



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 419**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01986261 .4**  
96 Fecha de presentación : **04.10.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1322318**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54 Título: **Uso de bacterias probióticas productoras de ácido láctico para proteger la piel contra reacciones inflamatorias, alérgicas o inmunosupresoras causadas por la radiación ultravioleta.**

30 Prioridad: **06.10.2000 EP 00121865**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.04.2011**

73 Titular/es: **NESTEC S.A.**  
**avenue Nestlé 55**  
**1800 Vevey, CH**  
**L'Oréal**

72 Inventor/es: **Baur, Markus;**  
**Breton, Lionel;**  
**Couzy, Francois y**  
**Gueniche, Audrey**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 357 419 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCION**

Uso de bacterias probióticas productoras de ácido láctico para proteger la piel contra reacciones inflamatorias, alérgicas o inmunosupresoras causadas por la radiación ultravioleta

5 La presente invención se refiere al uso de probióticos en la preparación de un soporte para estabilizar la función inmunológica de la piel. En concreto la presente invención se refiere al uso de microorganismos probióticos para mejorar la función inmunológica de la piel en situaciones de fatiga que producen inmunosupresión, sobre todo para normalizar la actividad inmunológica de la piel y reducir la tendencia al desarrollo de hiperreacciones en tales estados.

10 La presente invención se refiere en particular al uso de bacterias probióticas de ácido láctico, o de un sobrenadante de cultivo de las mismas, en la preparación de un soporte ingerible para reducir reacciones inflamatorias o alérgicas de la piel causadas por la radiación UV y para intensificar el sistema inmune cutáneo en un estado inmunosupresor inducido por la irradiación UV de la piel.

15 La continua disminución de la capa atmosférica de ozono con el consiguiente aumento de la radiación ultravioleta que llega a la superficie del planeta ha suscitado mucho interés sobre sus posibles consecuencias en la salud humana. Aunque la exposición a la radiación ultravioleta es necesaria para que los humanos produzcan vitamina D, cada vez hay mayor evidencia de que la exposición prolongada a la luz solar, en particular a la radiación ultravioleta, causa diversos problemas en la piel, incluyendo la inducción de ciertos cánceres cutáneos y del envejecimiento acelerado de la piel (foto-envejecimiento).

20 La hipótesis actual es que el factor principal de formación de cáncer cutáneo es un daño mutacional en el ADN de las células generadoras de la piel causado por la radiación ultravioleta, mientras que el deterioro del sistema inmune de la piel inducido por la luz UV parece constituir obviamente un segundo factor para el posterior desarrollo del mismo. En un sistema sano las células malignas en estado inicial son eliminadas por el funcionamiento normal del sistema inmune de la piel. Pero por efecto de la radiación ultravioleta el sistema inmune de la piel parece sufrir una supresión y no ser capaz de realizar su función usual de control. Por tanto las células de cáncer cutáneo muy tempranas no son eliminadas y, como consecuencia, las células malignas escapan del sistema inmune y desarrollan tumores.

25 Además de estas conocidas inquietudes sanitarias las investigaciones también han aportado pruebas, sugiriendo que la exposición a la radiación ultravioleta puede afectar de modo negativo a una variedad de respuestas inmunes en los seres vivos, tanto localmente, en la piel irradiada por UV, como sistémicamente, es decir en sitios distantes de la piel irradiada. Se ha visto que la exposición de ratones a la radiación UV-B interfiere en el rechazo de cánceres cutáneos inducidos por UV y en la inducción de respuestas de hipersensibilidad retardada y por contacto (DTH, CHS) iniciada en sitios no irradiados. Estas formas de inmunosupresión encontradas tras la irradiación ultravioleta se consideran relacionadas con la inducción de linfocitos T supresores específicos del antígeno. La respuesta DTH es especialmente importante, porque esta reacción inmune mediada por linfocitos T es responsable de la protección contra muchas enfermedades infecciosas crónicas.

30 Las actuales comprobaciones experimentales involucran sustancias solubles derivadas de queratinocitos irradiados con UV como probables mediadoras de la supresión sistémica de las respuestas DTH y CHS inducida por UV. En base a un espectro de acción in vivo para la supresión sistémica de CHS en ratones, se ha propuesto que el ácido urocánico, un producto de la desaminación de la histidina contenido en el estrato córneo, es uno de los fotorreceptores de esta forma de inmunosupresión inducida por UV.

40 Además de suprimir el sistema inmune cutáneo se ha visto que la radiación ultravioleta también induce efectos inflamatorios e irritantes en la piel, que con el tiempo pueden dar lugar al desarrollo de eritemas, edemas y/o a exfoliación o descamación (hiperqueratosis) de la piel. Estas reacciones inflamatorias y/o irritantes son totalmente separadas y dissociables de las mencionadas en primer lugar, pues en vez de ser una consecuencia de la supresión del sistema inmune están más bien relacionadas con su estimulación.

45 En el campo técnico se han hecho diversos intentos para aliviar los efectos perjudiciales de la radiación ultravioleta en la piel, tales como el uso de filtros solares u otros agentes farmacéuticos especiales.

50 En J. Invest. Dermatol., 97 (1991), 624-628 se refiere que la aplicación tópica de compuestos absorbentes de la radiación ultravioleta (filtros solares) es eficaz para prevenir los eritemas y edemas provocados por la radiación ultravioleta, pero no puede evitar la inmunosupresión inducida por UV. Este hallazgo fue confirmado por algunos otros estudios, según los cuales los filtros solares parecen evitar la inflamación y/o la irritación, pero no proporcionan una protección profiláctica completa contra los efectos inmunosupresores de la radiación ultravioleta.

55 Además se encontró que conocidos agentes farmacológicos comúnmente empleados para el tratamiento de la piel inflamada e irritada, como los corticosteroides, la indometacina o el ácido acetilsalicílico, no tienen efecto en el tratamiento de la supresión del sistema inmune cutáneo, inducida por luz UV, si se aplican cuando el daño ya es manifiesto. Como han propuesto Bergstresser y otros en Immunology 46 (1989), 219-245, la aplicación local de corticosteroides reduce la respuesta inmune en general. Aunque Reeve y otros, en Cancer Letters 95 (1995), 213-219, han demostrado que la indometacina inhibe la fotocarcinogénesis, este efecto parece comprender el periodo inicial y el

periodo impulsor del desarrollo del tumor, y por tanto se cree que es debido a un efecto anticancerígeno generalizado más que a un efecto sobre el sistema inmune cutáneo. Así pues, parece haber un patrón según el cual, agentes capaces de suprimir la inflamación y la irritación no pueden proteger el sistema inmune cutáneo.

5 Por otra parte hay agentes que han resultado efectivos contra la inmunosupresión inducida por la radiación ultravioleta, pero que no muestran ningún indicio de mejora de los efectos inflamatorios e irritantes causados por la exposición de la piel a la radiación ultravioleta. En la patente US-P-5,302,389 se propone un agente de este tipo para el tratamiento o prevención de la inmunosupresión inducida por UV, mediante la aplicación de enzimas reparadores de ADN encapsulados en liposomas. Sin embargo este agente no es eficaz en el tratamiento de las respuestas inflamatorias e irritantes de la piel.

