

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 278 021**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702	(2006.01) A61K 31/715	(2006.01)
A61K 39/02	(2006.01)	
A61P 37/04	(2006.01)	
A61P 1/00	(2006.01)	
A61K 35/74	(2015.01)	
A23K 1/16	(2006.01)	
A23K 1/18	(2006.01)	
A23L 1/30	(2006.01)	
A61K 39/38	(2006.01)	
A61K 45/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2002** **PCT/EP2002/02905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2002** **WO02076471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2002** **E 02726177 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **19.12.2018** **EP 1383514**

54 Título: **Empleo de una composición que comprende un prebiótico para disminuir el proceso inflamatorio y activación anormal de parámetros inmunológicos no específicos**

30 Prioridad:

22.03.2001 EP 01201091

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
13.05.2019

73 Titular/es:

SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. (100.0%)
Case postale 353
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

ROCHAT, FLORENCE;
SCHIFFRIN, EDUARDO y
GUIGOZ, YVES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 278 021 T5

DESCRIPCIÓN

Empleo de una composición que comprende un prebiótico para disminuir el proceso inflamatorio y activación anormal de parámetros inmunológicos no específicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de por lo menos un prebiótico en la elaboración de un medicamento para la disminución del proceso inflamatorio en un humano anciano, en donde el medicamento disminuye la expresión del ARNm de la interleucina-6 en monocitos de la sangre periférica.

Antecedentes de la invención

Es bien conocido que los prebióticos contienen hidratos de carbono y más específicamente oligosacáridos. Además es conocido que han sido ampliamente empleados como ingredientes alimenticios funcionales. Resisten la hidrólisis por las enzimas del tracto digestivo humano, pueden alcanzar el colon sin estar degradados y proporcionan una sustancia hidrato carbonada particularmente adecuada para el crecimiento de las bifidobacterias. Los oligosacáridos pueden obtenerse a partir de la glucosa, galactosa, xilosa, maltosa, sucrosa, lactosa, almidón, silano, hemicelulosa, inulina, goma o una mezcla de los mismos. Productos purificados comercialmente adquiribles tales como los fructooligosacáridos contienen más de aproximadamente el 95 % de sólidos en forma de oligosacáridos.

Los fructooligosacáridos han sido estudiados en humanos principalmente para reivindicaciones funcionales relacionadas con la biodisponibilidad de minerales, metabolismo de lípidos y regulación de los hábitos del intestino (Roberfroid, M. B. Delzenne, N. M. Annu rev. Nutr 1998; 18:117-143). Poca atención ha sido dada a su efecto sobre las funciones inmunológicas, mientras que se han obtenido indicaciones sobre modificaciones de carcinogénesis y estimulación de tejido linfoide asociado al intestino, a partir de estudios sobre animales (Pierre, F., et al. Cancer Res 1997; 57:225-228).

En efecto, los fructooligosacáridos, de cadena larga (inulina) y de cadena corta (oligofructosa) están entre los hidratos de carbono que eluden la digestión en el tracto gastrointestinal superior. A continuación fermentan en el colon y estimulan selectivamente el crecimiento de las bifidobacterias.

La flora intestinal humana con su importante actividad metabólica está posiblemente asociada con muchas funciones relacionadas con la salud tales como el mantenimiento de la homeostasis del intestino, metabolismo de xenobióticos y estimulación de la inmunidad del intestino. Está influenciada por las enfermedades, dieta, estrés y posible envejecimiento. El intestino grueso contiene heces con hasta 10^{12} bacterias/gramo con aproximadamente 10^3 diferentes especies de aproximadamente 40-50 géneros de bacterias. La mayor parte de las mismas son anaeróbicas obligadas, con una gran población, sin embargo, de anaeróbicas facultativas. Las principales especies anaeróbicas son *Bacteroides*, bifidobacterias, eubacterias que completan hasta el 99 % de la flora fecal total, seguidas por clostridias, lactobacilos y cocos gram positivos, enterococos, coliformes, metanógenos, y niveles mucho más bajos de bacterias reductoras de sulfato (Hill, M. J. Normal gut bacterial flora ("Flora bacteriana normal del intestino"). 1995;3-17).

Las características de la microflora de un adulto están presentes desde aproximadamente los 2 años de edad. La microflora del intestino adulto parece ser más bien estable; aunque se ha informado de algunos cambios con el envejecimiento, principalmente bajos niveles de bifidobacterias y *Bacteroides* (Hopkins, M. J., et al. Gut ("Intestino"), 2001;48:198-205). La flora del intestino puede dividirse en especies que tienen efectos beneficiosos, tales como las bifidobacterias, o efectos perjudiciales tales como la *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Proteus*, estafilococos, algunas clostridias y *Veilonellae*, y especies que son de efectos intermedios tales como los enterococos, *Escherichia coli*, Enterococos y *Bacteroides*. Se ha informado que las bifidobacterias y los lactobacilos tienen efectos beneficiosos sobre funciones inmunológicas específicas (Schiffrin, E. J., et al., J. Dairy Sci 1995; 78:491.497).

Se informa que con la edad las bifidobacterias disminuyen generalmente, mientras que el *Clostridium perfringens*, *Enterococci* y *Enterobacteriaceae* aumentan (Mitsuoka, T. Hayakawa, K. Zentralbl Bakteri [Orig A] 1973; 223:333-342). Con más frecuencia en las personas ancianas, tiene lugar un supercrecimiento bacteriano debido a la alta prevalencia de una gastritis atrófica e hipoclorhidria. El supercrecimiento bacteriano parece estar libre de síntomas clínicos en las personas mayores saludables, y puede tener alguna importancia en ancianos de salud frágil ≥ 75 años de edad, y la diarrea asociada al *Clostridium difficile* es más frecuente en las personas ancianas con cuidados de carácter agudo o cuidados a largo plazo, en asociación con tratamiento antibiótico y posiblemente una menor respuesta inmunológica. El envejecimiento se relaciona con una pérdida de la función inmunológica y la existencia de una interrelación entre nutrición y función inmunológica ha sido reconocida (Meydani, S. N. Status of Nutritional Immunology Studies: J Nutr Immunol 1994; 2:93-97).

