

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 664**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 1/06 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03765107 .2**
96 Fecha de presentación: **23.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1531841**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **PROBIÓTICOS PARA LAS FUNCIONES NEUROMUSCULARES DEL TUBO DIGESTIVO.**

30 Prioridad:
23.07.2002 EP 02078064

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

73 Titular/es:
NESTEC S.A.
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH

72 Inventor/es:
CORTHEZY-THEULAZ, Irène;
VERDU de BERCIK, Elena;
BERCIK, Premysl y
COLLINS, Stephen, Michael

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 664 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).

DESCRIPCIÓN

Probióticos para las funciones neuromusculares del tubo digestivo

5 La presente invención está definida en las reivindicaciones.

Antecedentes

10 Los probióticos se definen en general como un suplemento alimentario microbiano que afecta de forma beneficiosa al huésped humano o animal mejorando su equilibrio microbiano intestinal. Se han descrito o propuesto diferentes efectos beneficiosos de los probióticos, como el desplazamiento de la infección por Helicobacter (PE 0577 903), potenciación de la resistencia a la colonización, especialmente en lo referente a especies de Clostridium, reducción del colesterol en suero, influencia sobre el sistema inmunitario del huésped, por ejemplo a nivel del sistema inmunitario humoral y celular.

15 La PE 0768 375 describe Bifidobacteria que son capaces de implantarse en la flora intestinal, adherirse a las células intestinales y excluir de forma competitiva a bacterias patogénicas en las células intestinales.

20 En WO 98/00035 se describen las composiciones enterales que contienen varias bacterias de ácido láctico, que han demostrado la estimulación del sistema inmunitario, medido por el número de linfocitos T CD4+ periféricos.

25 Cuando los humanos y el resto de mamíferos padecen dolor de estómago o malestar intestinal, a menudo estos son los síntomas de trastornos de motilidad intestinal, o, en otras palabras, de anomalías neuromusculares del intestino.

Los individuos de cualquier edad y en muchas circunstancias están preocupados de anomalías neuromusculares del intestino. Por ejemplo los bebés que padecen de cólicos o dolor abdominal recurrente, mujeres que padecen de dolor intestinal debido a los ciclos hormonales y muchos más.

30 Copia de confirmación

35 En el contexto del síndrome de intestino irritable (SII) el estado de la técnica no es coherente sobre el efecto de los probióticos sobre este síndrome en particular. En un estudio reciente (Niedzielin K et al, Un estudio controlado, aleatorizado, doble ciego, sobre la eficacia de Lactobacillus plantarum 299V en pacientes con síndrome de intestino irritable, European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2001, 13:1143-1147) se describe que los probióticos pueden tener un papel en la regulación de la motilidad del tracto digestivo.

40 Por otro lado, en el artículo de O'Sullivan MA y O'Morain (Suplemento bacteriano en el síndrome de intestino irritable. Un estudio cruzado controlado con placebo, aleatorizado, doble ciego, Dig Liv Dis Mayo 2000; 32(4):302-4) no se encontraron diferencias significativas entre la cepa Lactobacillus casei GG y placebo. Otros estudios previos confirman este último hallazgo.

45 Thompson WG (Probióticos para síndrome de intestino irritable: una luz en la oscuridad?, Eur J gastroenterol Hepatol 13:1135-1136, 2001) discute el tratamiento potencial del SII con probióticos.

Es un objeto de la presente invención aliviar cualquier dolor, o malestar relacionado con el control neuromuscular y función motora de los intestinos alterada.

50 La presente invención posee el objetivo general de reducir y/o aliviar las anomalías intestino-neuromuscular asociadas con cualquier circunstancia posible en la vida de un individuo.

Resumen de la Invención

55 Se puede remarcar, que los microorganismos probióticos, sus metabolitos y/o su sustrato de crecimiento afectan al control neuromuscular de los intestinos. En particular, se ha visto que probióticos específicos son útiles para reducir las anomalías neuromusculares en el tracto gastrointestinal, especialmente tras una infección.

60 En consecuencia, la presente invención proporciona el uso de un probiótico Lactobacillus paracasei en la elaboración de una composición terapéutica nutricional o un medicamento para prevenir o tratar condiciones y enfermedades tal como se ha definido en las reivindicaciones 1-4.

En las figuras,

65 La Figura 1 muestra el área bajo la curva (ABC) de la intensidad de contracción del tejido muscular intestinal tomado de un organismo huésped, que estaba infectado por un parásito nematodo y, 10 días tras la infección, se alimentó con diferentes probióticos y un control.