10 La patente FR 2 718 752 se refiere a preparados de suero de leche multifementados, para mejorar el estado de la piel, que comprenden suero de leche fermentado con al menos un lactobacilo, al menos un estreptococo, al menos un leuconostoco y al menos una levadura, y que opcionalmente pueden incluir captadores de radicales como las vitaminas A, E, C, B1 y la superóxido dismutasa (SOD).

15 Por tanto se necesita en el campo técnico un agente que pueda disminuir la tendencia de la piel a desarrollar hiperreacciones cuando está sujeta a estados de tensión y que sea capaz de reducir el efecto supresor del sistema inmune cutáneo causado por la radiación ultravioleta.

20 En el pasado varias publicaciones describieron microorganismos que ejercían una influencia beneficiosa en el bienestar individual. Según R. Fuller, en el Journal of Applied Bacteriology 66 (1989), 365-378, estos microorganismos fueron designados "probióticos" y se definieron como microbios vivos que benefician al huésped, mejorando su balance microbiano intestinal.

Los probióticos son organismos no patógenos ni toxicogénicos que sobreviven al paso por el estómago y el intestino delgado. Al ser ingeridos continuamente por el huésped pueden llegar a colonizar el intestino en grado sustancial, compitiendo así con otras bacterias potencialmente patógenas por nutrientes y/o sitios de fijación sobre la pared del tracto gastrointestinal y reduciendo su número y disminuyendo o previniendo infecciones.

25 Hasta ahora se han encontrado varios microorganismos probióticos diferentes, todos ellos conocidos por ejercer su efecto en el intestino mediante la producción de toxinas, productos secundarios metabólicos, ácidos grasos de cadena corta y similares.

30 También se ha demostrado que la microbiota del tracto gastrointestinal puede afectar a la inmunidad mucosa dentro del huésped. Según Schiffrin y otros, en Am. J. Clin. Nutr. 66 (1997), 520, las células del epitelio intestinal, los leucocitos de la sangre, los linfocitos B y T, y también células accesorias del sistema inmune se han involucrado todas ellas hasta cierto grado en la inmunidad antes citada. Por lo tanto se considera que los microorganismos probióticos interactúan con el sistema inmune a muchos niveles, incluyendo la producción de citocinas, la proliferación de células mononucleares, la fagocitosis y aniquilación macrofágica, la inmunidad a los agentes patógenos bacterianos y protozoarios y similares.

35 Como la actividad biológica de los probióticos tiene lugar principalmente en/sobre la mucosa intestinal o el tejido adyacente del individuo, se consideró que el efecto de dichos microorganismos residía sobre todo en esta parte del cuerpo. A este respecto la literatura aportó abundantes pruebas de que la ingestión de probióticos por un individuo puede mostrar algún efecto en el tracto gastrointestinal. La patente WO 00/41707 revela una cepa de Lactobacillus salivarius útil para la profilaxis o tratamiento de actividades inflamatorias gastrointestinales no deseadas, como la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome del intestino irritable. Además en la patente WO 00/35465 se revelan composiciones de administración oral de Lactobacillus y/u otros organismos probióticos para establecer y mantener una flora urogenital sana.

45 Durante los estudios extensivos que llevaron a la presente invención no fue sorprendente encontrar que hay probióticos específicos que también producen un efecto en el cuerpo de un individuo en una parte distante de la región que colonizan. En particular se ha encontrado que hay microorganismos probióticos específicos que también ejercen una actividad en el sistema inmune de la piel del individuo. Por consiguiente se ha visto que, tras ser ingeridos por un individuo, pueden compensar una supresión del sistema inmune cutáneo inherente a la exposición a la radiación UV y también reducir la tendencia del individuo a desarrollar reacciones inflamatorias y/o irritantes tras la exposición a tal radiación UV.

50 Por tanto, según su aspecto más amplio, la presente invención proporciona el uso de bacterias probióticas de ácido láctico, o de un sobrenadante de cultivo de las mismas, para preparar un soporte ingerible para reducir la reacción inflamatoria o alérgica cutánea inducida por irradiación UV de la piel y fomentar el sistema inmune cutáneo durante un estado inmunosupresor inducido por irradiación UV de la piel.

55 Para el propósito de la presente invención, el término "equilibrar la función inmune de la piel" debe interpretarse como normalizar la función inmune en situaciones de tensión que provocan una supresión del sistema inmune, es decir, mantener una función o estado inmune a un nivel normal de predominio en la piel, aunque estando expuesta a tales

situaciones de tensión. Una situación de tensión debe interpretarse como un estado que incluye fatiga física, p.ej. irradiación ultravioleta de la piel; fatiga química, p.ej. exposición a agentes químicos o a sustancias alergénicas, o fatiga biológica, p.ej. exposición a microorganismos tales como bacterias patógenas, virus, hongos, etc., o infección por ellos. En estas condiciones el sistema inmune, por una parte, es suprimido, p.ej. al exponerse a la radiación UV, y por otra parte sobreestimulado, como cuando está expuesto a sustancias irritantes y alérgenos. Además, en el contexto de la presente invención, sobrenadante de cultivo del mismo designa el sobrenadante de un cultivo de un probiótico, tal cual o en forma concentrada, o el o los metabolitos activos aislados de ahí.

Ahora se ha visto que cuando se administran a un individuo ciertos probióticos capaces de colonizar su intestino, o un sobrenadante de cultivo de los mismos, el efecto inmunosupresor de ciertos estados de tensión, como p.ej. la irradiación ultravioleta, es menos pronunciado o se reduce en gran medida, mientras que las reacciones de inflamación y/o irritación solo ocurren en menor grado o no aparecen en absoluto.

En la figuras,

la fig. 1 representa la reacción inflamatoria asociada a una reacción de hipersensibilidad por contacto, en varios modelos de ratones examinados, determinada por la hinchazón del oído;

la fig. 2 representa los resultados obtenidos con un anticuerpo contra ICAM-1 en los diversos modelos animales indicados;

la fig. 3 muestra los niveles de TGF- $\beta$  en los diversos modelos animales ensayados;

la fig. 4 muestra el nivel de IL-10 epidérmico en los diversos modelos animales ensayados;

la fig. 5 muestra los efectos de los probióticos sobre una supresión del sistema inmune inducida por irradiación UV, indicados mediante una reacción de hipersensibilidad por contacto determinada por la hinchazón del oído;

la fig. 6 muestra los efectos de los probióticos sobre una supresión del sistema inmune inducida por irradiación UV, indicados como % de inhibición de CHS.

La presente invención establece por primera vez que la composición de la flora intestinal también puede tener efecto beneficioso sobre ciertas funciones protectoras en partes del cuerpo alejadas del lugar en que el microorganismo coloniza el individuo, es decir en la piel. Además se ha demostrado que los probióticos pueden controlar procesos divergentes en la piel, como, por ejemplo, el incremento del sistema inmune durante un estado inmunosupresor y al mismo tiempo la disminución de hiperreacciones tales como inflamaciones, alergias, eccemas o dermatitis atópica. Esto es especialmente cierto para personas mayores, que suelen tener una capacidad inmunológica reducida.