Los cambios en la respuesta inmunológica (remodelación de la producción de citocinas y disregulación de las funciones inmunológicas) se asocian con una mayor incidencia de las infecciones y mortalidad ligadas a la infección.

Las intervenciones nutritivas, principalmente suplementos de vitaminas y minerales, pueden mejorar la respuesta inmunológica en personas ancianas de frágil salud [Lesourd, B. M., *Am. Clin. Nutr.* 1997; 66:478S-484S 41].

La presente invención reivindica el desarrollo de otra composición capaz de limitar la disregulación de la función inmunológica y más particularmente la anormal activación de la respuesta inmunológica no específica tal como los fagocitos y el sistema de células monocitos macrófagas así como también preservar las subpoblaciones de linfocitos con un nivel normal de activación.

Resumen de la invención

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el empleo de por lo menos un prebiótico en la elaboración de un medicamento para disminuir un proceso inflamatorio en un humano anciano, en donde el medicamento disminuye la expresión del ARNm de la interleucina-6 en monocitos de la sangre periférica.

Particularmente, puede pretenderse por ejemplo, la disminución de la anormal activación de los fagocitos.

Se ha descubierto sorprendentemente que un suplemento prebiótico puede inducir una disminución del proceso inflamatorio, y particularmente puede inducir cambios en la inmunidad no específica, tales como una disminución en la actividad fagocitaria, así como también una disminución de la expresión del ARNm de la interleucina-6, en monocitos de la sangre periférica.

Una ventaja de la presente invención consiste en que se proporciona una disminución del proceso inflamatorio, particularmente una disminución de la expresión de ARNm de la interleucina-6, en células mononucleares de la sangre periférica.

Otra ventaja de la presente invención es que proporciona una disminución de la actividad fagocitaria de los granulocitos y monocitos, particularmente en pacientes de salud delicada con una situación inflamatoria crónica.

Todavía otra ventaja de la presente invención consiste en que puede emplearse para mejorar la situación inflamatoria en un mamífero y así reducir el riesgo del desarrollo de infecciones perjudiciales, mediante el simple consumo de una composición como se describe en el presente documento. Debe tenerse en cuenta que la administración intravenosa o subcutánea de un fármaco requiere experiencia, y comparada con la administración oral no es tan segura, conveniente o aceptable por el paciente. A la luz de estas consideraciones, la invención proporciona la clara ventaja de un producto nutritivo y/o terapéutico que puede ser administrado oralmente.

Descripción detallada

La composición comprende por lo menos un prebiótico o una mezcla de prebióticos.

De preferencia, el prebiótico comprende un oligosacárido producido a partir de glucosa, galactosa, xilosa, maltosa, sucrosa, lactosa, almidón, xilano, hemicelulosa, inulina, goma (por ejemplo goma acacia) o una mezcla de los mismos. Con más preferencia, el oligosacárido comprende fructooligosacárido (FOS). Con mayor preferencia, el prebiótico comprende una mezcla de fructooligosacárido e inulina. De preferencia, esta mezcla comprende PREBIO1® o una mezcla de RAFTILOSE® y RAFTILINE® que pueden adquirirse comercialmente.

De preferencia, el prebiótico comprende aproximadamente desde un 50 % hasta aproximadamente un 95 % de FOS. Con mayor preferencia, comprende desde aproximadamente un 60 % hasta aproximadamente un 80 % de FOS. Con la mayor preferencia, comprende aproximadamente un 70 % de FOS.

De preferencia, el prebiótico comprende aproximadamente desde un 10 % hasta aproximadamente un 50 % de inulina. Con mayor preferencia, comprende desde aproximadamente un 20 % hasta aproximadamente un 40 % de inulina. Con la mayor preferencia, comprende aproximadamente un 30 % de inulina.

El prebiótico puede comprender una mezcla de fructooligosacáridos e inulina en las cantidades en peso de 70 % de fructooligosacáridos y 30 % de inulina.

De preferencia, la composición comprende un probiótico además del prebiótico. El probiótico puede ser el *Bifidobacterium bifidum* o el *Streptococcus thermophilus*, por ejemplo. De preferencia, el *Bifidobacterium bifidum* es el *Bifidobacterium lactis*.

En una versión, la composición puede ser un alimento completo y nutricionalmente equilibrado. Puede ser también un suplemento de la dieta, por ejemplo. Va dirigido a los humanos ancianos.

En una versión, se prepara una composición para consumo humano. Esta composición puede ser una fórmula nutritiva completa, un producto dietético, una bebida congelada o autoestable, una sopa, un suplemento dietético, un sustituto de comida, y una barra nutritiva o un dulce.

Aparte del prebiótico, la fórmula nutritiva puede contener una fuente de proteínas. Las proteínas de la dieta se emplean de preferencia como una fuente de proteína. Las proteínas de la dieta pueden ser cualquier proteína adecuada para la dieta; por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas lácticas, proteínas cárnicas y proteínas del huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o combinación de los mismos. Son particularmente preferidas, las proteínas lácteas tales como la caseína, proteínas de suero de leche de vaca y proteínas de soja. La composición puede también contener una fuente de hidratos de carbono y una fuente de grasas.

Si la fórmula nutritiva incluye una fuente de grasas, dicha fuente de grasas aporta de referencia desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 55 % de la energía de la fórmula nutritiva; por ejemplo desde aproximadamente un 20 % hasta aproximadamente un 50 % de la energía. Los lípidos que completan la fuente de grasa pueden ser cualquier grasa adecuada o una mezcla de grasas. Las grasas vegetales son particularmente adecuadas; por ejemplo, el aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de cártamo, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de canola, lecitinas y similares. Las grasas animales tales como las grasas lácteas pueden también añadirse, si se desea.