La estimulación sucedió con carbacol a diferentes concentraciones (los detalles se proporcionan en el Ejemplo 2). El ABC es una medición de la intensidad y pertinacia de la contracción del músculo intestinal y una medición para el grado de anormalidad neuromuscular desarrollada durante la infección. Los símbolos poseen el siguiente significado: \diamond control, \blacksquare *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii), \times *Bifidobacterium longum*, $*$ *Bifidobacterium lactis*, \blacktriangle *Lactobacillus paracasei*. Se puede observar que los probióticos generalmente disminuyen el ABC, mientras que diferentes cepas poseen más efecto y menos pronunciado.

La Figura 2 muestra la contracción tónica (A) y la contracción fásica (B) del tejido muscular tal como se describe en la Figura 1, pero estimulado por un campo eléctrico y compara organismos huésped alimentados con la cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-2116) en su estado vivo (L.p.), estado muerto (L.p. muerto), y solo el sobrenadante del medio (Sn). Los términos aumento tónico y contracción fásica se explican en el Ejemplo 2 y en la Figura 3. Tal como se puede observar, todos los alimentos derivados de probióticos (bacterias vivas o muertas, sobrenadante) presentan claramente un aumento tónico y contracción fásica inferior que el control (MRS).

La Figura 3 muestra los conceptos del método utilizado para determinar las anormalidades neuromusculares tras la infección. La curva muestra el registro de una estimulación de un músculo in vitro. Antes de la estimulación, se registran un tono basal (1) y una fase basal (4). Tras la estimulación, sucede una contracción del músculo, que se registra como tono estimulado (2) y una contracción fásica estimulada (5). También puede calcularse un área bajo la curva (ABC) (7). Para la estadística, se compararon la contracción tónica (3), la contracción fásica (6) y el ABC (7) del control versus en tratamiento.

Descripción detallada de la Invención

Dentro del contexto de esta especificación la palabra "comprende" significa "incluye, entre otras cosas". No pretende significar "consiste únicamente de".

Dentro del contexto de la presente invención, el término "composición terapéutica nutricional" pretende abarcar cualquier materia consumible. Es decir, puede ser un producto ideado para el consumo en humanos, pero el término también abarca productos para el consumo en animales, por ejemplo animales de compañía, como perros, gatos, conejos, cobayas, ratones, ratas, pájaros (por ejemplo loros), reptiles y peces. No obstante, el término también incluye alimentos para consumir por otros animales domesticados, por ejemplo productos alimenticios para el ganado, por ejemplo, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, búfalos, camellos, y similares.

Una composición terapéutica nutricional puede ser un producto alimenticio pensado para el consumo en humanos, por ejemplo, un brebaje, una bebida, una barrita, una merienda, un helado, un producto lácteo, por ejemplo un producto lácteo refrigerado o no perecedero, un producto de confitería, un producto de cereales como cereales para el desayuno, un producto congelado destinado al consumo tras calentar al horno o al microondas, un producto listo para el consumo, una comida rápida o una fórmula nutricional.

Una fórmula nutricional abarca cualquier formulación nutricional completa o suplementaria. Puede ser una fórmula nutricional de aplicabilidad general, una fórmula infantil o para bebés, una fórmula para pacientes ancianos, para pacientes en cuidados intensivos, o por ejemplo una fórmula especialmente adaptada para pacientes que padecen de una enfermedad específica. Por ejemplo la fórmula nutricional puede adaptarse a pacientes que padecen de problemas asociados a la nutrición, como la enfermedad de Crohn, hiperglicemia, obesidad, pérdida de peso, diarrea, estreñimiento, fenilcetonuria, hepatitis, fallo renal crónico o agudo, por mencionar alguno. Dichas fórmulas pueden ser reconstituibles, esto es, presente en una forma liofilizada, o lista para beber, en forma de fórmulas líquidas, por ejemplo.

En el contexto de la presente invención, las condiciones y enfermedades a tratar comprenden todo tipo de síntomas relacionados con el dolor o molestias ligadas a contracciones anormales o alteradas del músculo intestinal, contractibilidad o motilidad. Por ejemplo, estas anormalidades están asociadas con una distensión o defecación alterada, con cólicos en bebés y/o infantes, con invaginaciones intestinales en humanos o mascotas, con tiempo de tránsito en el intestino alterado, tras infección del intestino con parásitos, como nematodos y bacterias patógenas, por ejemplo.

Otras contracciones anormales o alteradas del músculo intestinal en el contexto de la presente invención incluye aquellas asociadas con la infancia como por ejemplo parte de los problemas de los cólicos infantiles, aquellas asociadas con el ejercicio lo que incluye los calambres inducidos por el ejercicio y los problemas neuromusculares asociados con el ejercicio intenso y el atletismo, aquellas asociadas con el embarazo y los trastornos asociados con el nacimiento, aquellos asociados con pacientes clínicos que padecen daños no relacionados, traumatismos e infecciones pero cuyos tratamientos clínicos o situación provocan una pérdida de función neuromuscular intestinal lo que incluye antibióticos, inmovilización y alimentación parenteral o enteral, aquellas asociadas con la edad y la pérdida de control neuromuscular asociado con la actividad reducida, dietas pobres en fibra y cambios en la microflora, aquellas asociadas con dietas atípicas o estilos de vida que incluyen el consumo de etanol, fármacos que

presentas efectos neuromusculares adversos, gravedad alterada en astronautas, calor o frío intenso y problemas de rehidratación.

