aureus* que no se observaron cambios entre las dos formulaciones. Por lo mencionado previamente, se podría inferir que el metilparabeno (formulación 1) posee mayor eficacia que el ácido benzoico para los microorganismos evaluados en estas condiciones.

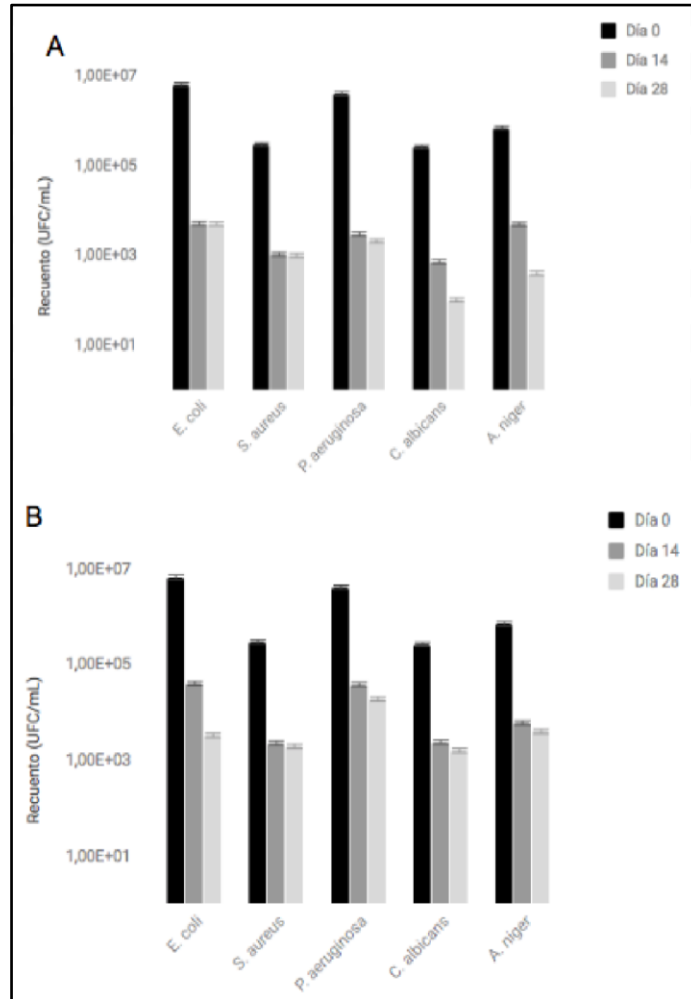


Figura 21: Ensayo de eficacia: Recuento (UFC/mL) para cada microorganismo en tiempo 0, 14 y 28 días. A) Formulación 1, B) Formulación 2. Se observa la reducción logarítmica de al menos dos órdenes en el día 14 para ambas formulaciones y ningún incremento en el día 28 con respecto al día 14.

5. Modelo de negocios

5.1 Sector del producto

El lubricante desarrollado en el marco de este proyecto pertenece al sector del cuidado e higiene íntima femenina, el cual es significativamente amplio e involucra productos tanto cosméticos como de higiene personal (jabones íntimos, geles lubricantes, etc.). El uso de dichos productos se ha puesto de moda haciendo que las industrias cosméticas se consoliden; que los institutos de belleza proliferen; y consecuentemente, que aumente la publicidad que incluye anuncios de jabones, geles de ducha, cremas, entre otros. Estos avances junto a la aparición de determinados cambios como la liberación de la mujer, y las modas que han ido surgiendo, han hecho del cuidado personal una auténtica necesidad, afectando positivamente al sector. Es por ello que es un mercado que ha crecido considerablemente en los últimos años.

Por tratarse de un sector atractivo y muy diverso, cuenta cada vez con más competidores que buscan satisfacer distintas necesidades relacionadas al cuidado e higiene personal. Cabe mencionar que los productos cosméticos son prescindibles, lo cual hace que el público interesado en el cuidado e higiene personal sea económicamente estable o al menos con necesidades básicas satisfechas.

El Ministerio de Salud Pública (MSP) juega un rol fundamental en lo que involucra a la habilitación y registro de un nuevo producto, por lo que se debe considerar las normativas vigentes y el tiempo que requieren los trámites. El MSP es un organismo que ha mostrado estar dispuesto a educar y enseñar sobre las infecciones urinarias y vaginales y su prevención mediante campañas y programas que ofrecen acerca de la salud íntima de las mujeres, brindando el servicio gratuito de consulta telefónica confidencial. El MSP ofrece a todas las usuarias de salud el derecho a ser informadas en cuanto a prevención de enfermedades de transmisión sexual, aborto en condiciones de riesgo, así como a sus opciones para una vida sexual placentera, saludable y responsable (66).