Puede también añadirse una fuente de hidratos de carbono a la fórmula nutritiva. De preferencia, proporciona desde aproximadamente un 40 % hasta aproximadamente un 80 % de la energía de la composición nutritiva. Pueden emplearse cualesquiera hidratos de carbono adecuados, por ejemplo sucrosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, y maltodextrinas, y mezclas de los mismos. Si se desea, pueden también añadirse fibras dietéticas. Si se emplean dichas fibras, comprenden de preferencia hasta aproximadamente 5 % de la energía de la fórmula nutritiva. La fibra dietética puede ser de cualquier origen adecuado, incluyendo por ejemplo, la soja, guisantes, avena, pectina, goma guar, goma arábica y fructooligosacáridos. Pueden incluirse vitaminas y minerales adecuados en la fórmula nutritiva en una cantidad para satisfacer las directrices apropiadas.

Si se desea, pueden incorporarse a la fórmula nutritiva, uno o más emulsionantes de calidad alimenticia; por ejemplo los ésteres del ácido diacetil tartárico de mono y di-glicéridos, lecitina y mono y di-glicéridos. De manera similar, pueden incluirse sales y estabilizadores adecuados.

La fórmula nutritiva se administra de preferencia, entéricamente; por ejemplo, en forma de un polvo, comprimido, cápsula, un concentrado líquido, un producto sólido o una bebida lista para beber. Si se desea producir una fórmula nutritiva en polvo, la mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado adecuado tal como un secador por pulverización o un secador por congelación y se convierte en un polvo.

En otra versión, una composición nutritiva comprende un cereal a base de leche juntamente con una formulación prebiótica. De preferencia el cereal a base de leche es un cereal para niños el cual actúa como un soporte para la formulación prebiótica.

En otra versión, un producto alimenticio habitual puede enriquecerse por lo menos con un prebiótico. Por ejemplo, una leche fermentada, un yogur, un queso fresco, una leche cuajada, un artículo de dulcería, por ejemplo un dulce o bebida dulce, una barra de un dulce, copos o barras de cereal para desayuno, bebidas, polvos de leche, productos a base de soja, productos sin leche fermentada o suplementos nutricionales para nutrición clínica. Entonces, la cantidad de la composición añadida es de preferencia por lo menos aproximadamente 0,01 % en peso. Los porcentajes y partes están expresados en peso a no ser que se indique otra cosa. Los ejemplos están precedidos de una breve descripción de las figuras.

Figura 1: Efecto de la adición de 8 g de fructo-oligosacáridos (FOS) de cadena corta sobre cuentas viables de bifidobacterias en muestras fecales frescas de una residencia geriátrica. Los puntos del tiempo fueron, antes (2), durante (3), y después (4), del período de 3 semanas de ingestión del FOS. (A) valores individuales. (B) gráficas de cajetines. Los cajetines indican los percentiles 25th y 75th, las líneas continuas dentro del cajetín indican los valores de la mediana, y los percentiles 5th y 95th de las formas t; el punto continuo indica un valor apartado.

Figura 2: Efecto de los fructooligosacáridos (FOS) sobre las bifidobacterias en adultos y ancianos. Referencia 24 (Bouhnik Y et al. J Nutr 1999; 129:113) respuesta a la dosis de 2,5 a 20 g de FOS/día en adultos de 18-47 años de edad; referencia 25 (Menne E et al. J Nutr 2000; 130:1197) respuesta a 8 g de FOS/día en adultos de 20-50 años de edad; referencia 26 (Gibson GR J Nutr 1999; 129:1438S) respuesta a 15 g de FOS/día en adultos jóvenes; referencia 27 (Kruse HP et al. Brit J Nutr 1999; 82:375) respuesta a la inulina hasta 34 g/día en adultos de 26-53 años; referencia 28 (Kleessen B et al. Am J Clin Nutr 1997; 65:1397) respuesta a 20 g de FOS/día en individuos ancianos estreñidos de 68-89 años de edad; Estudio actual: respuesta a 8 g de FOS/día en individuos de una residencia de ancianos de 77-91 años de edad.

Figura 3; Diferencias en la expresión de IL-6 ARNm en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de personas ancianas, suplementadas con FOS. La expresión de IL-6 ARNm en PBMC se midió mediante transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La estimación de los cambios cuantitativos se hizo escaneando la intensidad de las bandas empleando el programa NIH-image, y se calculó como ratio de la densidad de IL-6 ARNm y β -actin ARNm en tanto por ciento. Los puntos del tiempo fueron antes

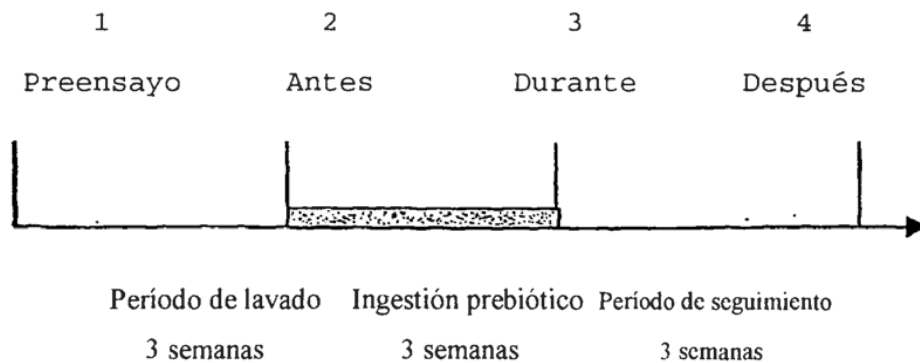
(2), durante (3) y después (4) del período de 3 semanas de ingestión de FOS. (A) imagen representativa de los cambios individuales de geles pulverizados con bromuro de etidio. (B) estimación cuantitativa de la expresión de IL-6 ARNm: los cambios en la IL-6 ARNm durante las ingestiones de FOS son significativamente diferentes de las ingestiones antes del FOS ($p = 0,018$).