En muchos casos las contracciones intestinales anormales o alteradas del músculo son persistentes y continúan durante un tiempo prolongado.

5 El uso de acuerdo con la presente invención está relacionado con el dolor intestinal o malestar relacionado o ligado a anomalías musculares.

10 Las "secuelas" son anomalías o desviaciones a partir de un estado saludable que persiste tras la infección, incluso si los parásitos u otros agentes infecciosos se han eliminado del huésped. Se piensa en general que son daños irreversibles provocados al huésped.

15 El "material derivado de probióticos", en el contexto de la presente invención, incluye probióticos vivos o muertos, el medio obtenido mediante fermentación con un probiótico, los metabolitos hallados en el medio tras la fermentación y sus derivados, como los concentrados, por ejemplo, el sustrato de fermentación, el sobrenadante y/o concentrado del medio tras la eliminación de las bacterias probióticas mediante filtración o centrifugación, por ejemplo.

20 En una realización de la presente invención, las contracciones del músculo intestinal anormales o alteradas están provocadas por infecciones de los intestinos por patógenos.

Los patógenos, en el contexto de la presente invención, incluye microorganismos que pueden infectar los intestinos de un individuo y provocar una enfermedad. Así, el término patógeno incluye parásitos, bacterias, virus, organismos pluricelulares como nematodos y otros gusanos, por ejemplo

25 "Probiótico" de acuerdo con la presente invención indica un microorganismo que ejerce efectos beneficiosos en la salud y bienestar de humanos o animales

30 Preferiblemente, el probiótico *Lactobacillus paracasei* es *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-2116, CNCM I- 1292), y mezclas de los mismos.

En aún otra realización de la presente invención, el probiótico incluye bacterias probióticas muertas, sustrato de fermentación y/o material derivado de probiótico.

35 De forma opcional, los probióticos también incluyen el sustrato de fermentación, como los prebióticos. El experto en la materia estará al tanto normalmente de los sustratos de fermentación de los probióticos.

Preparación de probióticos

40 El experto en la materia estará al tanto de la forma de producir el probiótico seleccionado *Lactobacillus paracasei*. También pueden obtenerse por vía comercial o pueden producirse en general mediante un proceso de fermentación y, de forma opcional, por secado. Las cepas específicas a menudo poseen medios particulares o preferencias de sustrato, que el experto en la materia conoce.

45 Los microorganismos estarán en una forma seca, o por ejemplo en forma de spora para los microorganismos que forman esporas. El secado de microorganismos tras la producción por fermentación es conocida por el experto en la materia. Véase por ejemplo, PE 0 818 529 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE), en el que se describe el proceso de secado de la pulverización, o WO 0144440 (INRA). Normalmente, los microorganismos bacterianos están concentrados a partir de un medio y secados mediante un secado por pulverización, un secado en lecho fluido, liofilización (secado por congelación) u otros procedimientos de secado adecuados. Por ejemplo, los microorganismos se mezclan con un material transportador como un carbohidrato, por ejemplo sacarosa, lactosa o maltodextrina, un lípido o una proteína, por ejemplo leche en polvo durante o después del secado.

50 No obstante, los microorganismos no necesitan necesariamente estar presentes en una forma seca. También puede ser adecuado mezclarlos directamente tras la fermentación con un producto alimentario para realizar de forma opcional posteriormente un proceso de secado. Dicha aproximación se describe en WO 02065840 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE). De forma similar, los probióticos pueden, en teoría, consumirse directamente tras la fermentación. El posterior procesado, por ejemplo para el bien de la fabricación de productos alimenticios adecuados, no es una condición previa para las propiedades beneficiosas de los probióticos.

60 El experto en la materia conoce los diferentes proveedores de probióticos. Algunos proveedores suministran los probióticos en una forma encapsulada específica para poder asegurar una alta tasa de supervivencia de los microorganismos durante el paso a través del tracto gastrointestinal o durante el almacenamiento o vida media en estantería del producto.

65 Un ejemplo de un producto que comprende microorganismos con una estabilidad de almacenamiento aumentada sin una pérdida indeseada se describe en PE 0 180 743 y también en WO 02065840 (SOCIETE DES PRODUITS

NESTLE).

5 Los probióticos de acuerdo con la presente invención pueden consumirse por vía entérica en cualquier forma. Pueden añadirse a una composición nutricional, como un producto alimentario. Por otro lado, también pueden consumirse directamente, por ejemplo en una forma seca o directamente tras la producción de biomasa mediante fermentación.