Esta disposición por parte del gobierno uruguayo a brindar apoyo a mujeres en cuanto a prevención de infecciones urogenitales y cáncer de cuello de útero se evidencia además en la LEY 17.242: (licencia especial para trabajadoras por prevención de cánceres genitomamarios), la cual da derecho a pedir día de trabajo libre con goce de sueldo para la realización de estudios pertinentes. La ley acredita también el acceso gratuito cada 3 años al PAP y a la realización de mamografía cada 2 años (67).

5.2 Dimensión del problema a nivel nacional

Según encuestas realizadas a mujeres uruguayas (n=304), un 71,4% de las mismas presentaron infecciones a lo largo de su vida. En base a este resultado y junto a datos estadísticos del INE (2011), se estima que hay 348.378 mujeres de Montevideo entre 18-70 años afectadas. A su vez, a partir de la encuesta mencionada se conoce que un 64% de mujeres se mostró altamente afectada y manifestó una gran molestia tras la aparición. También se confirmó que las relaciones íntimas son un factor altamente contribuyente a la aparición de infecciones urogenitales, tal como manifestó un 70,7% de las mujeres encuestadas (ANEXO, figura A1, A2 y A3).

Como se mencionó previamente, para el tratamiento de las infecciones urogenitales se utilizan antibióticos tanto orales como intravaginales (óvulos), los cuales, al ser la mayoría de amplio espectro, causan alteraciones en la microbiota normal vaginal, provocando un desequilibrio que incrementa el riesgo de nuevamente contraerlas, lo cual resulta en un círculo sin solución que se repite una y otra vez. Es importante recordar que la microbiota natural es de carácter fundamental para que la zona se mantenga saludable, y que el uso de antibióticos impacta

negativamente, ya que si bien eliminan los microorganismos patógenos que provocan infecciones, también eliminan las bacterias benéficas, generando un desequilibrio y por ello, mayor vulnerabilidad.

Por este motivo, y, además, por los efectos secundarios indeseados que causan, consideramos fundamental hacer énfasis en el tratamiento profiláctico.

5.3 Profilaxis

En cuanto a los productos profilácticos actuales, los más utilizados son jabones íntimos como Lactacyd, Sinabon, Hydravag, entre otros (Figura A4). A pesar de que dichos productos regulan el pH vaginal, no tienen un formato tal como para acceder directamente a la zona deseada, debido a que se aplican en la ducha y de forma superficial. También existen las cápsulas prebióticas y/o probióticas como alternativa profiláctica. En muchos casos las mismas se presentan inaccesibles por su alto costo, y, además, tampoco logran un efecto local efectivo debido al pasaje de las mismas por el sistema digestivo (orales) o resultan incómodas e imprácticas de aplicar (intravaginales).

A pesar de que existen comercialmente productos para prevenir infecciones -como los mencionados anteriormente- es importante destacar que no hay suficiente cultura ni educación sobre la prevención de las infecciones en cuestión. Sucede en la mayoría de los casos que cuando la paciente llega al consultorio ginecológico/urológico debido a que posee una infección en la zona íntima, la misma es tratada solamente con antibióticos (ya sean óvulos o antibióticos orales) para eliminar el problema a corto plazo, sin solucionarlo de raíz ni abordando la profilaxis como recurso fundamental para evitarlas. Por ello se puede decir que hay una clara ineficiencia a nivel de la información y educación acerca del cuidado e higiene íntima. Según encuestas realizadas a mujeres uruguayas (n=304), un 40,1 % nunca utilizó productos para prevenir infecciones debido a que no conocía de la existencia de los mismos. (ANEXO, Figura A5)

El tamaño del mercado existente, las intensas molestias y fuerte incidencia de las infecciones urogenitales, así como las ineficiencias actuales del tratamiento, de los productos profilácticos y la falta de educación preventiva, hacen imperativo el surgimiento de nuevas alternativas para el control de este problema.

5.4 Alternativa profiláctica propuesta

Nace la idea de un método profiláctico efectivo la cual da origen a BIOLube; un gel lubricante íntimo con ácido láctico, diseñado para prevenir infecciones urogenitales. El mismo está dirigido a todas las mujeres que hayan sufrido alguna vez dichas infecciones, así como también aquellas que desean prevenirlas.

El producto en cuestión se encuentra formulado con el ácido láctico como bioactivo, el cual es crucial para proteger la zona íntima debido a que mantiene un pH bajo que ayuda a restablecer el equilibrio y restaurar y reforzar la microbiota benéfica. En cuanto a sus características, es un gel lubricante a base de agua, por lo que es sumamente respetuoso con el cuerpo, compatible con el látex y presenta flexibilidad de uso ya que se puede utilizar tanto como lubricante en la relación íntima, así como sin expectativas sexuales en su aplicación diaria como gel post ducha.

BIOLube presenta la ventaja de acceder directamente a la zona de infección aumentando la eficacia profiláctica. Además de fortalecer la microbiota vaginal, potenciar el placer y calidad de las relaciones íntimas, resuelve problemas como sequedad vaginal, irritaciones, entre otros. Hace unos años, los lubricantes sólo se usaban en situaciones donde la lubricación natural no era suficiente, pero hoy por hoy son recomendados por ginecólogos y sexólogos para cumplir múltiples funciones.