Según una forma de ejecución preferida los probióticos para incluir en el soporte se escogen del grupo formado por las bacterias de ácido láctico, en concreto lactobacilos y/o bifidobacterias y con mayor preferencia *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* o *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. dolescentis* *B. pseudocatenulatum*. Como los lactobacilos y las bifidobacterias colonizan el intestino en distintos lugares, debido a su diferente necesidad de oxígeno, se puede utilizar una mezcla de ellos para proporcionar una amplia cobertura.

Según una forma de ejecución más preferida las cepas utilizadas son *Lactobacillus johnsonii* (La1), depositada bajo el tratado de Budapest con el instituto Pasteur, con el nº de depósito CNCM I-1225, o *Lactobacillus paracasei* (ST11) depositada bajo el tratado de Budapest con el instituto Pasteur, con el nº de depósito CNCM I-2116.

El soporte puede ser cualquier producto alimenticio o farmacéutico para administración oral o un producto cosmético de aplicación tópica, en el cual se puede incluir el microorganismo probiótico o un sobrenadante de un cultivo del mismo. Son ejemplos de soportes alimenticios o farmacéuticos: leche, yogur, requesón, queso, leches fermentadas, productos lácteos fermentados, helados, productos cereales fermentados, leches en polvo, fórmulas infantiles o comida para mascotas, o tabletas, suspensiones líquidas bacterianas, suplementos orales secos, suplementos orales líquidos, alimentación seca por sonda, alimentación líquida por sonda. Como productos cosméticos se consideran: lociones, champús, cremas de tipo hidratante, solar, postbronceado o antienvjecimiento y/o ungüentos, en los cuales el microorganismo puede incluirse en forma viva, semiactiva o desactivada, p.ej. como polvo liofilizado. Los sobrenadantes de cultivo de los microorganismos también pueden incluirse en los productos cosméticos, opcionalmente en forma concentrada.

Se entiende que cuando se administra en forma de microorganismo a un individuo, la actividad equilibradora del probiótico dependerá de la dosis. Así, se contempla la inclusión de  $10^5$  hasta  $10^{12}$  organismos (vivos o muertos)/g de producto. Cuando se usa un sobrenadante de un cultivo de probiótico, el sobrenadante puede emplearse tal cual o someterse a una o más etapas de purificación antes de incluirlo en el producto, a fin de concentrar o aislar el o los ingredientes/metabolitos activos. Los métodos y técnicas para purificar compuestos y detectar su actividad en las fracciones obtenidas son bien conocidos del especialista.

Aunque la presente invención es aplicable a todos los seres vivos, como humanos y animales, y en particular a

las mascotas, los probióticos se usan preferiblemente para individuos mayores, que en general tienen una capacidad inmunológica reducida.

Durante la experimentación de gran alcance que condujo a la presente invención se utilizó un modelo animal exento de gérmenes, concentrándose en características relacionadas con la microflora (MAC) frente a características del animal libre de gérmenes (GAC), las cuales se consideran de gran valor, particularmente en enfermedades alérgicas/inflamatorias con manifestaciones cutáneas.

Los siguientes ejemplos ilustran con mayor detalle la presente invención sin limitarla a los mismos.

### **Ejemplo 1**

Compensación de reacciones de hipersensibilidad

En este ensayo se evaluó la actividad de los probióticos (muertos o vivos) en el sistema inmune cutáneo bajo una situación de estrés químico. Para ello los animales se sensibilizaron con un compuesto químico (dinitroclorobenceno) y el efecto de tal estado de estrés (químico) en animales axénicos se comparó con el efecto en animales cuyo intestino contenía solo probióticos. El nivel de reacción hipersensible desarrollada contra el DNCB se evaluó mediante varios parámetros (véase abajo).

Los ensayos se llevaron a cabo con ratones macho C3H (LPS+), exentos de gérmenes y suministrados por el Research Center Orléans (CNRS Orléans, Francia), reunidos en cuatro grupos de ocho ratones cada uno. Los grupos reflejaban diferentes estados intestinales y se designaron como "C" (grupo con una microflora Convencional (normal)), "LV" (grupo con una microflora formada solo por bacterias vivas ("LiVing") de ácido láctico), "LD" (grupo alimentado con probióticos muertos (Lactobacillus Dead)) y "A" (ratones libres de gérmenes (Axénicos)). Todos los grupos se mantuvieron en jaulas separadas, manteniendo el grupo C en condiciones normales.

El probiótico administrado a los ratones fue la bacteria de ácido láctico ST11 (que puede obtenerse del instituto Pasteur con el nº de acceso CNCM I-2116), que se usó viva en una disolución de 108 ufc/ml (ufc = unidad formadora de colonias) o muerta o inactivada por irradiación en una disolución de 2,1 g/25 ml en agua cuando se aplica por alimentación forzada o en agua a 3,3 g/l (véase abajo).

Para obtener ratones con una microflora formada esencialmente solo por bacterias vivas de ácido láctico, los animales libres de gérmenes (véase arriba) se alimentaron forzosamente dos veces, el día 7 y el día 8, con 0,5 ml de una solución que contenía 108 ufc/ml (grupo LV). Como alternativa, para obtener ratones que tuvieran una microflora intestinal con la cepa probiótica inactivada por irradiación, los animales libres de gérmenes se alimentaron forzosamente desde el día 36 hasta el día 38, desde el día 41 hasta el día 45, desde el día 48 hasta el día 49 y a partir del día 52 con 0,2 ml de una solución que contenía 2,1 g/25 ml de microorganismos inactivados, cada día indicado. A partir del día 55 la solución anterior se reemplazó por otra que contenía 3,3 g/l de microorganismos inactivados, la cual se proporcionó hasta el final del ensayo en agua potable (grupo LD). Para obtener una microflora intestinal convencional (normal) los animales libres de gérmenes se transfirieron tres días después de su llegada a una jaula común con alimentación normal, de manera que desarrollaran una microflora normal. Se examinó regularmente la composición microbiana fecal de todos los animales de los grupos A, LV y LD, para asegurar el mantenimiento de su estado intestinal específico.

Los animales de los diferentes grupos se sensibilizaron por aplicación tópica de 50 µl de dinitroclorobenceno (DNCB) al 1% en cada flanco los días 45 y 50 respectivamente. Cinco días después de la última sensibilización los animales se estimularon tres días consecutivos (los días 55, 56 y 57) aplicando 25 µl de DNCB al 1% en la oreja derecha y 25 µl del soporte (aceite de oliva) en la oreja izquierda, para todos los grupos de ratones.

