

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 930**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04725573 .2**
- 96 Fecha de presentación: **02.04.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1613740**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Composiciones que comprenden cepas de lactobacillus plantarum en combinación con tanino y nuevas cepas de lactobacillus plantarum**

30 Prioridad:
04.04.2003 SE 0300994
16.04.2003 US 463058 P

73 Titular/es:
PROBI AB
SÖLVEGATAN 41
223 70 LÜND, SE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

72 Inventor/es:
MOLIN, Göran;
AHRNÉ , Siv y
JEPPSSON, Bengt

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 930 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

Composiciones que comprenden cepas de *Lactobacillus plantarum* en combinación con tanino y nuevas cepas de *Lactobacillus plantarum*

- 5 La presente invención se refiere a una composición que tiene propiedades antiinflamatorias y un efecto controlador sobre la microflora intestinal *in vivo* y propiedades de conservación *in vitro*, comprendiendo dicha composición una nueva cepa opcional productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum*, HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, que tiene una capacidad pronunciada para adherirse a la mucosa intestinal humana.

Antecedentes

- 10 Los taninos, definidos como productos fenólicos solubles en agua que pueden precipitar proteínas de solución acuosa, son compuestos de origen natural. Existen dos clases de taninos, los taninos hidrolizables, que derivan de ácido gálico y ácido elálgico, y los taninos condensados, es decir proantocianidinas, que son oligómeros y polímeros de flavonoles. Los taninos inhiben el crecimiento de varios microorganismos y son resistentes a ataques microbianos (Chug, K.T., y col (1998), Tannins and human health: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition
- 15 38:421-464). Los mohos y levaduras y algunas bacterias aerobias están habitualmente mejor equipados para degradar taninos pero también se produce degradación anaerobia, por ejemplo, en el tracto intestinal (Bhat, T.K., y col (1998), Microbial degradation of tannins - A current perspective. Biodegradation 9:343-357).

- Los taninos se conocen como antinutrientes, es decir, reducen la eficacia del cuerpo para convertir nutrientes digeridos en nuevas sustancias corporales. Sin embargo, también se han indicado efectos beneficiosos para la salud de los taninos, por ejemplo, efectos anticarcinogénicos, capacidad para reducir la presión sanguínea y para modular las respuestas inmunes. Estos efectos podrían deberse a las propiedades antioxidativas de los taninos (Chung y col. 1998). Un tanino antioxidativo eficaz con propiedades anticancerígenas notificadas es el ácido elálgico. Otro tipo de tanino con capacidad antioxidativa excepcionalmente alta son las proantocianidinas, presentes en por ejemplo uvas y aceitunas. Por lo tanto, los taninos presentes en diversas concentraciones en alimentos derivados de plantas tienen efectos importantes en la salud humana. No es recomendable ingerir grandes cantidades de taninos puesto que pueden estar implicados en la formación de cáncer y actividad antinutricional, pero el consumo de una pequeña cantidad del tipo correcto de tanino puede ser beneficioso para la salud humana afectando a las enzimas metabólicas, inmuno-modulación u otras funciones (Chung y col. 1998).
- 20
- 25

- Sin embargo, además los productos de degradación anaerobia de muchos taninos, como se producen en el tracto intestinal, pueden generar compuestos con efectos beneficiosos para la salud (Bhat y col 1998). Tales compuestos de degradación son, por ejemplo, derivados de ácidos fenilpropiónico o fenilacético (Bhat y col 1998). Cuando se absorben en el tracto gastrointestinal estos compuestos tienen un efecto antiinflamatorio. Estos compuestos junto con otros productos de degradación de taninos también tienen un efecto antimicrobiano de amplio espectro en el tracto gastrointestinal, que suprime bacterias no deseadas.
- 30

Técnica anterior

- La mayoría de las especies de *Lactobacillus* son incapaces de degradar taninos pero las cepas de las especies cercanamente relacionadas *L. plantarum*, *L. pentosue* y *L. paraplantarum* pueden poseer actividad Tanasa, Osawa, R., y col (2000), Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods, Applied and Environmental Microbiology 66:3093-3097.
- 35

- Algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* poseen una capacidad específica de adherirse a células epiteliales humanas por un mecanismo que se bloquea por la presencia de manosa, Adlerberth, I., y col, (1995), A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. Applied and Environmental Microbiology 62:2244-2251.
- 40

Sumario de la invención

- Se ha descubierto ahora que cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas de *Lactobacillus plantarum*, HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, con la capacidad para adherirse a mucosa intestinal humana y que tienen la capacidad de producir tanasa, cuando se degradan taninos, producen compuestos que contrarrestan bacterias adversas en el tracto gastrointestinal (GI) y tienen un efecto antiinflamatorio cuando se absorben en el tracto GI.
- 45

Breve descripción de los dibujos

- La Figura muestra fragmentos de ADN separados obtenidos escindiendo ADN cromosómico de las cepas *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 (carril 2), HEAL 19 (carril 3), 299v (carril 4) y HEAL 99 (carril 5) con la enzima de restricción EcoRI. Se usó marcador de ADN de alto peso molecular (BRL) y marcador de peso molecular de ADN VI (Roche) como patrones (carril 1).
- 50

Descripción de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición que comprende una o más cepas productoras de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, con capacidad para adherirse a mucosa intestinal humana en combinación con tanino. Dicha composición producirá *in vivo* compuestos que tienen un efecto antimicrobiano y antiinflamatorio, e *in vitro* producen compuestos que tienen un efecto conservador.
- La invención también se refiere a una composición que comprende una o más cepas productoras de tanasa de *Lactobacillus* seleccionadas de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, en combinación con tanino y un vehículo.
- 10 Los ejemplos de vehículos son papilla de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente. Para mejorar la proliferación de las bacterias y aumentar la producción de derivados antiinflamatorios o conservantes pueden añadirse fibras dietéticas a la composición. Las fibras dietéticas, tales como fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, lactulosa, maltodextrinas, β -glucanos y goma guar, también pueden usarse como un vehículo.
- 15 La invención se refiere especialmente a una composición alimentaria que comprende una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus* seleccionada de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, junto con fracciones de taninos más o menos puras de, por ejemplo, ácido elágico, flavonoides como proantocianidinas y antocianidinas, o lignanos, o con componentes alimentarios ricos en taninos, como por ejemplo, avena, cebada, sorgo rojo, harina hecha de la corteza interior del pino y zumo o extractos de uvas, cítricos, arándanos rojos, arándanos, grosella, arándanos agrios, fresas, frambuesas y escaramujos.
- 20 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus* seleccionada de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, junto con fracciones de taninos más o menos puras de, por ejemplo, ácido elágico, flavonoides, tales como proantocianidinas o antocianidinas, o lignanos, o cualquier otra fuente farmacéuticamente aceptable de taninos.
- 25 Para conseguir un efecto profiláctico o curativo de las composiciones de la invención el contenido de taninos debería ser preferentemente de aproximadamente 500-1000 mg por día. En el caso de por ejemplo polvo de escaramujo, este debería corresponder aproximadamente a 100 g, o en forma de sopa de escaramujo, 4 litros.
- 30 Los taninos son productos fenólicos solubles en agua de diverso peso molecular que pueden precipitar proteínas de solución acuosa. Existen dos clases de taninos, los taninos hidrolizables, que derivan de ácido gálico y ácido elágico, y los taninos condensados, es decir proantocianidinas, que son oligómeros y polímeros de flavonoles.
- Los taninos llamados condensados, o no hidrolizables, son más resistentes a degradación microbiana que los taninos hidrolizables. Los taninos se encuentran habitualmente en fruta y semillas tales como uvas, manzana, plátanos, zarzamoras, arándanos agrios, frambuesas, fresas, aceitunas, judías, granos de sorgo, cebada y mijo de
- 35 dedo, coca, té y café.
- La composición de la invención puede ser una composición alimentaria en la que el vehículo es un producto alimentario. En una composición farmacéutica, el vehículo debería ser un vehículo terapéuticamente aceptable. La composición puede proporcionarse al consumidor medio para mejorar medidas de mantenimiento en forma para evitar posibles futuras enfermedades como infecciones derivadas de GI, diabetes, enfermedades inflamatorias del
- 40 intestino (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), cáncer o enfermedades cardiovasculares, o para mitigar las enfermedades ejemplificadas.
- La composición farmacéutica de la invención puede formularse por ejemplo en suspensiones, comprimidos, cápsulas y polvos, que pueden administrarse por vía oral. Dichas formulaciones también pueden administrarse como un enema.
- 45 La presente invención se refiere especialmente a una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, que tiene la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal humana, que se caracteriza por tener una actividad tanasa determinada por el procedimiento descrito por Osawa y Walsh, en Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, N° 4, Abril de 1993, págs. 1251-1252, que presenta las cepas
- 50 *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, y *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843.
- Las cepas productoras de tanasa preferidas pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum* y tienen la capacidad de sobrevivir en el tracto gastrointestinal (GI). La supervivencia en este contexto significa que las cepas tendrán la capacidad de metabolizar y multiplicarse (vivir) en el tracto gastrointestinal durante un tiempo.
- 55 De acuerdo con un aspecto preferido la invención se refiere a las siguientes nuevas cepas, que se han depositado todas en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, el 28 de noviembre de 2002 y a las