BIOLube acompaña la filosofía de prevenir infecciones de forma natural y sostenida en el tiempo, reforzando la microbiota natural vaginal, y así disminuir el uso de antibióticos que pueden provocar efectos indeseados, así como recurrencias de las infecciones.

5.5 Objetivos del proyecto de modelo de negocios

Debido al riesgo tecnológico inherente al proyecto en cuestión, se plantea como objetivo de validación técnica la obtención del mínimo producto viable (MVP). Es decir, un gel lubricante íntimo con ácido láctico homogéneamente integrado en la formulación y en cantidades que resulten seguras y eficaces. Esto se realiza mediante ensayos de laboratorio contando con datos bibliográficos pertinentes, equipamiento y apoyo de tutores de la Universidad ORT, Uruguay. Por otro lado, otro objetivo en cuanto a la idea de negocios consiste en validar la disposición de compra de las clientas y la recomendación y aval por parte de la Sociedad Ginecitológica del Uruguay (SGU).

Tabla 11: Objetivos específicos del modelo de negocios

N.º	Objetivo Específico	Resultado esperado
1	Puesta a punto de la formulación del lubricante	Obtener la formulación óptima con ácido láctico. Gel discreto, eficaz y homogéneo.
2	Lanzamiento y pruebas piloto (pequeña escala)	Obtener un porcentaje de aprobación alto; un 40% de mujeres que prueben el producto, lo vuelvan a consumir.

5.6 Metodología de comercialización y validación

Se propone comercializar a BIOLube por cadenas de farmacias, supermercados y venta online (Mercado Libre) y su presentación será tanto en un pomo de 60 mL con un precio inicial de \$470 como en sachet de 10 mL a \$62. (Figura A6).

La producción del gel lubricante se realizará en un laboratorio con habilitación por parte del MSP, que cuente el equipamiento requerido, el cual se pretende subcontratar.

Con respecto a la validación de la idea de negocios, se considera necesario entender la reacción y opinión que merece el producto por parte de médicos; con el fin de validar si el producto contaría con aprobación y recomendación por parte de ginecólogos y urólogos. Específicamente, conocer qué registros, ensayos o documentos son necesarios para contar con el aval de Sociedad Ginecitológica del Uruguay (SGU), ya sea por parte del MSP, UNIT, u otra organización.

Contar con el apoyo de SGU es fundamental en este proyecto, por lo que se realizó una entrevista a su vicepresidente, Dr. Claudio Sosa, quien expresó su conformidad con el proyecto y afirmó que "lo recomendaría totalmente". Se espera lograr un acuerdo comercial entre ambas partes y que el envase BIOLube contenga el sello de "Avalado por Sociedad Ginecitológica del Uruguay".

5.7 Comportamiento y acercamiento a las clientas

Otro punto importante es entender el comportamiento tanto de profesionales de la salud como de sus pacientes en cuanto a costumbres preventivas y métodos básicos de higiene íntima. Mediante entrevistas a médicos (Dra. Ana Laura Pérez, internista y Dr. Carlos Acevedo, mastólogo), así como mediante charlas con algunas mujeres cercanas se pudo concluir de

forma general que no existe en Uruguay por parte de la mayoría de los médicos una atención preventiva, sino que en general se tiende a resolver el problema a corto plazo recetando los respectivos medicamentos, sin abordar la profilaxis como método sumamente importante para evitar enfermedades. Es por ello que se decidió que es de vital importancia lanzar, junto al producto, múltiples campañas informativas para educar sobre métodos de profilaxis e higiene íntima femenina, de forma de acercar la información a todas las mujeres interesadas, con el objetivo de poder, a largo plazo, incentivar a la población a adoptar una conciencia profiláctica fuerte y consolidada. (ANEXO, Figura A6)

Se pretende evaluar el comportamiento de las mujeres frente al producto en cuestión, dado que cuenta con características particulares que lo diferencian de otros productos competidores en el sector, siendo además destinado a la zona íntima y que contiene un bioactivo. Esta diferencia puede causar cierta resistencia por parte de las mujeres al uso del mismo ya sea por ignorancia hacia dicho agente, y/o por el hecho de ser un lubricante íntimo. Si bien en encuestas realizadas se manifestó gran interés (87%) (ANEXO, Figura A7) de probar un lubricante profiláctico, consideramos importante validar este resultado, mediante la creación de una página web para promocionar y dar a conocer el producto, y luego poder extraer datos de aprobación y feedback de las clientes tras su testeo.

Para registrar el lubricante en el MSP será necesario contratar a un químico farmacéutico que nos asesore y que sea responsable de firmar los documentos pertinentes para dicho fin. Es necesario mencionar que los trámites y registros realizados en el MSP pueden durar más de lo esperado y provocar que el proyecto extienda los plazos inicialmente programados; cuestión que escapa de nuestro control. Por último, se pretende contratar a una empresa productora de envases junto a un diseñador gráfico/industrial para que elabore un diseño femenino, atractivo y fácil de usar, en formato de pomo y sachet.