El día 58 se examinó el efecto de la reacción de hipersensibilidad producida por el tratamiento anterior con DNCB. Para ello se midió el grosor de la oreja derecha e izquierda de los animales el día 58 y se calculó la diferencia de grosor entre las dos orejas del mismo animal. Los resultados se representan en la figura 1 y están resumidos en la siguiente tabla I:

Tabla I

Grupo	$\Delta$ grosor de orejas $10^{-2}$ mm $\pm$ s/ $\sqrt{n}$
A	22,9 $\pm$ 2,2
LD	19,0 $\pm$ 3,6
LV	17,0 $\pm$ 3,3
C	12,1 $\pm$ 2,8

De ahí resulta evidente que la reacción de hipersensibilidad medida por el grosor de la oreja aumenta en el orden

$$C < LV < LD < A$$

A partir de estos resultados puede concluirse que una flora intestinal convencional permite regular la inflamación, en comparación con los ratones que carecen de tal microflora. Asimismo puede apreciarse que la implantación del microorganismo probiótico ST11 solo produce una reducción de la inflamación causada por DNCB, es decir, una tendencia disminuir el edema de las orejas del animal exclusivamente con una flora intestinal láctica. Este hallazgo es sorprendente, porque el intestino consta normalmente de un conjunto de distintos microorganismos que cumplen todos ellos diferentes tareas.

Además, con el fin de obtener datos bioquímicos sobre las respuestas inmunológicas relevantes de nivel molecular a la situación de estrés, se prepararon cortes criogénicos de la oreja derecha, para examinar su nivel ICAM-1 y TGF- $\beta$ . El ICAM-1 es un marcador proinflamatorio, mientras que el TGF- $\beta$  es un marcador antiinflamatorio. Por tanto en situaciones de estrés inducido cabe esperar que el nivel de ICAM-1 sea alto y el de TGF- $\beta$  bajo.

En los ensayos se utilizó anticuerpo de rata anti-ICAM-1 de ratón (clon KAT-1) a 1/25 (Caltag Laboratories, CA, USA), después conejo anti-rata-FITC a 1/700 (Dako, Ca, USA). Para determinar el TGF- $\beta$  se usó conejo anti-TGF- $\beta$  (V) humano/ratón y luego cerdo anti-conejo-FITC a 1/1000 (Dako, Ca, USA).

Como se deduce de la figura 2, en los animales axénicos se pudo detectar un nivel elevado de la citocina inflamatoria ICAM-1, mientras que en los animales tratados con el probiótico vivo se observó un menor nivel de ICAM-1, comparable al encontrado en los animales con una microflora convencional, es decir normal. Los animales tratados con probiótico inactivado también mostraron un menor nivel de ICAM-1. Conforme a este hallazgo se pudo establecer el siguiente orden

$$C = LV > LD > A$$

Asimismo, en base al hallazgo relativo a este marcador inflamatorio, los animales con una flora intestinal formada solo por bacterias de ácido láctico mostraron el mismo nivel de ICAM-1 que los ratones que tenían una microflora convencional.

En contraste con ello la figura 3 indica que el marcador antiinflamatorio TGF- $\beta$  disminuyó en los animales anéxicos, en comparación con los animales que tenían una microflora convencional. Sin embargo los animales que tenían una microflora con bacterias vivas mostraron claramente un mayor nivel de TGF- $\beta$  en comparación con los animales anéxicos. El orden que debe establecerse para este marcador es

$$C > LV > LD > A$$

Además se tomaron muestras de piel del dorso de los ratones y se sometieron a un procedimiento de extracción según el método descrito en Peguet y otros, Br. J. Dermatol. 133 (1995), 661, cuya documentación se incorpora aquí como referencia. Una vez tomadas, las muestras se pusieron sobre hielo en tampón de extracción (Tris HCl 10 mM, pH 7,4; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; NaCl 150 mM; 1% de Triton X100; PMSF 2 mM) y se sometieron a un tratamiento de ultrasonidos. Asimismo se tomaron muestras de suero de los animales. De las muestras de suero y de los extractos de piel se examinó su nivel de IL-10.

Para efectuar los experimentos se usó el ensayo ultrasensible ELISA Cytoscreen® de Biosource International, CA, USA. La cantidad de IL-10 se calculó según una curva estándar (de 0,625 hasta 80 pg/ml).

Los resultados de los extractos se indican según la cantidad de proteínas (método de Lowry) que contienen, respecto a la cantidad total de material celular. Los resultados están expresados en pg de IL-10 y se muestran en la figura 4 y en la siguiente tabla II.

Tabla II

Grupos	pg/mg de IL-10
A	6,3 $\pm$ 2,2
LD	6,8 $\pm$ 1,7
LV	11,1 $\pm$ 1,8
C	21,2 $\pm$ 3,2

Como puede verse claramente, la cantidad de IL-10 es mayor en los ratones que tienen una microflora convencional y el grupo tratado con probiótico vivo es superior a los ratones axénicos. Se puede establecer el siguiente orden:

$$C > LV > LD > A$$

En base lo encontrado en este ensayo puede verse claramente que los distintos parámetros analizados (TGF- $\beta$ , ICAM-1, IL-10) confirman los resultados hallados con la diferencia de grosor de las orejas, es decir, una regulación de las reacciones inflamatorias al implantar una microflora de lactobacilos.

### Ejemplo 2

En este experimento se utilizó la supresión del sistema inmune de la piel inducida por la luz UV - perceptible por un menor desarrollo de una reacción de hipersensibilidad – a fin de investigar el potencial de los probióticos para restaurar sustancialmente al modo normal la capacidad de respuesta del sistema inmune a situaciones de estrés tales como la exposición a una sustancia alergénica.

Para el experimento se formaron tres grupos de animales. El primero se trató con un compuesto conocido como desencadenante de reacciones de hipersensibilidad, el dinitrofluorobenceno (DNFB), y se determinó la reacción del sistema inmune de la piel a esta sustancia. El segundo grupo se sometió a radiación UV antes de su exposición al compuesto y se evaluó el efecto de dicha exposición sobre la reacción inmune bajo estas condiciones. El tercer grupo recibió probióticos vivos o inactivados, o un sobrenadante de cultivo de los mismos, y se expuso a la luz UV. En este grupo se evaluó el efecto de los probióticos en la restauración de la respuesta inmune.

Para realizar el experimento se emplearon ratones hembra Skh1/hr (obtenidos de Charles River Laboratories (Francia)), de entre 8 y 10 semanas de edad. Como probióticos administrados a los diferentes grupos se usaron los productos listados en la tabla III:

Tabla III

Producto 1	medio de cultivo
Producto 2	La1 vivo (obtenible del instituto Pasteur, CNCM I-1225)
Producto 3	La1 inactivado
Producto 4	sobrenadante de La1
Producto 5	ST11 vivo (obtenible del instituto Pasteur, CNCM I-2116)
Producto 6	ST11 inactivado
Producto 7	sobrenadante de cultivo de ST11

Las muestras de los probióticos se suministraron en alícuotas congelados de 1,5 ml que contenían  $10^9$  ufc/ml. Como control se empleó el medio de cultivo (producto 1).