que se ha proporcionado un número de depósito, es decir, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, así como a variantes de las mismas que tienen esencialmente el mismo patrón REA.

5 Las nuevas cepas se han aislado de mucosa de colon de adultos sanos y se han seleccionado cultivando en agar Rogosa. Las cepas se han caracterizado posteriormente por REA.

10 De acuerdo con otro aspecto la invención también se refiere al uso de cepa productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada de *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, en combinación con taninos para la preparación de un medicamento para tratamiento profiláctico o curativo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), infecciones gastrointestinales, diabetes, cáncer, enfermedad de Alzheimer o enfermedades con origen autoinmune. Los ejemplos de cepas productoras de tanasa son las nuevas cepas HEAL 9, HEAL 19 y HEAL 99.

La cantidad de bacterias productoras de tanasa a usar en las composiciones de la invención preferentemente no debería ser menos de 10^9 ufc/dosis y día.

15 De acuerdo con otro aspecto la invención se refiere al uso de una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus* junto con taninos para conservar el alimento. Los ejemplos de cepas productoras de tanasa son las nuevas cepas HEAL 9, HEAL 19 y HEAL 99. Dichas cepas producirán después conservantes directamente en el producto alimentario a partir de la degradación de taninos. Los taninos podrían asegurarse complementando el producto con fracciones puras de taninos o complementando el producto con suplementos naturales, menos definidos, ricos en taninos, como por ejemplo, escaramujo, sorgo rojo o harina hecha de la corteza interior del pino.

Las mezclas de cepas de *Lactobacillus* que utilizan taninos y taninos pueden proporcionarse para fines terapéuticos o como una acción de mantenimiento en forma para reducir factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, diabetes, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), infecciones gastrointestinales o enfermedades con un origen autoinmune.

25 Las cepas *L. plantarum* HEAL 9, HEAL 19 y HEAL 99 tienen mayor capacidad para adherirse a células de la mucosa colónica humana que la cepa *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843.

Parte experimental

Aislamiento de cepas

30 Se ensayaron 42 cepas de *Lactobacillus* diferentes recién aisladas y se compararon con la cepa de referencia probiótica bien conocida *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, con respecto a su capacidad para producir tanasa, es decir, degradar taninos. Las cepas se enumeran en la Tabla 1 posteriormente.