Ejemplo 1: Efectos de los oligosacáridos sobre la flora fecal y el sistema inmunológico no-específico en personas ancianas

Materiales y métodos

DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio consistió en un estudio preensayo/postensayo de 19 pacientes ancianos de una residencia geriátrica (ver esquema del estudio).



La medición del peso corporal y la recogida de muestras de heces, sangre y orina se hizo en el punto de tiempo 1 (preensayo o al principio del período de lavado), 2 (antes de la ingesta del prebiótico), 3 (durante la ingesta del prebiótico), y 4 (después del período de seguimiento).

Durante todo el estudio, se restringió la ingesta de productos lácteos fermentados y se limitaron los alimentos que contienen fructooligosacáridos (cebollas, puerros, raíces de achicoria).

INDIVIDUOS

Para el estudio, fueron reclutados diecinueve individuos ancianos de una residencia geriátrica. Los individuos que satisfacían uno o más de los siguientes criterios fueron excluidos de participar en el estudio:

- Tratamiento antibiótico en el mes anterior
- Transtorno intestinal crónico
- Régimen dietético particular (es decir, vegetariano)
- Diagnóstico de cáncer gastrointestinal
- Presencia de flatulencia

Se obtuvo la aprobación del comité ético de la institución. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito, de todos los individuos. El estudio se efectuó en una residencia geriátrica local, Le Mont-Pèlerin de Suiza.

ESTADO NUTRICIONAL

Al principio del estudio, se evaluó el estado nutricional mediante el ensayo Mini Nutritional Assessment ("Minidictamen nutricional") (MNA) en el cual se incluyen los siguientes apartados: medidas antropométricas (circunferencia de la pantorrilla y brazo, altura, peso y pérdida de peso), dictámenes generales (estilo de vida, medicaciones, movilidad) cuestionarios dietéticos (número de comidas, ingesta de fluidos y alimentos, autonomía de alimentación), y dictámenes subjetivos (autopercepción de la salud y nutrición) [Guigoz, Y., et al. *Nutr Rev* 1996; 54: p59-p65]. MNA clasificó el estado nutricional de los ancianos empleando una escala de 30 puntos: MNA ≥ 24 = bien nutridos, MNA 17 – 23,5 = con riesgo de desnutrición y MNA < 17 = desnutridos.

SUPLEMENTO PREBIÓTICO

Se administraron ocho gramos de fructooligosacáridos (FOS) de cadena corta, por día, como sigue: se incorporaron dos veces por día 4 g de FOS en polvo (Actilight 950P, Béghin-Meiji industries, Neuilly-sur-Seine, Francia), en un plato

a la vez que la comida, por las enfermeras. Para la estimación de la complacencia, se registró por las enfermeras, el consumo diario de suplemento, sobre una hoja de registro diario.

INVESTIGACIÓN MICROBIANA

Se contaron las poblaciones endógenas de *Lactobacilos*, *Bacteroides*, Enterobacteriáceas, Enterococos, Bifidobacterias y *Clostridium perfringens*.

Se recogieron muestras de heces los días 0, 21, 42 y 63 de cada individuo. Las muestras de heces se colocaron inmediatamente (dentro de 30 minutos) en un frasco anaeróbico y se mantuvo a 4°C hasta efectuar el análisis (un máximo de 6 horas). Se efectuó una serie de diluciones de cien veces en solución Ringer prerreducida conteniendo 0,5 % de cisteína, de -2 a -8. Se inocularon cápsulas de Petri de varios medios y se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera anaeróbica empleando Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemania), excepto para *Enterococci* y *Enterobacteriaceae* incubados durante 24 horas a 37°C en atmósfera aeróbica. Las bacterias fueron detectadas en medios selectivos o semi-selectivos, como sigue: *Enterobacteriaceae* en medio Drigalski (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia), *Bifidobacteria* en Eugon Tomato (Waldsworth Anaerobic Bacteriology Manual, V. Suter, D. Citron y S. Finegold, Tercera Edición), *Lactobacilli* en MRS (Difco, MI. USA) con antibióticos (fosfomicina (79,5 mg/litro) + sulfametoxazol (0,93 mg/litro) + trimetoprima (5 mg/litro)), *Clostridium perfringens* sobre agar NN (Lowbury y Lilly, 1995), *Bacteroides* sobre medio Schaedler Neo-Vanco (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia), y *Enterococci* sobre agar de Azida (Difco).

Después de la incubación, se contaron las colonias y a continuación se identificaron en caso necesario. Las cepas de *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* se identificaron con un microscopio y bioquímicamente empleando el sistema API gallery (BioMérieux), API 50 CHL gallery para *Lactobacilli*, y API ID 32A gallery para *Bifidobacteria* respectivamente. Los contajes bacterianos se expresaron como el log₁₀ de las unidades formadoras de colonias (CFUs) por gramo de muestra fecal fresca, con un límite de detección de 3,30 cfu/g.

pH FECAL

Se midió el pH fecal inmediatamente después de la defecación, por la enfermera, en tres diferentes puntos de las heces crudas con un microelectrodo (Orion). Se calculó el pH medio para cada uno de los puntos del tiempo.

MUESTREO DE LA SANGRE

Se extrajeron muestras de sangre en ayunas antes del principio del estudio (4 ml) y en los días 0, 21, 42 y 63 (23 ml), de cada individuo. La sangre se extrajo por la mañana (antes de las 10.00) después de una noche en ayunas. Las muestras se recogieron en tubos "vacutainer". Se recogieron 13 ml en un tubo heparinizado y 10 ml se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Muestras de suero se guardaron congeladas a -70°C hasta el análisis. La sangre heparinizada se empleó para los parámetros inmunológicos funcionales (fagocitosis, ver más adelante) y hematología.

ANÁLISIS INMUNOLÓGICO

Se analizaron las poblaciones de células mononucleares de la sangre periférica y su actividad fagocítica, en muestras frescas de sangre heparinizada empleando Simulset y Pagotest (Becton Dickinson, Basilea, Suiza).