Se formaron 32 grupos de 10 ratones cada uno. Los animales se alimentaron con los respectivos productos, empezando 10 días antes del día 0, el día de exposición de los animales a la luz UV, y se prosiguió con dicha alimentación hasta el día 12, en el cual tuvo lugar la sensibilización con DNFB. Por lo tanto los animales fueron alimentados con los productos durante un total de 23 días. Los productos 1 a 7 (véase arriba) se administraron forzosamente a los grupos 5 hasta 32 a una dosis de 100  $\mu$ l/animal, que corresponde aproximadamente a  $10^8$  ufc/animal/día. En la tabla IV figuran los productos y los grupos que los reciben.

Tabla IV

Producto 1 (medio de cultivo)	grupos 5 – 8
Producto 2 (La1 vivo)	grupos 9 – 12
Producto 3 (La1 inactivado)	grupos 13 -16

Producto 4 (sobrenadante de La1)	grupos 17 -20
Producto 5 (ST11 vivo)	grupos 21 – 24
Producto 6 (ST11 inactivado)	grupos 25 – 28
Producto 7 (sobrenadante de ST11)	grupos 29 - 32

5 El día 0 los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano/oxígeno y a continuación se irradiaron mediante un simulador solar que llevaba una lámpara de Xenon de 1000 W (Oriol), incluyendo un espejo dicróico (Oriol, Statford, USA) equipado con un filtro WG 320 de 1 mm de grosor y un filtro UG11 de 1 mm de grosor (Schott). Esta fuente filtrada proporcionó un espectro US solar simulado (290 - 400 nm) que casi eliminaba toda la radiación visible e infrarroja. La cantidad de radiación determinada mediante un radiómetro ARCC 1600 (Osram) fue de 1,95 mW/cm<sup>2</sup> en el UVB y 9,35 mW/cm<sup>2</sup> en el UVA. El espectro aplicado es conforme a la norma SPF COLIPA.

10 Los ratones de los grupos 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 31, 32 se irradiaron con las orejas protegidas (día 0). Recibieron una dosis única de 2,5 MED.

10 Los días 5 y 6 se indujo una reacción de hipersensibilidad por aplicación tópica al abdomen de 50 de µl de acetona (grupos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31) y DNFB (0,3% en acetona; grupos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32), respectivamente.

15 El día 12 se aplicaron 5 µl de una solución de 0,2% de DNFB en acetona a la oreja derecha de todos los ratones. Los animales se pesaron al principio (día 0) y al final de los ensayos (día 13).

15 La reacción inflamatoria se evaluó 24 horas después de la exposición a la luz UV, o sea el día 1. Se evaluaron dos parámetros, a saber: la intensidad del eritema en el dorso, determinando clínicamente el eritema y el edema, y calculando la media de cada grupo, y el aumento de grosor de la piel en el dorso, calculando las medias de los animales no irradiados e irradiados.

20 El grosor de la piel en las orejas derecha e izquierda se determinó el día 13. Se calculó la diferencia de grosor de la piel entre las orejas del mismo animal y el valor medio de cada grupo. Los resultados mostrados en la siguiente tabla V están representados gráficamente en las figuras 5 y 6.

Tabla V

Reacción de hipersensibilidad determinada por el grosor de la oreja					
	<b>Irradiación MED</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Inducción</b>	<b>Δ grosor de orejas 10<sup>-2</sup> mm ± s/√n</b>	<b>% de inhibición de CHS por irradiación</b>
1	0	-	Acetona	1,1 ± 0,2	
2	0	-	DNFB 0,3%	19,3 ± 0,4	
3	2,5	-	Acetona	1,0 ± 0,2	
4	2,5	-	DNFB 0,3%	7,5 ± 0,2	61,1
5	0	Medio de cultivo	Acetona	1,0 ± 0,1	
6	0	Medio de cultivo	DNFB 0,3%	19,0 ± 0,2	0
7	2,5	Medio de cultivo	Acetona	1,0 ± 0,2	
8	2,5	Medio de cultivo	DNFB 0,3%	7,4 ± 0,1	61,6
9	0	La1 vivo	Acetona	1,1 ± 0,3	
10	0	La1 vivo	DNFB 0,3%	18,9 ± 0,2	0

11	2,5	La1 vivo	Acetona	1,3 ± 0,2	
12	2,5	La1 vivo	DNFB 0,3%	15,4 ± 0,2	20,2
13	0	La1 muerto	Acetona	1,3 ± 0,2	
14	0	La1 muerto	DNFB 0,3%	19,4 ± 0,3	0
15	2,5	La1 muerto	Acetona	1,4 ± 0,1	
16	2,5	La1 muerto	DNFB 0,3%	9,6 ± 0,3	50,3
17	0	Sobrenadante de cultivo de La1	Acetona	1,1 ± ,2	
18	0	Sobrenadante de cultivo de La1	DNFB 0,3%	19,5 ± 0,4	0
19	2,5	Sobrenadante de cultivo de La1	Acetona	1,1 ± 0,3	
20	2,5	Sobrenadante de cultivo de La1	DNFB 0,3%	7,4 ± 0,1	61,7
21	0	ST11 vivo	Acetona	0,6 ± 0,2	
22	0	ST11 vivo	DNFB 0,3%	18,8 ± 0,2	0
23	2,5	ST11 vivo	Acetona	1,1 ± 0,2	
24	2,5	ST11 vivo	DNFB 0,3%	13,2 ± 0,3	31,6

(continuación)

	<b>Irradiación MED</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Inducción</b>	<b>Δ grosor de orejas 10<sup>-2</sup> mm ± s/√n</b>	<b>% de inhibición de CHS por irradiación</b>
25	0	ST11 muerto	Acetona	1,4 ± 0,2	
26	0	ST11 muerto	DNFB 0,3%	19,4 ± 0,4	0
27	2,5	ST11 muerto	Acetona	1,1 ± 0,3	
28	2,5	ST11 muerto	DNFB 0,3%	10,6 ± 0,3	45,1
29	0	Sobrenadante de cultivo de ST11	Acetona	1,0 ± 0,2	
30	0	Sobrenadante de cultivo de ST11	DNFB 0,3%	19,3 ± 0,4	0
31	2,5	Sobrenadante de cultivo de ST11	Acetona	1,2 ± 0,2	
32	2,5	Sobrenadante de cultivo de ST11	DNFB 0,3%	11,0 ± 0,2	43

Como era de esperar la exposición a la luz UV suprimió sistemáticamente la reacción de hipersensibilidad al DNFB en ratones que no recibieron ningún tratamiento y en ratones de control que solo recibieron medio de cultivo. Los