5.8 Análisis económico

El análisis económico que se presenta a continuación está basado en un análisis de flujo de caja proyectado en pesos uruguayos, para un período de 5 años con apertura semestral. En base al flujo de caja libre para la firma, se calcula la rentabilidad (TIR) así como el valor que crea o destruye el proyecto (VAN), para una rentabilidad requerida de 20% en pesos uruguayos.

El presente negocio supone inicialmente, un precio de venta de \$470 pesos uruguayos los 60mL contenidos en un pomo y de \$62 pesos uruguayos los 10 mL que contiene el sachet. Al finalizar los primeros cinco años, el precio del pomo será de \$544 y el del sachet \$72.

En cuanto a los ingresos, los mismos se centrarán en la venta del producto a los distintos canales de distribución (farmacias y supermercados), así como también ventas online (MercadoLibre). Nuestra propuesta de valor tiende a aumentar ingresos debido a que BIOLube se diferencia de los productos competidores actuales, permitiendo fijar un precio de venta levemente más elevado.

Dado que el primer semestre se efectúan estrategias de promociones y regalos de los sachet en un intento de capturar potenciales clientes, no se obtienen ingresos, sino más bien pérdidas.

En referencia a los costos, se alquilará un laboratorio ya instalado que cuente con el equipamiento pertinente, además, se incluyen costos de marketing, almacenamiento, recursos humanos y distribución. Esto da un valor de \$895.800 iniciales para producir 1.379 unidades en el primer año. Además, se requiere una inversión inicial de \$618.932 correspondiente a campaña inicial de marketing, diseño gráfico de prototipo y logo, y aspectos legales (solicitud de patente y registro de marca). Conforme avanza el tiempo, aumenta la participación en el mercado y por ello también se incrementa el volumen de los lotes de producción, y consecuentemente, los costos e ingresos.

El flujo de caja libre (FCFF, Tabla 12) para el presente modelo de negocios, reporta que al inicio del tercer año (semestre cinco) se recuperará el capital que se destinó en los primeros años y a su vez se comienzan a obtener las primeras ganancias las cuales se van incrementando con el paso del tiempo.

Tabla 12: Flujo de caja libre para la empresa en un período de 5 años

SEMESTRE	0	1	2	3	4	5
FCFF	- 641.833	- 357.369	- 394.748	362.469	505.544	1.016.018
SEMESTRE	6	7	8	9	10	
FCFF	1.429.444	1.533.337	2.212.772	2.614.976	29.352.687	

De la evaluación financiera surge que la rentabilidad del proyecto (TIR) para el escenario base es de 53%. Considerando que la rentabilidad requerida es de 20% en pesos uruguayos, es posible concluir que el negocio es rentable. Esto se evidencia en un valor actual neto (VAN) de 15.625.647 (Tabla 13).

Se realizó de forma complementaria, un ensayo de sensibilidad, planteado un aumento un 10% el precio, disminuyendo un 10% el precio, aumentando 15% el costo de producción, y disminuyendo al 50% la participación en el mercado. Es posible concluir que el negocio se mantiene con una rentabilidad considerablemente aceptable en los tres primeros casos, mientras que, al disminuir a la mitad la participación en el mercado, el negocio destruye valor y se presenta inviable (Tabla 13).

Tabla 13: VAN y TIR para el escenario base y de sensibilidad

	Escenario base	+10% precio	-10% precio	-50% de participación en mercado	+15% costo de producción
VAN	15.625.647	18.263.484	12.987.810	906.105	10.599.606
TIR	53%	58%	48%	15%	37%

Como conclusión, el proyecto genera valor, siendo la rentabilidad mayor a la requerida para su nivel de riesgo y, además, no presenta una sensibilidad significativa, por lo que lo consideramos un proyecto sólido y con alta probabilidad de éxito.