Análisis de la expresión de interleucina-6 ARNm mediante PCR. El análisis de la expresión del ARNm en las células mononucleares de la sangre periférica se evaluó mediante PCR, de acuerdo con el método descrito por Delneste, Y., et al., (*Nutr Rev* 1998; 56; P93-P98). Las secuencias de los cebadores fueron:

5'-CTGCAGGAAGTGGATCAGGACTTTTGTACT-3' y
5'-GCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGG-3' para la interleucina-6 (IL-6) y
5'-CGTTTCCCGCTCGCCGTGGTGGTGAAGC-3' y
5'-GGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATC-3' para la β -actina.

MEDICIONES BIOQUÍMICAS

Se analizaron las concentraciones de albúmina del suero, transtiretina (prealbúmina), proteína C-reactiva y ácido α_1 -glicoproteína, mediante inmuno-nefelometría con un nefelómetro Behring (métodos y reactivos de Behring, Margburg, Alemania). Las concentraciones de suero folato y vitamina B₁₂ (cobalamina) se analizaron mediante un radioinmunoensayo (Dual Count, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, California, USA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una muestra del test t o del test Wilcoxon signed-rank ("de rango señalado") fueron computadas sobre las diferencias medias para evaluar la significancia estadística al nivel 0,05 % para la hipótesis principal: ¿Existe un

efecto de los prebióticos sobre los diferentes parámetros medidos?. Se computó además, un test t de una muestra sobre las diferencias medias para evaluar la significancia estadística al nivel 0,025 % (corrección por la pérdida del grado de libertad) para las dos preguntas en relación con el diseño del estudio, el cual incluía los períodos previos y posteriores al test. ¿Existe un efecto de interrupción de la leche fermentada (= período de lavado) sobre los diferentes parámetros medidos? ¿Existe un efecto de interrupción de los prebióticos (= período de seguimiento) sobre los diferentes parámetros medidos? Todos los análisis estadísticos se efectuaron empleando el programa de software estadístico NCSS 6.0.22.

Resultados

INDIVIDUOS

Los 19 individuos, 4 hombres y 15 mujeres, tenían una edad media de $85 \pm 6,0$ años (77 – 97 años de edad). Las mujeres fueron significativamente de menor peso que los hombres. Las características de los individuos al principio del estudio vienen dadas en la tabla 1:

Tabla 1: Características de los individuos

Hombres n = 4		Media	95 % de intervalo de confianza	Intervalo	
				mínimo	máximo
Edad	[año]	84	5,7	77	91
Peso corporal	[kg]	72,1	13,8	60,4	92,4
BMI	[kg/mE2]	27,5	5,5	23,4	35,7
Puntuación MNA	[puntos]	27,0	2,9	24,0	30,0
Albúmina	[gramos/litro]	36,3	1,7	31,1	40,9
Transtiretina	[gramos/litro]	0,23	0,04	0,17	0,28
α 1-ácido glicoproteína	[gramos/litro]	0,98	0,16	0,82	1,20
Proteína C-reactiva	[miligramos/litro]	15	12	3	28
Colesterol	[mmoles/litro]	4,23	1,26	2,92	6,00
Triglicéridos	[mmoles/litro]	1,39	0,59	0,65	1,99
Fosfolípidos	[mmoles/litro]	2,10	0,51	1,52	2,78
Mujeres n = 15		Media	95 % de intervalo de confianza	Intervalo	
				mínimo	máximo
Edad	[año]	85	3,1	77	97
Peso corporal	[kg]	57,5	5,8	39,7	80,0
BMI	[kg/mE2]	25,7	1,7	17,5	30,7
Puntuación MNA	[puntos]	23,9	1,4	17,0	28,0
Albúmina	[gramos/litro]	36,8	1,7	31,1	42,7
Transtiretina	[gramos/litro]	0,22	0,02	0,15	0,23
α 1-ácido glicoproteína	[gramos/litro]	0,85	0,10	0,56	1,19
Proteína C-reactiva	[miligramos/litro]	5	2	1	15
Colesterol	[mmoles/litro]	5,72	0,56	3,81	7,69
Triglicéridos	[mmoles/litro]	1,51	0,23	1,11	2,55
Fosfolípidos	[mmoles/litro]	2,55	0,18	2,03	3,21

Solamente un individuo resultó desnutrido, las 7 mujeres al borde de la desnutrición estuvieron en el intervalo superior de puntuación 21,5 – 23, y la puntuación MNA media fue en el intervalo de bien nutridos: $24,6 \pm 3,0$ puntos.

La albúmina de suero (intervalo normal 35 – 55 g/litro) y la transtiretina (prealbúmina: intervalo normal 0,16 – 0,40) estuvieron en el intervalo normal más bajo, mientras que las proteínas de fase aguda, α 1-ácido glicoproteína (intervalo normal 0,5 – 1,3) y proteína C-reactiva (valores normales < 10 mg/litro y valores anormales para ancianos > 20 mg/litro) indicaron ninguna presencia de un proceso inflamatorio, excepto para 2 hombres (elevados niveles de proteína C-reactiva) y 2 mujeres (bajos niveles de albúmina con transtiretina normal y proteína C-reactiva dudosa). Estos resultados sugieren un grupo de ancianos que estaban todavía bien nutridos pero más bien de frágil salud.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO Y pH FECAL

Fueron aumentados los contajes bacterianos de bifidobacterias a una media de $2,8 \pm 0,57 \log_{10}$ CFU durante las 3 semanas de suplementación con FOS ($p < 0,001$), pero las cuentas de *Bacteroides* fueron también aumentadas ($p < 0,032$) (ver tablas 2a & 2b y figura 1).