10 Los probióticos pueden, por ejemplo, consumirse en forma fermentada, productos lácteos, como producto lácteo refrigerado, un yogur, o queso fresco. En estos últimos casos, el probiótico puede utilizarse directamente también para producir el producto fermentado en sí y poseer por lo tanto al menos una doble función: las funciones probióticas dentro del contexto de la presente invención y la función de fermentación del sustrato como la leche para producir un yogur.

15 Si el probiótico se añade a una fórmula nutricional, el experto en la materia conoce las posibilidades para lograrlo. Secado, por ejemplo bacterias secadas por pulverización, como las que se pueden obtener mediante el proceso descrito en PE 0 818 529 pueden añadirse directamente a una fórmula nutricional en forma de polvos o a cualquier otro producto alimentario, secado de forma opcional. Por ejemplo, una preparación probiótica en polvo puede añadirse a una fórmula nutricional, cereales para el desayuno, ensaladas, una rebanada de pan antes de su consumo.

20 Las fórmulas nutricionales que comprenden probióticos específicos están en la actualidad disponibles comercialmente. Por ejemplo, las fórmulas de continuación que comprenden probióticos están comercializadas por Nestlé, como el producto "NAN2 o NIDINA2 - con Bifidus", que están especialmente adaptadas a infantes, pueden utilizarse para el propósito de la presente invención, siempre y cuando se proporcionen las cantidades efectivas.

25 Alternativamente, los probióticos secados pueden añadirse a un producto líquido, por ejemplo un brebaje o bebida. Si se pretende consumir la bacteria en su estado vivo, el producto líquido que comprende los probióticos deberá consumirse relativamente rápido tras la adición de los probióticos. No obstante, si las bacterias se añaden a un producto no perecedero, no será necesaria su rápida consumición, siempre que los probióticos sean estables en el brebaje o bebida.

30 La WO 98 10666 describe aun proceso de secado de una composición alimentaria y un cultivo de bacterias probióticas conjuntamente. De acuerdo con esto, los probióticos pueden secarse a la vez con zumos, productos lácteos o leches vegetales, por ejemplo, proporcionando un producto secado que contiene probióticos. Este producto puede reconstituirse más tarde con un líquido acuoso.

Cantidad de probióticos

40 Aunque no es obligatorio, las bacterias probióticas pueden consumirse en su estado vivo con la intención que los microorganismos probióticos lleguen de forma intacta a los intestinos delgados y gruesos, siendo este último colonizado. Si este es el caso, una dosis suficiente de bacterias vivas se consume normalmente cada día para poder alcanzar una colonización exitosa. El experto en la materia conoce estas dosis diarias, que dependen de los microorganismos pero que en general están en el rango entre 10^6 y 10^{14} , preferiblemente entre 10^7 y 10^{13} ufm por día.

45 En el contexto de la presente invención, la cantidad efectiva de probióticos vivos a administrar a un human con un peso corporal de alrededor de 65 kg estará preferiblemente en el rango de 10^{10} y 10^{14} , más preferiblemente, entre 10^{11} y 10^{13} , más preferiblemente entre $1-4 \times 10^{12}$ ufc por día.

50 La cantidad preferible de probiótico vivo corresponde con aproximadamente un envase de yogur de 2dl por día, preparado con una cepa de probiótico, disponible comercialmente. Una porción diaria de un producto alimentario, o, si se prefieren varias porciones diarias, todas estas porciones juntas normalmente estarán enriquecidas con una cantidad efectiva de probióticos tal como se ha indicado antes.

55 No obstante, la enseñanza de la presente invención puede también lograrse con probióticos muertos, con el medio fermentado o simplemente con el sustrato de los probióticos, que normalmente es fibra prebiótica.

60 Por lo tanto, el medio fermentado, incluso si está en esencia libre de probióticos pero comprende los metabolitos de los probióticos puede utilizarse para la presente invención.

65 En otras palabras, los probióticos vivos o muertos, su medio, el sustrato o metabolitos pueden añadirse directamente a los productos alimentarios de la misma forma o de forma similar a la dispuesta anteriormente para los probióticos vivos más específicamente. El medio fermentado, el sustrato o metabolitos pueden separarse de las bacterias tras la fermentación mediante la centrifugación o filtración, por ejemplo. El sobrenadante o el filtrado puede entonces concentrarse, enfriarse, congelarse, secarse, por ejemplo secado por pulverización o utilizarse directamente para la

administración enteral a un individuo. Si el medio fermentado se seca, puede pulverizarse y, tal como se ha descrito antes para los probióticos vivos, añadirse a cualquier producto alimentario.