Procedimiento de exploración

El procedimiento aplicado para detectar actividad tanasa se ha descrito previamente por Osawa y Walsh (1993). El principio de detección es que la degradación del tanino, metilgalato, se mide por el siguiente procedimiento:

35 La bacteria de ensayo se cultiva de forma anaerobia en agar MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 2 días a 37 °C y después las células se recogen y suspenden en 5 ml de NaCl 0,9 % (p/v). La suspensión celular se centrifuga y las células se resuspenden en 10 ml de NaCl 0,9 % y la absorbancia se mide a 620 nm (solución de NaCl 0,9 % como patrón). La suspensión celular se diluye hasta que la absorbancia está entre 0,1 y 0,6 (espectrofotómetro, Pharmacia LKB, No-vaspec II). Después de centrifugación, las células se resuspenden en 1 ml de tampón de metilgalato (metilgalato 3,7 g/l [Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, Estados Unidos], NaH_2PO_4 4,5 g/l, pH = 5,0 [esterilizado por filtración]) y el tubo se incuba a 37 °C durante 24 horas. Se añade un ml de tampón de NaHCO_3 (42 g de NaHCO_3 por litro, pH = 8,6) y la solución se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de medición de la absorbancia a 440 nm (tampón NaHCO_3 como patrón). El color de la suspensión se mide por determinación visual.

45 El color debería ser marrón o verde para clasificarse como actividad tanasa positiva. Se obtuvo un valor cuantitativo de la actividad tanasa por la relación entre la absorbancia de la suspensión celular (A_{620} ; cantidad de células) al comienzo de la incubación con metilgalato frente a la absorbancia después de la incubación de 24 horas con metilgalato (A_{440} ; coloración de ácidos gálicos libres después de exposición a oxígeno en una condición alcalina).

Resultados

50 El resultado de la exploración para cepas de *Lactobacillus* que poseen actividad tanasa se muestra en la Tabla 1. La mayoría de las cepas ensayadas no tenía ninguna actividad tanasa. Sin embargo, 11 cepas fueron positivas y se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad tanasa en diferentes cepas de *Lactobacillus*

Organismo	Cepa	Actividad Tanasa* (positiva o negativa)	Actividad Tanasa cuantitativa ** (A ₄₄₀ /A ₆₂₀)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v DSM 9843	+	6,2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP2	+	4,9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP5	+	3,3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4LF:1	+	6,1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	17LF:1	+	5,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 9	+	6,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 15312		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 19	+	7,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 15313		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 99	+	6,8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 15316		

* La actividad tanasa positiva se muestra como una coloración de verde a marrón de ácido gálico libre en la suspensión celular después de exposición prolongada a oxígeno en una condición alcalina.

** La actividad tanasa expresada como la relación entre la absorbancia de la suspensión celular a 620 nm (A₆₂₀) al comienzo de la incubación de 24 horas con metilgalato frente a la absorbancia a 440 nm (A₄₄₀) después de la incubación con metilgalato (A₄₄₀).

Tres de las cepas de *L. plantarum* positivas para tanasa tenían una actividad tanasa mayor que la cepa probiótica bien conocida *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, es decir, *L. plantarum* HEAL 9, *L. plantarum* HEAL 19 y *L. plantarum* HEAL 99. Se han aislado de mucosa intestinal humana sana.

5 Identificación genotípica por REA

Las cepas se examinaron con respecto al patrón de escisión del ADN cromosómico, a través del procedimiento de análisis por endonucleasa de restricción, REA, de acuerdo con Ståhl M, G Molin, Persson A, Ahrné S & S Ståhl, International Journal of Systematic Bacteriology, 40:189-193, 1990, y desarrollado adicionalmente por Johansson, M-L, y col, International Journal of Systematic Bacteriology 45:670-675, 1995. Esquemáticamente REA puede describirse como sigue: se prepara ADN cromosómico de las cepas implicadas en el estudio y se escinde por endonucleasas de restricción. Se digirieron por separado 0,75 µg de cada ADN a 37 °C durante 4 horas con 10 unidades de EcoRI y Hind III; cada endonucleasa se usó por separado. Los fragmentos de ADN escindidos se separan con respecto a tamaño por electroforesis en gel usando geles de bloque de agarosa horizontal sumergidos. Los geles consistían en 150 ml de agarosa 0,9 % (calidad de ADN ultrapuro; electroendosmosis baja; BioRad Laboratories, Richmond, Estados Unidos) y se moldearon como geles en bloque (150 por 235 mm). Se usaron 0,2 µg del marcador de ADN de alto peso molecular (Bethesda Research Laboratories, MD, Estados Unidos) junto con 0,5 µg de un marcador de peso molecular de ADN VI (Roche, Alemania) como patrones. Se consiguieron distorsión de banda mínima y nitidez máxima aplicando el ADN de muestra en tampón de carga Ficoll (2 g de Ficoll, 8 ml de agua, bromofenol 0,25 %).