5 ratones que recibieron microorganismos probióticos vivos o sobrenadantes de cultivo de los mismos (medios adaptados) mostraron claramente una recuperación del sistema inmune y desarrollaron una reacción de hipersensibilidad contra el DNFB. A partir de estos resultados resulta obvio que los probióticos, y en cierto grado también sus metabolitos presentes en el sobrenadante de cultivo, son claramente capaces de modular el sistema inmune en un estado de supresión inducido por luz UV, de manera que la respuesta inmune quede sustancialmente restaurada.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una bacteria probiótica de ácido láctico, o de un sobrenadante de cultivo de la misma, en la preparación de un soporte ingerible para disminuir reacciones inflamatorias o alérgicas en la piel inducidas por irradiación UV de la piel e incrementar el sistema inmune cutáneo en un estado inmunosupresor inducido por irradiación UV de la piel.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el cual la bacteria de ácido láctico se escoge del grupo formado por bacterias de ácido láctico, preferiblemente lactobacilos y/o bifidobacterias.
3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la bacteria de ácido láctico es CNCM I-1225 o CNCM I-2116.
- 10 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el soporte se escoge del grupo formado por leche, yogur, requesón, queso, leches fermentadas, productos lácteos fermentados, helados, productos cereales fermentados, leches en polvo, fórmulas infantiles, tabletas, suspensiones líquidas bacterianas, suplementos orales secos, suplementos orales líquidos, alimentación seca por sonda o alimentación líquida por sonda, comida para mascotas o lociones, champús, cremas y/o ungüentos.
- 15 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la cantidad de organismo probiótico contenido en el soporte es aproximadamente de  $10^5$  hasta  $10^{12}$  ufc/g de soporte.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para seres humanos y mascotas, sobre todo para seres humanos y mascotas mayores