5 Si el sobrenadante o medio de fermentación debe administrarse a un humano, la cantidad efectiva está en el rango de 0,5 a 3dl, preferiblemente entre 1 y 2 dl de medio de crecimiento, recogido tras 30 a 50 h, preferiblemente entre 45 y 50 h de crecimiento bacteriano. Cuando la densidad de bacterias se estima que está a una DO de 600 nm, se obtiene de forma rutinaria una DO de 2 a 7, que representa el crecimiento correspondiente de 2 a 7×10^8 bacterias por ml. El sobrenadante puede administrarse tras la eliminación de las bacterias mediante filtración, por ejemplo.

10 La cantidad efectiva de sobrenadante corresponde con un envase de yogur de 1 a 2 dl por día, preparado con un probiótico seleccionado, disponible comercialmente.

Con animales, como mascotas, la cantidad efectiva correspondiente de bacterias vivas o sobrenadante se calcula como una función del peso corporal.

15 También es posible homogeneizar el medio fermentado que incluye probióticos y a un procesado posterior de los probióticos destruidos normalmente junto con el medio.

20 Tal como se ha indicado, el sustrato de los probióticos, como la fibra dietética que promueven probióticos específicos pueden utilizarse en la presente invención. Esta es una forma de lograr los efectos de acuerdo con la presente invención de forma indirecta. Al promover el crecimiento de cepas específicas de probióticos en el tracto intestinal, pueden lograrse los mismos efectos descritos aquí.

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan solo a modo ilustrativo y de ninguna manera deberán entenderse como limitantes al objeto de la presente solicitud.

Los ejemplos 1 y 2 tienen el objetivo de examinar si las anomalías intestinales, que se desarrollan tras una infección de la mucosa intestinal transitoria y anomalías neuromusculares del intestino en general pueden prevenirse o tratarse mediante un suplemento probiótico.

30 Para examinar estas cuestiones se utilizó un modelo murino que se caracterizó por anomalías neuromusculares persistentes tras un episodio agudo por infección de *Trichinella spiralis*

35 Se encontró así que las bacterias probióticas pueden revertir las anomalías neuromusculares intestinales persistentes tras una infección intestinal.

40 Los resultados sugieren por primera vez que una bacteria probiótica puede interferir con la carga parasitaria durante las infecciones intestinales. También, que alguna de las complicaciones gastrointestinales a largo plazo que aparecen a partir de estas infecciones pueden revertirse mediante probióticos aún cuando la administración se inicia tras el establecimiento de la infección parasitaria. Estos efectos son, tal como se mostró por primera vez, altamente dependientes del probiótico particular utilizado.

Ejemplo 1: Probióticos para la prevención de infección por *T. spiralis* en ratones.

45 Materiales y métodos

Se tomaron para el experimento las siguientes cepas depositadas en la "Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos" (CNCM), así como una cepa probiótica disponible comercialmente.

50 *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) (CNCM I-1225)

Lactobacillus paracasei CNCM I-2116)

55 *Bifidobacterium longum* (CNCM I-2170)

60 *Bifidobacterium lactis* (Colección de cultivos alemana: DSM20215) obtenida de Christian Hansen BioSystems A/S (CHL), 10-12 Boge Allé, P.O Box 407, DK-2970 Horsholm, Dinamarca. Las preparaciones probióticas y dos controles, medio (MRS) o tampón fosfato salino (PBS), se administraron a ratones hembra NIH suizo ($n=5$ por grupo) diariamente durante 10 días antes de la infección por *T. spiralis* (375 larvas). La administración de probiótico continuó durante el experimento. Nueve días después de la infección por *T. spiralis*, los ratones se sacrificaron para contabilizar los gusanos y la actividad mieloperoxidasa (MPO).

65 Las cantidades diarias administradas fueron de 1×10^9 bacterias/ 100 μ l de medio de cultivo /ratón/día de cada bacteria y 100 μ l de medio de crecimiento filtrado /ratón/día en experimentos solo con sobrenadante.

Resultados

No hubieron diferencias en el conteo de gusanos entre los ratones tratados de forma preventiva con MRS o PBS, por lo tanto todos los experimentos utilizaron MRS como único grupo control.

5 Se encontró que los ratones pretratados con la cepa de *Bifidobacterium lactis* tendían a tener conteos de ratones inferiores que los ratones pretratados con MRS y PBS. La cepa de *Lactobacillus acidophilus*, por su parte, parece que aumenta la carga de gusanos. El resto de cepas – durante el periodo de tiempo y las dosis analizadas- no parecen afectar de forma significativa la carga de gusanos.

10 En conclusión, se encontró que las diferentes cepas de probiótico poseen efectos diferentes sobre la carga de gusanos cuando se administran de forma preventiva. Algunas cepas de probiótico específicas, por ejemplo la cepa *Bifidobacterium lactis*, son capaces de reducir la carga de infección mediante parásitos intestinales, por ejemplo nematodos.