6. Conclusiones

- Se estableció el modelo de co-cultivo en condiciones de microaerofilia que permitirá continuar esta línea de trabajo en el Laboratorio de Biotecnología.
- En el co-cultivo de las cepas *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54 con las células HeLa, la cepa GR-1 presentó mayor crecimiento que la cepa B-54, y consecuentemente el pH del medio se acidificó debido al ácido láctico como producto de GR-1. En tanto a las células, frente a una MOI de 50:1 de GR-1, las células disminuyen su viabilidad considerablemente. Este dato resulta interesante en el caso de incorporar al lubricante *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 como agente bioactivo, ya que se debe tener en cuenta que dicha concentración resulta inapropiada debido a que podría ser peligrosa para la viabilidad celular in vivo. Sin embargo, la concentración en la cepa B-54 no sería un problema, sino que habría que replantearse si utilizar dicha cepa ya que la misma es una bacteria estrictamente anaerobia que posee dificultades para crecer en condiciones que no sean sus óptimas.
- Se evaluó la interacción de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* B-54 con células HeLa por citometría de flujo. El ensayo preliminar realizado sugiere que ambas cepas son internalizadas por las células HeLa.
- Con respecto al ácido láctico como agente bioactivo, se puede concluir que, a una concentración de 600 mM, el crecimiento de los patógenos *E.coli* y *C.albicans* disminuye un 95% y 90% respectivamente. Con respecto a las HeLa en co-incubación con ácido láctico, se calculó la IC50 correspondiente a 148 mM. Sin embargo, se decidió incorporar ácido láctico en 600 mM en la formulación del producto debido que dicha concentración es la única que inhibe el crecimiento de los dos patógenos mencionados anteriormente y que si bien es citotóxica para las HeLa, estas células no entrarían en contacto directo con el ácido láctico a esa concentración por su ubicación en el aparato genital femenino.
- En tanto a la formulación y su estabilidad, se pudo obtener mediante el apoyo de patentes encontradas en la literatura, una formulación de lubricante de aspecto similar a los lubricantes comerciales. El mismo -en sus dos versiones con distinto conservante- resultó ser tal como se esperaba, es decir: homogéneo, con textura de gel, inodoro, transparente y sumamente discreto, y se mantuvo estable en los ciclos ensayados.
- Con respecto al ensayo de eficacia de la USP, es posible concluir que el lubricante desarrollado en el marco de este proyecto -en sus dos formulaciones- es eficaz según la farmacopea de Estados Unidos para productos de categoría 2. Esto se puede afirmar ya que a los 14 días de transcurrido el ensayo hubo un descenso de al menos dos órdenes logarítmicos en el recuento de todas las cepas de microorganismos y ningún incremento en el recuento del día 28 con respecto al día 14.
- Debido a que:
 - Los resultados de las pruebas de microencapsulación y liofilización no fueron los deseados.
 - Al desarrollar el modelo de negocios se conoció que los probióticos en la legislatura uruguaya - por parte de requerimientos del MSP - entran dentro de categoría medicamentos y no de cosmético lo cual dificulta enormemente el registro y encarece el proyecto.
 - Evaluación de costos de microencapsulación y liofilización a gran escala exceden presupuesto (alto costo).

Se optó por descartar, al menos en esta instancia, a los probióticos como agentes bioactivos en el lubricante, y formular el mismo con ácido láctico. Con este último, es

posible recuperar el pH ácido de la vagina de una manera rápida y de la forma más fisiológica. A su vez, de esta manera se contribuye a generar un ambiente ácido y propicio para que lactobacilos que aún están presentes en la vagina comiencen a proliferar.

- De la evaluación financiera surge que la rentabilidad del proyecto (TIR) es de 53%. Considerando que la rentabilidad requerida es de 20% en pesos uruguayos, es posible concluir que el negocio es rentable.

7. Acciones futuras:

A continuación, se presenta una serie de acciones que se sugiere llevar a cabo para una futura continuación del presente proyecto.

1. Se propone realizar un ensayo de citotoxicidad del lubricante formulado con células del epitelio vaginal, ya que el lubricante actuaría concretamente sobre éstas. Es decir, además de evaluar el efecto citotóxico del ácido láctico sobre las células (ensayo realizado en este proyecto sobre las células HeLa), evaluar el efecto citotóxico de la formulación final del lubricante y que éste sea sobre células del epitelio vaginal.
2. Evaluar el efecto del ácido láctico y de la formulación final del lubricante con otros microorganismos patógenos asociados a infecciones urogenitales, por ejemplo, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*.
3. Evaluar incorporar prebióticos (inulina, glucógeno) a la formulación para dar valor agregado del producto.