Tabla 2a: Efecto de la administración de FOS sobre la flora fecal y el pH

Fecal variable	Pre-test		Antes		Durante		Después	
	Administración de fructooligosacáridos (8 g/día)							
	media	95%CI	media	95%CI	media	95%CI	media	95 %CI
	log ₁₀ CFU/g de heces							
Enterobacteriaceae	7,7	0,6	7,2	0,8	7,1	0,9	8,0	0,7
Enterococci	6,1	0,8	5,7	0,9	5,4	0,8	6,2	0,9
Bifidobacteria	6,0	1,1	5,6	1,2	8,4	1,0	7,3	1,2
Lactobacilli	5,1	0,6	5,1	0,6	5,7	1,0	5,1	0,7
Bacteroides	8,8	0,3	8,6	0,3	9,3	0,3	9,8	0,3
Clostridium perfringens	3,5	0,2	3,7	0,5	3,7	0,5	3,5	0,4
	pH							
pH	7,1	0,2	6,9	0,2	7,0	0,2	7,0	0,2
95 % CI = ± 95 % del intervalo de confianza								

Los contajes bacterianos para *Enterobacteriaceae*, *Enterococci* y *Lactobacilli*, no resultaron significativamente afectados por la supresión de los productos de leche fermentada y/o la ingestión de fructooligosacáridos (FOS). En cambio, para las bifidobacterias el efecto parece ser una respuesta específica a la ingestión de FOS, de manera que los contajes de bifidobacterias resultaron aumentados principalmente para individuos que mostraron un log₁₀ CFU inferior a 7, antes de empezar con el FOS. La supresión del suplemento de FOS disminuye significativamente las cuentas de las bifidobacterias a $1,1 \pm 0,39$ log₁₀ CFU, pero no al nivel de partida (tablas 2a & 2b y figura 1). En la figura 2 los cambios en bifidobacterias obtenidos en este estudio se comparan con los estudios previos, dando por resultado que los ancianos son por lo menos tan sensibles al efecto del FOS como los adultos más jóvenes. Ni la supresión de los productos de leche fermentada ni la ingestión de FOS cambió el pH de las heces (tabla 2a).

INMUNIDAD NO-ESPECIFICA

La ingestión de FOS dio como resultado un significativo aumento del porcentaje de linfocitos T periféricos así como de los subconjuntos de linfocitos, células T, CD4+, CD8+ (tablas 3a & 3b). El número total de células sanguíneas blancas, linfocitos T activados y las células asesinas normales (NK) no resultaron afectadas por la ingestión de FOS (tablas 3a & 3b).

Tabla 3a: Parámetros periferales inmunológicos; subpoblaciones de linfocitos

Variable	Unidades	Pre-test		Antes		Durante		Después	
		Administración de fructooligosacáridos (8 g/día)							
		Media	95 %CI	Media	95 %CI	Media	95 %CI	Media	95 %CI
Células sanguíneas blancas	#10 ⁻³	nd		4,9	0,6	5,3	0,7	5,8	0,7
Linfocitos T	%	65,7	4,8	64,0	4,3	68,7	5,4	66,9	4,1
Linfocitos B	%	7,7	1,5	8,3	1,7	8,5	1,4	8,1	1,5
Células CD 4 ⁺	%	40,8	4,4	41,7	4,1	47,3	4,5	45,1	4,0
Células CD 8 ⁺	%	35,3	4,4	33,2	4,5	38,3	4,7	36,8	4,7
Linfocitos T activados	%	15,0	3,8	15,7	4,1	15,6	4,7	18,6	5,3
Células NK	%	22,0	3,9	21,9	3,4	24,8	3,4	21,3	3,3
95 % CI = ± 95 % del intervalo de confianza									

Tabla 3b-c-d: Cambios en los parámetros inmunológicos periféricos

Los datos indicados son la diferencia media ± error estándar de la media (sem) después de cada período de 3 semanas

n = 13 – 19	unidades	Productos de leche no fermentada (período de lavado)		
		Media Δ^2	± sem	valor p ⁵
Células sanguíneas blancas	# 10 ⁻³	---	---	---
Linfocitos T	%	-1,7	0,97	0,157
Linfocitos B	%	0,4	0,34	0,298
Células CD 4 ⁺	%	0,8	0,91	0,397
Células CD 8 ⁺	%	-2,1	0,82	0,019
Linfocitos T activados	%	0,7	0,72	0,353
Células NK	%	0,05	1,15	0,964
n = 13 – 19	unidades	FOS ¹ 8 g/día (período de ingesta del prebiótico)		
		Media Δ^3	± sem	valor p ⁵
Células sanguíneas blancas	# 10 ⁻³	0,347	0,286	0,243
Linfocitos T	%	4,6	1,49	0,006

Linfocitos B	%	0,3	0,44	0,562
Células CD 4 ⁺	%	5,7	1,34	<0,001
Células CD 8 ⁺	%	5,0	0,99	<0,001
Linfocitos T activados	%	-0,1	1,00	0,918
Células NK	%	2,9	1,48	0,066
n = 13 – 19	unidades	sin FOS (período de seguimiento)		
		Media Δ^4	$\pm$ sem	valor p^5
Células sanguíneas blancas	# 10 ⁻³	0,495	0,362	0,326
Linfocitos T	%	-1,8	1,42	0,225
Linfocitos B	%	-0,4	0,46	0,434
Células CD 4 ⁺	%	-2,3	1,38	0,111
Células CD 8 ⁺	%	-1,4	1,14	0,227
Linfocitos T activados	%	-3,0	0,93	0,005
Células NK	%	-3,6	1,40	0,020

¹FOS = 4 g/dos veces al día, ² Efecto de la interrupción de los productos de leche fermentada = cambio medio entre la muestra del test previo y el principio del suplemento prebiótico (período de 3 semanas de lavado), ³ Efecto del suplemento de FOS (4 g/dos veces al día) = cambio medio entre el principio del suplemento prebiótico y el final de la suplementación (período de 3 semanas de ingesta del prebiótico), ⁴ Efecto de la interrupción del suplemento de FOS = cambio medio entre el final de la suplementación prebiótica y el final del estudio (período de 3 semanas de seguimiento), ⁵ una muestra del test t sobre las diferencias medias.