15 Ejemplo 2 : Probióticos para el tratamiento de las secuelas de infecciones por *T. spiralis* en ratones.

Materiales y métodos

20 En el segundo experimento, los ratones se infectaron por primera vez con *Trichinella spiralis* (375 larvas), y se alimentaron diariamente con los cinco probióticos anteriores o MRS desde el día 10 al día 21 tras la infección, después se sacrificaron los ratones y los tejidos se extrajeron para los experimentos de contractibilidad in vitro. En el modelo de *T. spiralis*, a pesar del desalojo de parásitos y de la resolución de la inflamación de la mucosa intestinal a los 21 días tras la infección, las anomalías neuromusculares (hipercontractibilidad) persiste.

25 Se analizó la función neuromuscular mediante la medición de la contractibilidad in vitro tras la estimulación farmacológica (carbacol) o eléctrica (EFS) del tejido intestinal situado en baños musculares. El método utilizado es el descrito de acuerdo con Barbara G, Vallance BA, Collins SM Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 1997; 113: 1224-1232. Véase especialmente los capítulos "Tissue Preparation for Contractility Studies" y "Measurement of Contraction".

30 De acuerdo con esto, se tomó una sección de intestino delgado del ratón y se dispuso en una solución oxigenada (95% O₂/ 5% CO₂) de Krebs a 37°C. El extremo opuesto de la sección de intestino está fijado. Un extremo del tejido se conectó a un transductor de fuerza isométrica (modelo FT03C; Grass, Quincy, MA), y el otro al armazón del baño. Las respuestas se registraron en un polígrafo Grass 7E. La estimulación ocurrió con EFS y carbacol (para detalles véase la referencia anterior). Las contracciones estimuladas se analizaron mediante ordenador, en el que se midió el tono basal, la contracción fásica, la contracción tónica y la tensión máxima directamente tras la contracción y se calculó el área bajo la curva. La Figura 3 visualiza los conceptos de tono basal (1), tono estimulado (2) y contracción tónica (3), así como la fásica basal (4), la contracción fásica estimulada (5), la contracción fásica (6) y el área bajo la curva (7).

40 Resultados

45 La figura 1 muestra el área bajo la curva, que tiene en cuenta el periodo de contracción tras la estimulación y la tensión de la contracción en este periodo. Se encontró una clara diferencia (área bajo la curva inferior) entre los ratones alimentados con las cepas de probiótico mencionadas anteriormente y el control, mostrando que en el primer caso las contracciones tras la estimulación son más cortas y/o menos tensas. Los símbolos en la Figura 1 poseen el siguiente significado: ♦ □ control, ■ *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii), x *Bifidobacterium longum*, * *Bifidobacterium lactis*, ▲ *Lactobacillus paracasei*.

50 La Figura 2 muestra la contracción tónica (A) y la contracción fásica (B) del tejido muscular tal como se describe en la Figura 1 pero estimulado mediante un campo eléctrico, y compara los organismos huésped alimentados con la cepa de probiótico *Lactobacillus paracasei* (NCM I-216) (L.p.) en un estado vivo, estado muerto (L.p. muerto), y solo el sobrenadante del medio (Sn). El control es medio MRS. Puede observarse que 21 días tras la infección la tensión de la contracción está claramente reducida en los músculos intestinales derivados de ratón alimentados con probióticos (vivo, muerto, Sn) si se compara con ratones alimentados solo con MRS. Los valores se aproximan a los valores de ratones sin infectar.

Conclusión

60 Los resultados conducen a la conclusión que los probióticos son capaces de normalizar el estado hipercontráctil tras la infección de los músculos intestinales. En otras palabras los probióticos reducen las secuelas que persisten tras la infección del tracto gastrointestinal. Estos efectos son diferentes según la cepa, y en el presente experimento, fueron más sustanciales con la cepa de probiótico *Lactobacillus paracasei* (NCM I-216) y están presentes con todas las cepas de *Bifidobacterium* que se seleccionaron para el experimento.

65

5 La conclusión general que se extrae del experimento es que las cepas probióticas específicas *Lactobacillus paracasei*, como *Lactobacillus paracasei* (NCM I-2116), son capaces de ejercer directamente contractibilidad muscular. Este hallazgo general tiene como consecuencia que, de forma general, las anormalidades gastrointestinales neuromusculares (contracciones intestinales), que ocurren muchas veces durante la vida de un individuo, pueden remediarse, tratarse y/o prevenirse mediante la administración de probióticos adecuados.