8. Referencias Bibliográficas

1. Jiménez-Pacheco A. Probiotics as an alternative to prevent recurrent urinary tract infections in women. *Revista médica de Chile*. 2013 Jun;141(6):809–10.
2. Haya J, García-Arad Á, López De La Manzanara C, Balawi M, Haya L. Ácido Láctico y Salud Vaginal. *Revista Toko-Ginecológica práctica*. 2015 Nov
3. Alfonso E, Herrera C. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estériles para la industria láctea y cárnica. 2006 Set.
4. Álvarez-Calatayud G, Suárez E, Rodríguez JM, Pérez-Moreno J. La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutr Hosp*. 2015;32:56–61.
5. Marcelo Pradenas A. Infecciones cérvico vaginales y embarazo. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014 Nov 1;25(6):925–35.
6. Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008 Mar;26(3):160–7.
7. Haya J, González A, Anaya A, Sánchez Hipólito L, Haya L. Cinco cuestiones básicas relacionadas con el ácido láctico y otras dudas frecuentes. *Revista Toko-Ginecológica práctica*. 2015 Jun.
8. González-Chamorro F, Palacios R, Alcover J, Campos J, Borrego F, Dámaso D. La infección urinaria y su prevención. *Actas Urológicas Españolas*. 2012 Jan 1;36(1):48–53.
9. Colegio Médico del Perú. J, Sarmiento Aguilar E, Osorio-Plenge F. *Acta médica peruana*. Vol. 23, Urinary tract infection and antibiotic treatment. Colegio Médico del Perú; 1972. 26-31 p.
10. Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral. JE. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*. Vol. 28, Nutrición Hospitalaria. Jarpoy Editores; 2013. 38-41 p.
11. Valdevenito S JP. Recurrent urinary tract infection in women. *Revista chilena de infectología*. 2008 Aug;25(4):268–76.
12. Díaz A. S Probióticos y Salud. Facultad de farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2017 Feb.
13. Ervin N, De León P. Vaginosis bacteriana y amenaza de parto pretermino. *Hospital Nacional Regional de Escuintla*. 2013 Jul.
14. González Lorenzo A, Carbonell Hernández T. Bacterial vaginosis diagnosis. Clinical aspects and microbiologic studies. *Revista Médica Electrónica*. 2014;36(3):325–38.
15. Bautista-Samperio L, Ruiz-Rodríguez A. Vulvovaginitis: Etiological and Epidemiological Perspectives. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2011;13(4):139–42.
16. Marcelo Pradenas A. Genital infections and pregnancy. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014 Nov 1;25(6):925–35.

17. Camou T, Zunino P, Hortal M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Méd Urug.* 2017;33(4):277–84.
18. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. World Health Organization. 2015 Apr; [Internet] [citado 2018 Jul 28]. Obtenido desde: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf&ua=1;jsessionid=87A0E2CB0599255D2E4D06C159EAD7B8?sequence=1
19. Avendaño-Romero G, López-Malo A, Paolu E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos.* 2013 7(1), 87-96.
20. Olveira G, Molero I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición hospitalaria: Órgano oficial de la Sociedad española de nutrición parenteral y enteral,* 2007; 22(2), 26-34.
21. Ortiz Balderas M. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2006.
22. Suárez J.E. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición hospitalaria* 2013 vol. 28, p. 38-41.
23. Chase D, Goulder A, Zenhausem F, Monk B, Herbst-Kralovetz M. The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: A review of applications in etiology, symptoms and treatment. 2015.
24. Daniel Martínez-Peña M, Aguilera G, Castro-Escarpulli G. Microbiota vaginal normal: los lactobacilos. 2014.
25. Amores R, Calvo A, Maestre JR, Martínez-Hernández D. *Sociedad Española de Quimioterapia Revisión Probióticos.* Junio. 2004;17(2):131–9.
26. Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2003 Mar 20;35(2):131–4.
27. Brumfitt W, Hamilton-Miller JM, Walker S, Roberts D. Cefaclor as a prophylactic agent for recurrent urinary infections: a comparative trial with macrocrystalline nitrofurantoin. *Drugs under experimental and clinical research.* 1992;18(6):239–44.
28. Bibiloni R, Membrez M, Chou CJ. Microbiota intestinal, obesidad y diabetes. *Annales Nestlé (Ed española).* 2009;67(1):39–48.
29. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer.* 2002 Apr;2(4):315–9.
30. Petrova MI, Lievens E, Verhoeven TLA, Macklaim JM, Gloor G, Schols D, et al. The lectin-like protein 1 in *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mediates tissue-specific adherence to vaginal epithelium and inhibits urogenital pathogens. *Scientific Reports.* 2016 Dec 21;6(1):37437.
31. Calonghi N, Parolin C, Sartor G, Verardi L, Giordani B, Frisco G, et al. Interaction of vaginal *Lactobacillus* strains with HeLa cells plasma membrane. *Beneficial Microbes.* 2017 Aug 24;8(4):625–33.
32. Alex A et al. *Sexuality: salud, placer y entretenimiento. Parte Organizativo-Financiero. Economía y negocios.* Universidad de Chile; 2014.