La actividad fagocitaria de los granulocitos y monocitos disminuyó significativamente por la ingestión de FOS: La actividad fagocitaria expresada como la mediana de la intensidad fluorescente cambió para los granulocitos, de 130 ± 10 a 52 ± 2 ($p < 0,001$), y para los monocitos, de 75 ± 5 a 26 ± 2 ($p < 0,001$).

Esta posible disminución del proceso inflamatorio viene también sugerida por la significativa disminución de los niveles de interleucina-6 ARNm en las células mononucleares de la sangre periférica después de la ingestión de FOS (figura 3).

ESTATUS DE LA VITAMINA B₁₂ Y DEL FOLATO

Ni los niveles de vitamina B₁₂ ni los de folato en suero se vieron influenciados por el suplemento de FOS. La vitamina B₁₂ en suero fue de 271 ± 143 ng/litro antes de la ingestión del suplemento y de 289 ± 160 ng/litro durante la ingestión del suplemento. Tres individuos, sin embargo, fueron deficientes en vitamina B₁₂. Dos individuos volvieron al estatus normal durante el estudio mientras que el otro permaneció deficiente durante el estudio. Los niveles de folato en suero fueron de $5,9 \pm 2,0$ µg/litro antes de la ingesta del suplemento y de $5,7 \pm 1,9$ µg/litro durante la ingesta de suplemento.

Nuestros resultados respaldaron con fuerza los efectos bifidogénicos de los fructooligosacáridos en personas ancianas con un aumento de log 2 en las cuentas de bifidobacterias dado que nuestros individuos ancianos frágiles mostraron bajos contajes al principio del estudio. Se sugiere que la disminución del proceso inflamatorio se debe a la disminución de la expresión de IL-6 ARNm en los monocitos de la sangre periférica.

En efecto, el presente estudio confirma el efecto positivo del suplemento con FOS sobre las bifidobacterias observado en adultos y ancianos (figura 2), lo cual indica que los ancianos responden a la ingesta del prebiótico (FOS) mediante un aumento de bifidobacterias al igual que los adultos más jóvenes o incluso mejor si los contajes de bifidobacterias es bajo. Otros 8 g de FOS o menos, parece que son suficientes para lograr un efecto máximo sobre los contajes de bifidobacterias. Mientras que de los diferentes estudios parece estar presente una respuesta a la dosis, estudios sencillos indican que por encima de un umbral de 4-5 g/día, se obtiene una repuesta máxima y el aumento de bifidobacterias parece ser más dependiente del número inicial (figuras 1 y 2). A menudo, el FOS añadido a la dieta aumenta los niveles de bifidobacterias a expensas de bacterias potencialmente perjudiciales, principalmente clostridia y *Bacteroides*. Pero nosotros hemos observado un aumento significativo en *Bacteroides* a través del estudio (tablas 2a & 2b).

Hemos observado un importante descenso de la actividad fagocitaria. Este descenso de la actividad fagocitaria puede ser un reflejo de la disminuida activación de macrófagos unida a una posible reducción de las bacterias patógenas, sugiriendo así una disminución de la inflamación debido a la carga más pequeña de endotoxinas. Sorprendentemente, sin embargo, este posible descenso del proceso inflamatorio se sugiere por el descenso de los niveles de interleucina-6 ARNm en las células mononucleares de la sangre periférica (figuras 3).

Ejemplo preparativo 2: Mezcla prebiótica

Se preparó una mezcla prebiótica, mezclando o combinando fructooligosacáridos con inulina en las proporciones en peso de aproximadamente 70 % de fructooligosacáridos con aproximadamente el 30 % de inulina. La mezcla

prebiótica resultante puede ser añadida o mezclada con cualquier soporte adecuado por ejemplo, una leche fermentada, un yogur, un queso fresco, una leche cuajada, una barra de un dulce, copos o barras de cereal para desayuno, una bebida, polvo de leche, un producto a base de soja, un producto de leche no fermentada o un suplemento nutritivo para la nutrición clínica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de por lo menos un prebiótico en la elaboración de un medicamento para la disminución de un proceso inflamatorio en un humano anciano, en donde el medicamento disminuye la expresión del ARNm de la interleucina-6 en monocitos de la sangre periférica.
- 10 2. El empleo, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el prebiótico comprende un oligosacárido obtenido a base de glucosa, galactosa, xilosa, maltosa, sucrosa, lactosa, almidón, xilano, hemicelulosa, inulina, goma o una mezcla de los mismos.
3. El empleo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el prebiótico comprende un fructooligosacárido, o una mezcla de fructooligosacárido e inulina.
- 15 4. El empleo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el prebiótico comprende en peso, del 60 % al 80 % de fructooligosacárido y del 20 % al 40 % de inulina.
5. El empleo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el prebiótico se añade a una mezcla con un probiótico, particularmente el *Bifidobacterium bifidum* o *Streptococcus thermophilus*.