10 Las contracciones anormales del intestino ocurren en bebés, infantes, adolescentes y adultos que padecen cólicos, dolor intestinal o malestar intestinal, y como tales aquellos descritos en IBS. Las contracciones intestinales anormales pueden provocar invaginaciones intestinales en humanos y mascotas, que pueden conducir a una distensión intestinal y a un tiempo de tránsito irregular e inapropiado a través del intestino.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un probiótico *Lactobacillus paracasei* en la elaboración de una composición terapéutica nutricional o un medicamento para prevenir o reducir las contracciones, contractibilidad o movilidad anormal o alterada del músculo intestinal tras la infección y dolor o malestar relacionados con los síntomas ligados a dichas anormalidades.
- 10 2. El uso de un probiótico *Lactobacillus paracasei* en la elaboración de una composición terapéutica nutricional o un medicamento para tratar el síndrome del intestino irritable.
- 15 3. El uso de un probiótico *Lactobacillus paracasei* en la elaboración de una composición terapéutica nutricional o un medicamento para prevenir o tratar las contracciones, contractibilidad o movilidad anormal o alterada del músculo intestinal asociado con el ejercicio intenso y el atletismo.
- 20 4. El uso de un probiótico *Lactobacillus paracasei* en la elaboración de una composición terapéutica nutricional o un medicamento para prevenir o tratar el cólico en infantes.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el probiótico *Lactobacillus paracasei* se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-2116, CNCM I-1292), y mezclas de los mismos.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el probiótico incluye bacterias probióticas muertas, sustrato de fermentación y/o material derivado de probióticos.