33. Esaú López-Jácome L, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, CerónGonzález G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. 2014, vol. 3, no 1, p. 10-18
34. Coico R. Gram Staining. In: Current Protocols in Immunology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. p. A.3O.1-A.3O.2.
35. Morales-García YE, Morales-García YE, Corral-Lugo A, Pazos-Rojas LA, MartínezContreras RD, Muñoz-Rojas J, et al. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo." Revista Colombiana de Biotecnología. 2012 Jul 1;14(2):147–56.
36. Tiscornia I. Desarrollo de modelos in vitro para el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de bacterias del ácido láctico. 2010
37. Dr. Alía. Consulta de Formulación Magistral | Acofarma | Dr. Alía [Internet]. [citado 2018 Jul 19]. Disponible desde: <http://www.formulacionmagistral.org/>
38. Ahmad, N et al. Personal lubricant compositions. United States Patent US No 5,885,591. 1999 Mar 23.
39. Mary Montes Ramírez L. Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). 2013.
40. Grauer A, Grunberg K, Zardo S. Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos. Universidad ORT Uruguay; 2015.
41. ANVISA- Agencia Nacional de Vigilancia. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos - Sanitaria. 2005;1.
42. Reference Standards USP [Internet]. [citado 2018 Jul 19]. Disponible desde: <http://www.usp.org/reference-standards>
43. Vu N, Nguyen K, Kupiec TC. The essentials of United States Pharmacopeia Chapter antimicrobial effectiveness testing and its application in pharmaceutical compounding. International journal of pharmaceutical compounding. 18(2):123–30.
44. Pimentel-González DJ, Caro-Canales I, Meza-Nieto AM, Campos-Montiel R, Jaime Vernon-Carter Crecimiento de la bacteria probiótica *L. rhamnosus* en lactosuero dulce.
45. Fernando Escobar L, Andrés Rojas C, Giraldo A. Evaluation of *Lactobacillus casei* growth and production of lactic acid using as substrate the whey of bovine milk. 2010 Jun
46. Camacho LN, Torres Sáenz R. Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas *pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol. Revista ION. 2010;23:41–6.
47. Solmeqlas. HEPES - Reactivos y Tampones [Internet]. [citado 2018 Jul 19]. Disponible desde:http://www.solmeqlas.com/es/reactivos-y-tampones/312hepes.html?search_query=hepes&results=9
48. Palizban AA, Sadeghi-Aliabadi H, Abdollahpour F. Effect of cerium lanthanide on HeLa and MCF-7 cancer cell growth in the presence of transferrin. Research in pharmaceutical sciences. 2010 Jul;5(2):119–25.

49. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009 Dec;390(3):733–7.
50. Graver MA, Wade JJ. Growth and acidification by Vaginal Lactobacilli in anaerobic liquid medium over the pH range 5.5 – 8.0. *Journal of Bacteriology & Parasitology*. 2010 Oct 30;01(01).
51. Singh TP, Kaur G, Kapila S, Malik RK. Antagonistic Activity of *Lactobacillus reuteri* Strains on the adhesion characteristics of selected pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:486.
52. Plotkin BJ, Davis JW, Strizzi L, Lee P, Christoffersen-Cebi J, Kacmar J, et al. A method for the long-term cultivation of mammalian cells in the absence of oxygen: Characterization of cell replication, hypoxia-inducible factor expression and reactive oxygen species production. *Tissue and Cell*. 2018 Feb 1;50:59–68.
53. Anderson KM, Jajeh J, Guinan P, Rubenstein M. *In vitro* effects of dichloroacetate and CO₂ on hypoxic HeLa cells. *Anticancer research*. 2009 Nov;29(11):4579–88.
54. Kornhauser A, Coelho SG, Hearing VJ. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2010 Nov 24;3:135–42.
55. Babilas P, Knie U, Abels C. Cosmetic and dermatologic use of alpha hydroxy acids. 2012;(10).
56. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection and immunity*. 1999 Oct;67(10):5170–5.
57. Nava E et al. Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 2015, 23(66).
58. Castillo S.L, et al. Diseño de microcápsulas de alginato con matriz prebiótica de aloe vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. 2017;2:531–6.
59. Antonio Sánchez-Hernández J, Judith Mayta-Baldivieso M, Antonio Rivera-Tapia J, José Antonio Sánchez-Hernández C. Alteraciones del pH vaginal asociado a lactobacilos o bacilo de Döderlein Resumen. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2012;59(1):56.
60. Cunha AR, Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, das Neves J, Palmeira-de-Oliveira R. Characterization of commercially available vaginal lubricants: a safety perspective. *Pharmaceutics*. 2014 Sep 22;6(3):530–42.
61. Leranoz, S. O. N. I. A. Conservantes cosméticos. *Offarm: farmacia y sociedad*. 2002 21(7), 74-78.
62. Pérez Caro A, Ros Esparza I. Parabenos - ¿alarma o realidad? Facultad de farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2015 Jun.
63. Schmidt-Hebbel H. Avances en aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos. 1990
64. Tasici A. Evaluación de estabilidad de formulación de comprimidos. Facultad de farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 2015 Jun.

65. Palacios JA, Rubiano FM. Valoración microbiológica de un aceite ozonizado ® antibacterial y reparador mediante prueba de eficacia antimicrobiana. Revista Cubana de Farmacia. 2016 Dec 26;50(4).
66. Derechos y beneficios de usuarios del Sistema Nacional Integrado de la Salud y su correlato legal. Dirección General del SNIS-MSP. [Internet]. [citado 2018 Jul 28]. Disponible desde:
http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Derechos_y_Beneficios_y_su_correlato_legal.pdf
67. Prevención de Cáncer de cuello de útero y de mama – IMPO [Internet]. [citado 2018 Jul 19]. Disponible desde: <http://www.impo.com.uy/cancerdeuteroymamas/>

9. ANEXO



Figura A1: Porcentaje de mujeres uruguayas que han sufrido infecciones urogenitales.



Figura A2: Mujeres encuestadas que indican cuánta molestia les genera contraer infecciones urogenitales (1: mínima molestia, 5: máxima molestia).