Fig.1

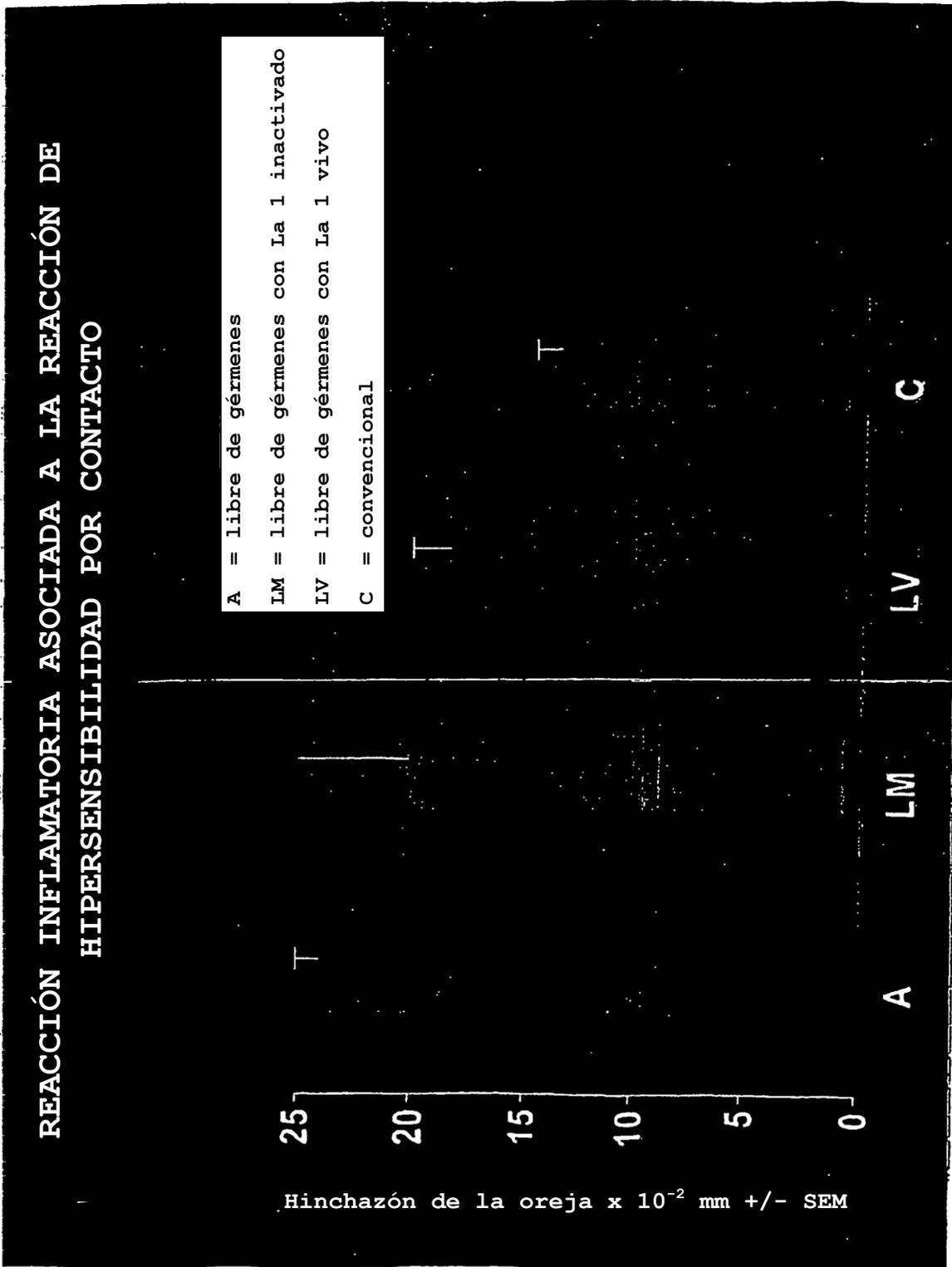


Fig.2

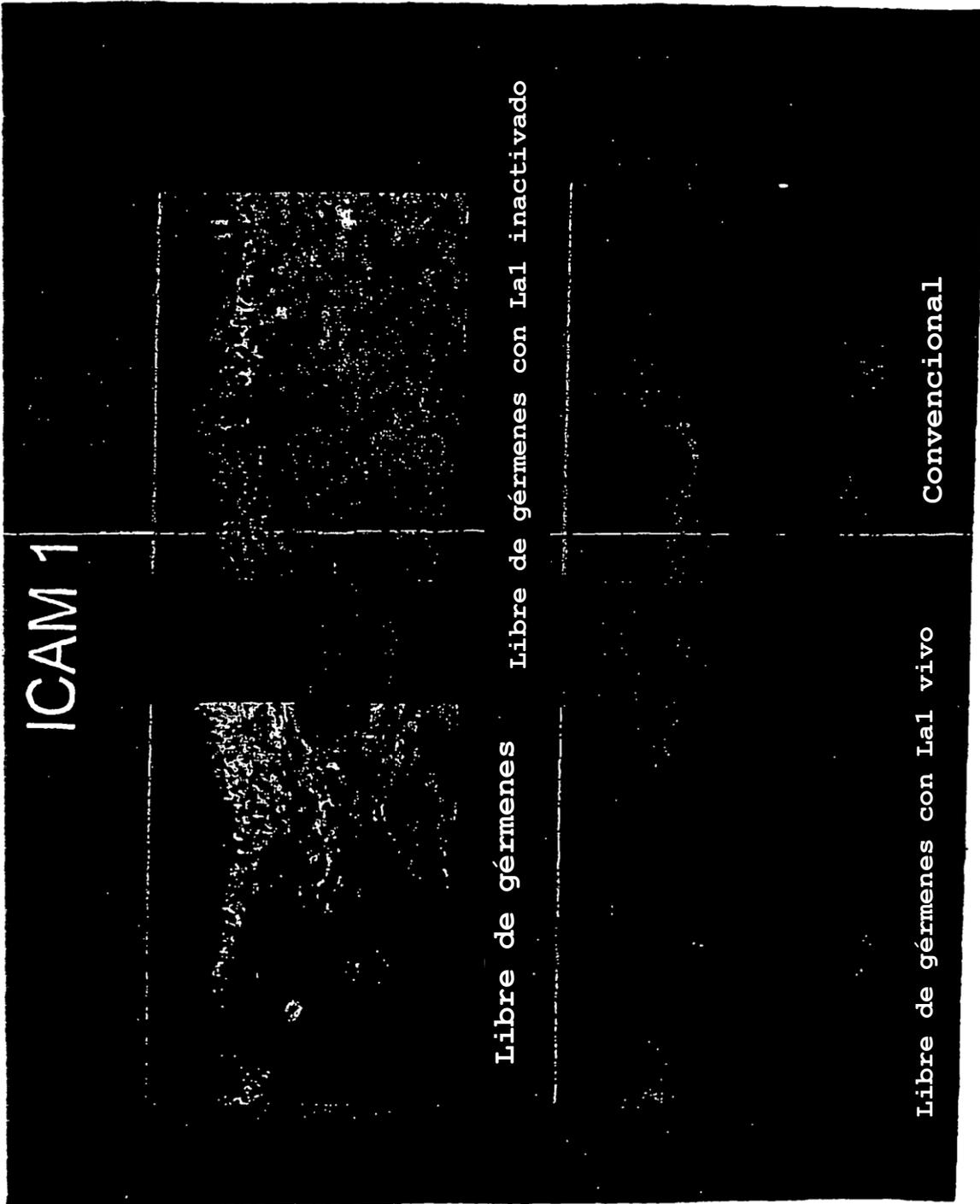


Fig.3

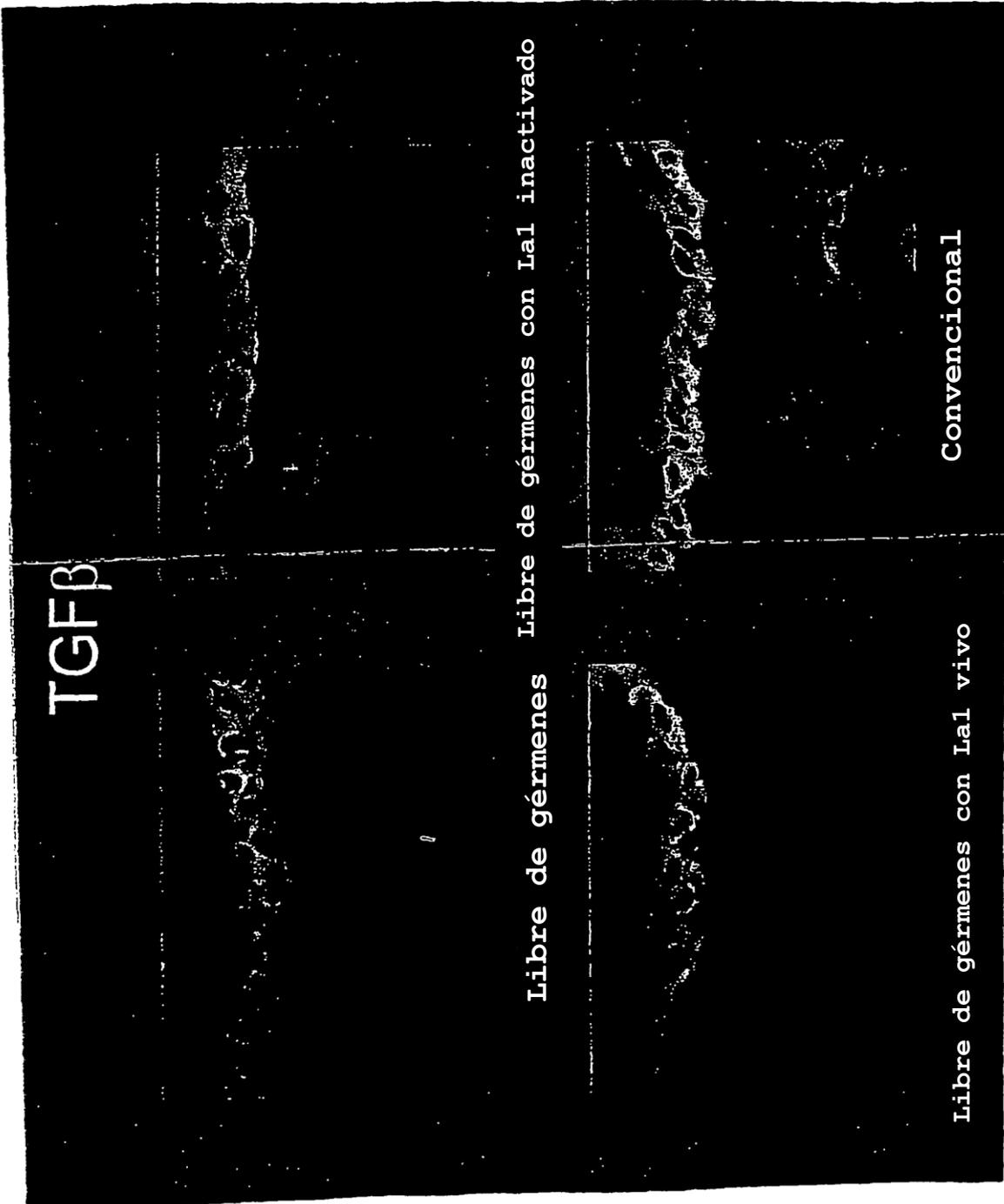


Fig.4

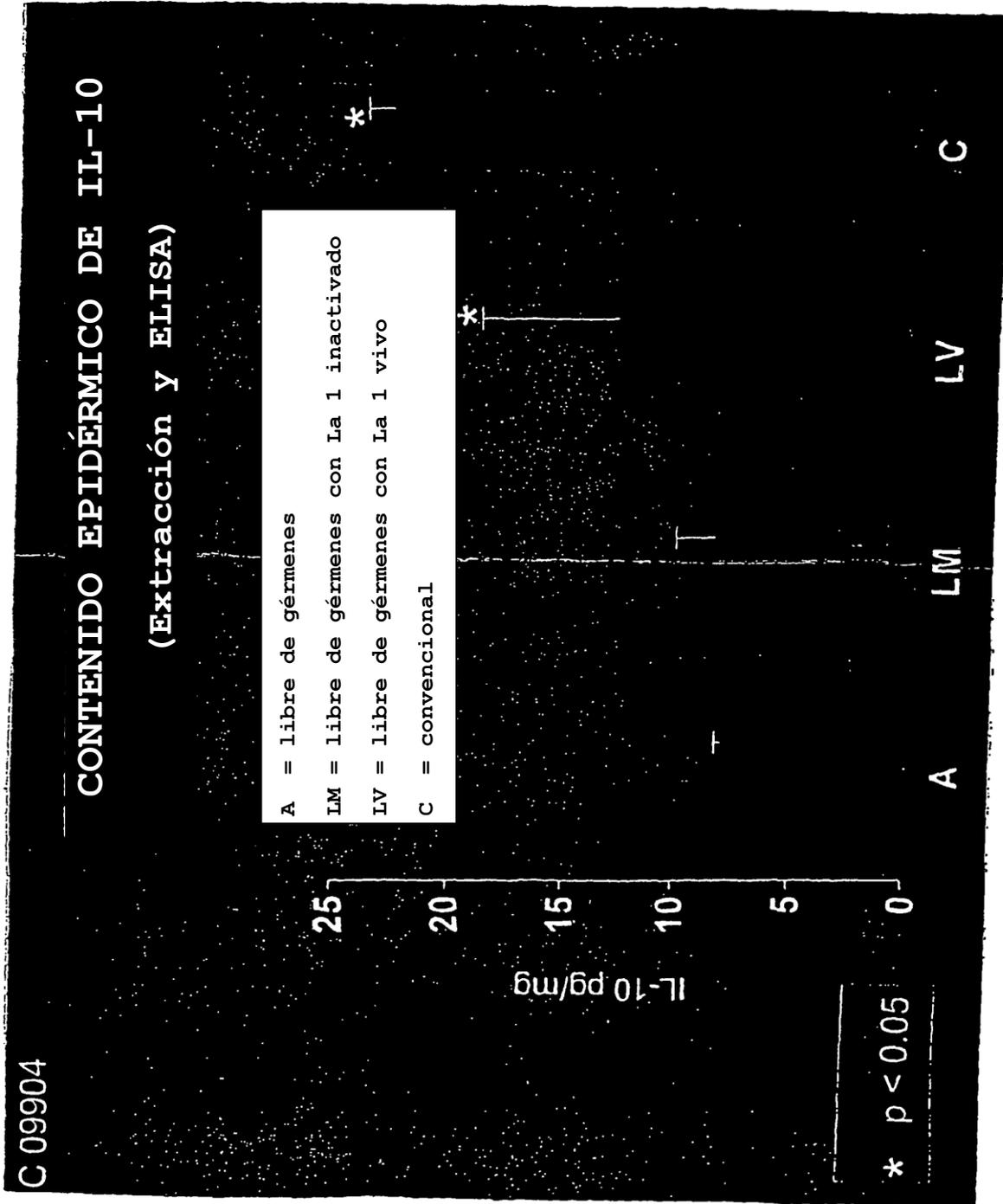


Fig.5

**EFEECTO DE DOS PROBIÓTICOS ADMINISTRADOS POR SO EN LA SUPRESIÓN SISTÉMICA DE CHS (DNFB) INDUCIDA POR RUV**