Figura 1

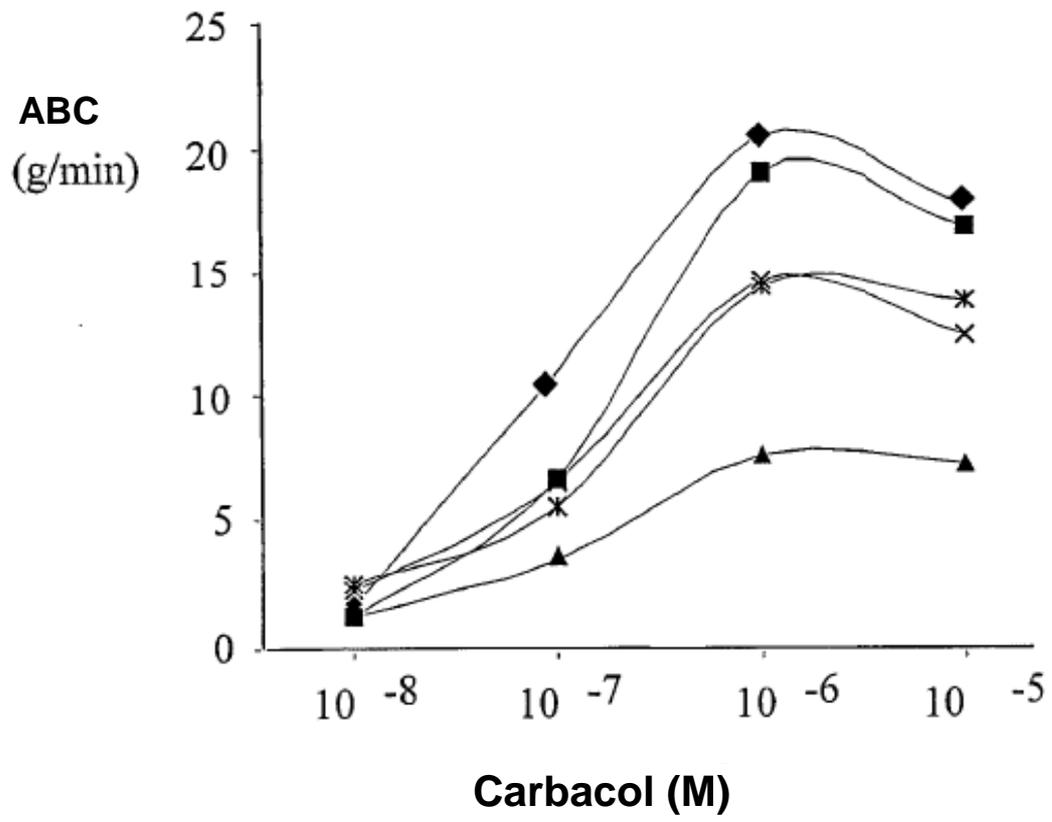


Figura 2A

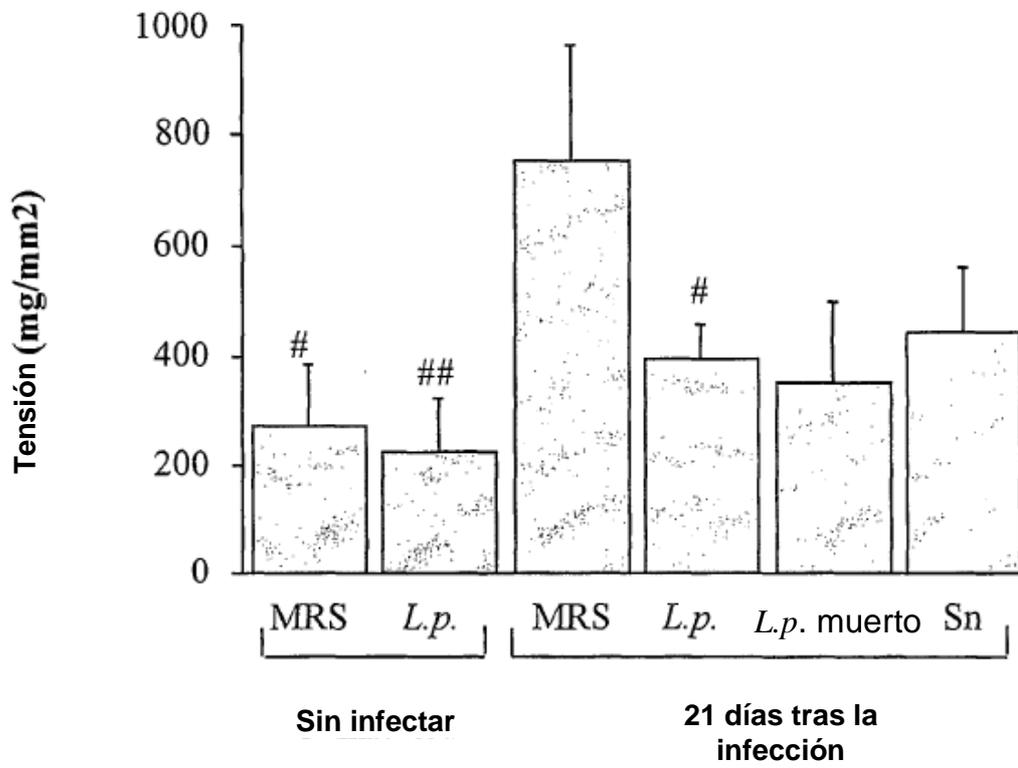


Figura 2B

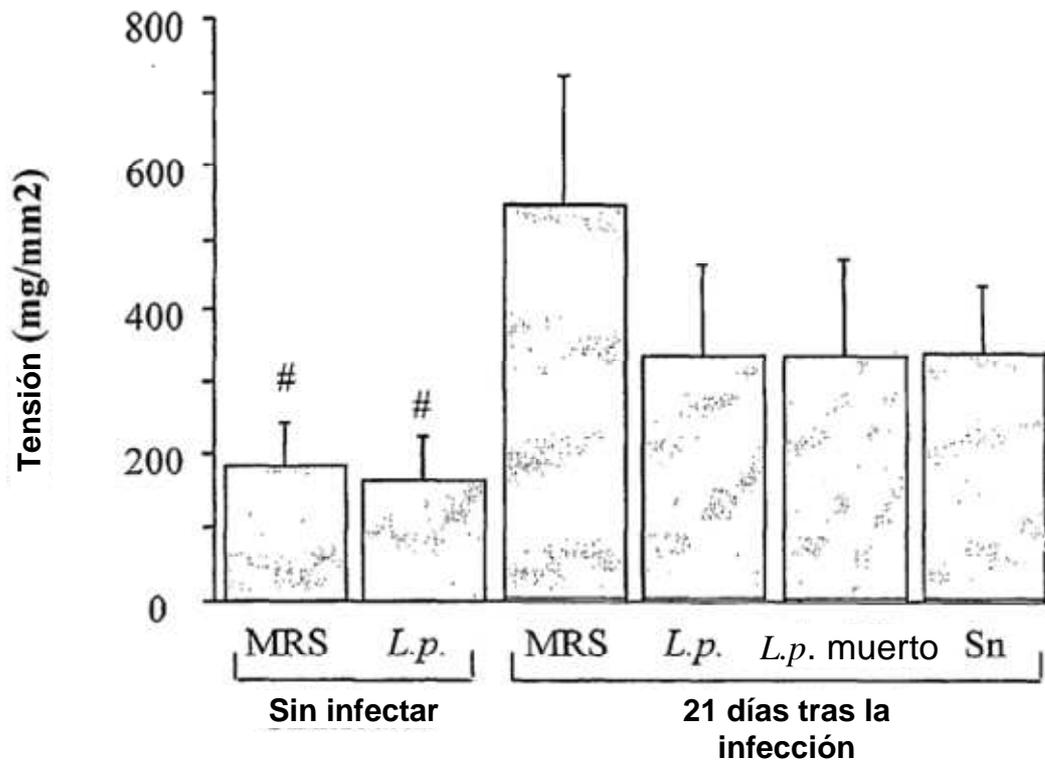


Figura 3