Figura A3: Mujeres encuestadas que indican el impacto de las infecciones en la calidad de sus relaciones sexuales.



Figura A4: Productos profilácticos actuales a la venta en farmacias de Montevideo



Figura A5: Porcentaje de mujeres que utilizan o utilizaron algún producto profiláctico

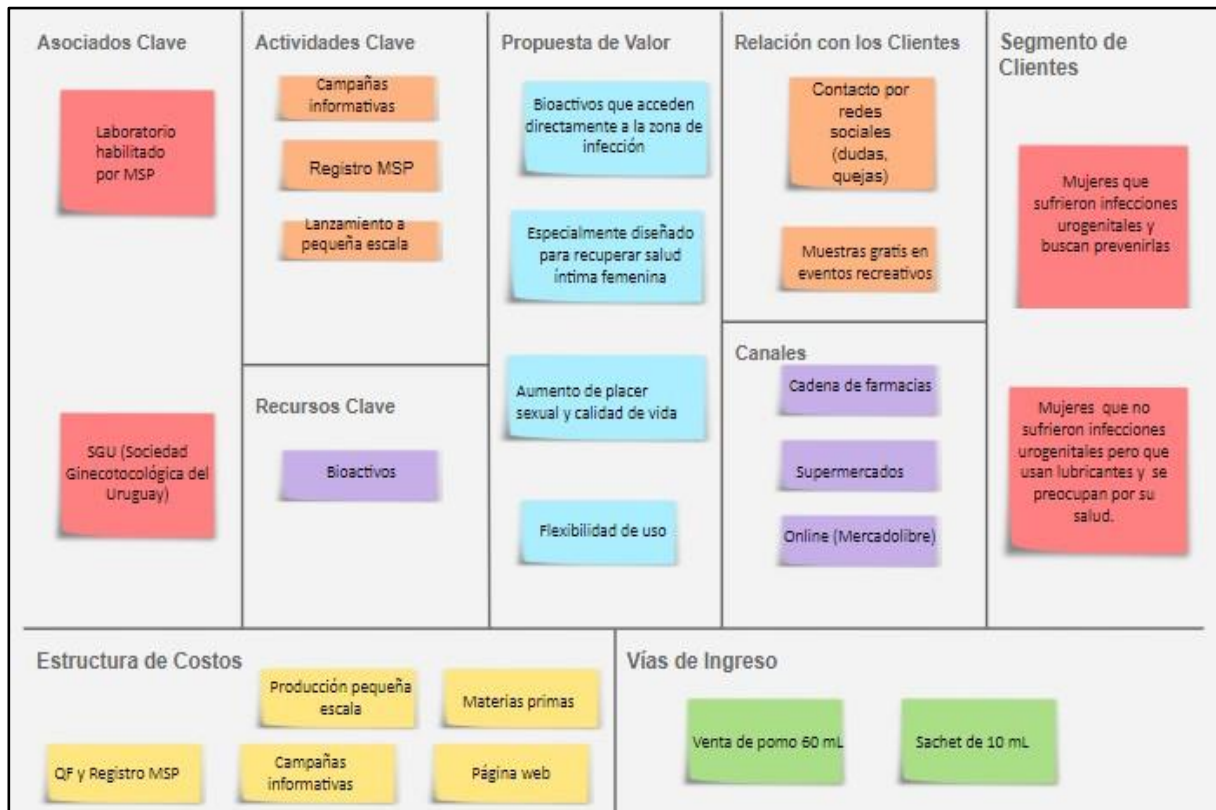


Figura A6: Modelo de negocios CANVAS

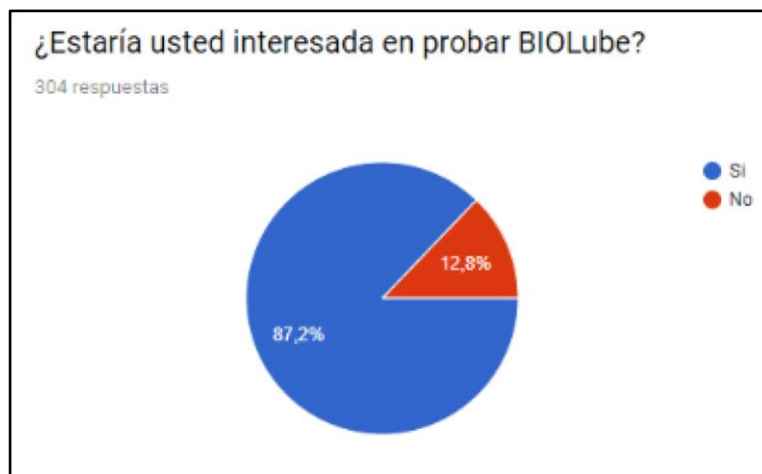


Figura A7: Mujeres interesadas en probar BIOLube

Prototipo del lubricante



Figura A8: Prototipo de BIOLube