Lactobacilo: vivo, muerto, o medio adaptado (cepas La1/NCC 533 y ST11/NCC 2461)

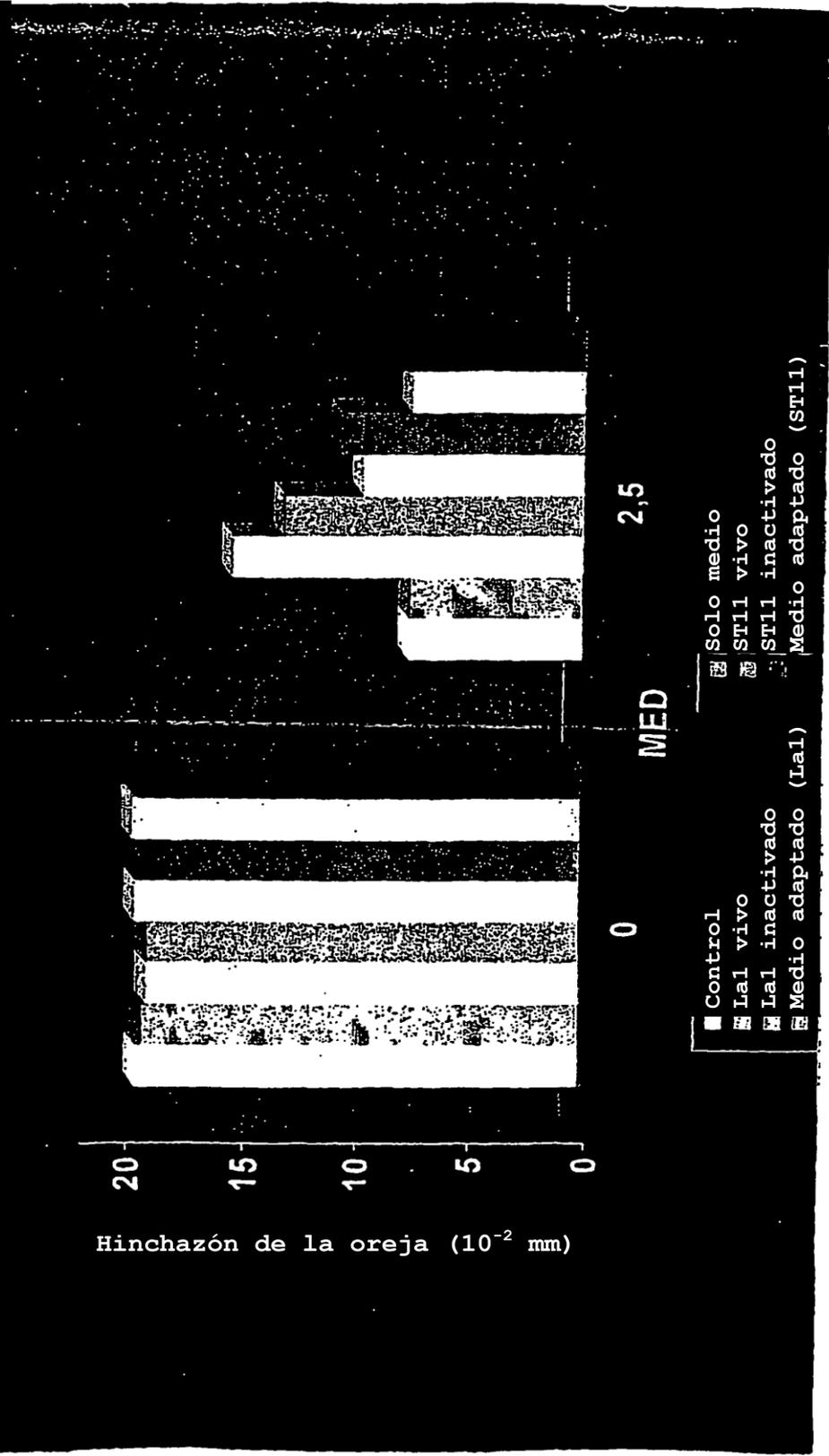


Fig.6

**EFEECTO DE DOS PROBIÓTICOS ADMINISTRADOS POR SO EN LA SUPRESIÓN SISTÉMICA DE CHS (DNFB) INDUCIDA POR RUV**

Lactobacilo: vivo, muerto, o medio adaptado (cepas La1/NCC 533 y ST11/NCC 2461)