FIG. 1

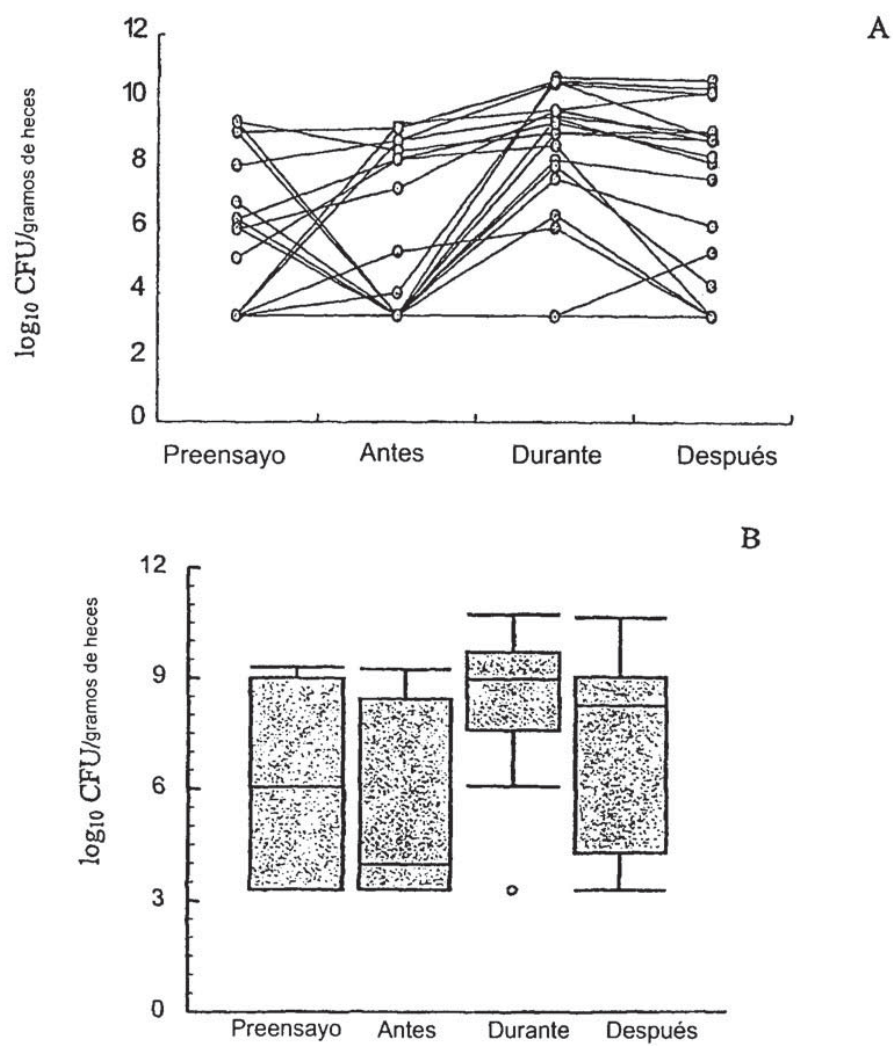


FIG. 2

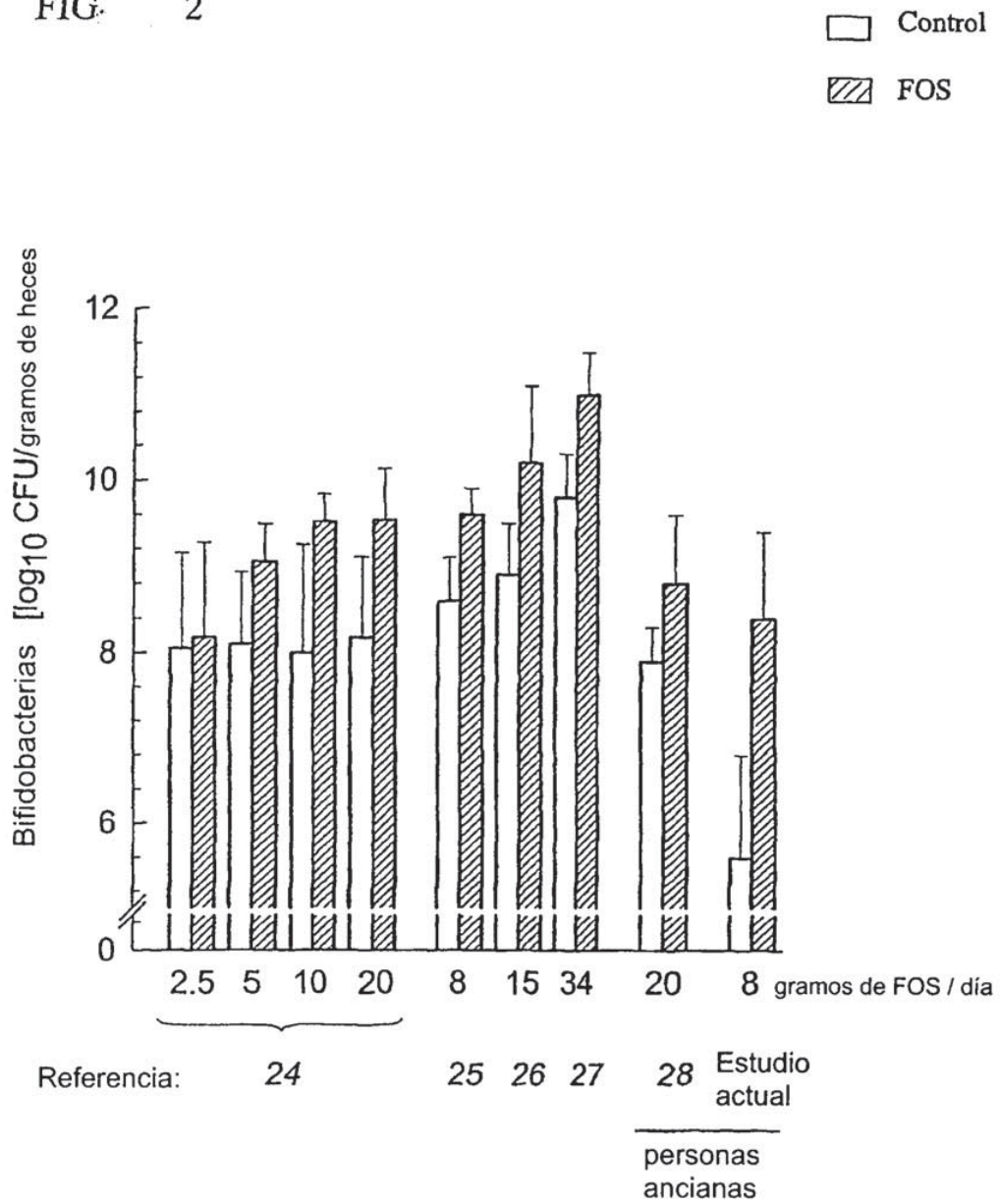


FIG. 3