20 Los geles se procesaron a una tensión constante de 40 V durante 18 horas a aproximadamente 6-8 °C. El tampón (Tris 89 mM, H₃PO₄ 23 mM, EDTA sódico 2 mM, pH 8,3) se recirculó durante el período de procesamiento. A continuación, los geles se tiñeron durante 20 minutos en bromuro de etidio (2 µg/ml) y se destiñeron en agua destilada, se visualizaron a 302 nm con un transiluminador UV (UVP Inc., San Gabriel, Estados Unidos) y se fotografiaron. Esta forma de procesar la electroforesis en gel produjo bandas bien distribuidas y relativamente bien separadas hasta un peso molecular de 1,2 x 10⁶.

Los resultados de los análisis se presentan en la Figura.

Adhesión a células HT-29

30 En total se ensayaron 32 cepas de *L. plantarum* aisladas de mucosa humana con respecto a adherencia a células epiteliales intestinales de la línea celular de carcinoma colónico humano HT-29 con una unión específica de manosa (procedimiento como se describe en Wold, A, y col, Infection and Immunity, octubre de 1988, pp. 2531-2537). Las

5 células de la línea celular de adenocarcinoma humano HT-29 se cultivaron en medio de Eagle complementado con suero de ternero fetal 10 %, L-glutamina 2 mM y gentamicina 50 ig/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, Estados Unidos). Varios días después de que las células hubieran alcanzado la confluencia, se separaron con tampón que contenía EDTA (0,54 mM), se lavaron y se suspendieron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) a 5×10^6 /ml. Las bacterias se recogieron, se lavaron y se suspendieron en HBSS a 5×10^9 /ml (2 x una densidad óptica de 1,5 a 597 nm). Las células, bacterias y HBSS se mezclaron en relación 1:1:3 y se incubaron con rotación por volteo durante 30 minutos a 4EC. Las células se lavaron una vez con PBS helado y se fijaron con formalina tamponada neutra (Histofix, Histolab, Göteborg, Suecia). El número de bacterias unidas a cada una de al menos 40 células se determinó usando microscopía de contraste de interferencia (aumento 500 x, Nikon Optophot, con equipamiento de

10 contraste de interferencia, Bergström Instruments, Göteborg, Suecia) y se calculó el número medio de bacterias por célula.

Todas las cepas excepto las tres cepas HEAL tuvieron valores entre 0,3 y 14 (adhesión en solución salina; los valores correspondientes en presencia de metil-manósido fueron 0,5 y 2,4, respectivamente). La mayoría de las cepas tuvieron un valor menor de 10. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 a continuación.

15

Tabla 2

Organismo	Cepa	Adhesión a células HT-29 (número de bacterias por célula)	
		En solución salina	En presencia de metimansilo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v DSM 9843	11,7	3,4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 9	20	2,1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 99	20	2,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 19	23	5,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 14917 ^T	5,2	2,2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	78B	0,3	0,5

Ensayo en modelo de ratón experimental

Procedimiento

Se dividieron 15 ratones Balb/C en cinco grupos (3 ratones por grupo) y se alimentaron con diferentes combinaciones de alimento normal, polvo de escaramujo (rico en taninos) y la cepa positiva para tanasa

20 *Lactobacillus plantarum* 299v. Los constituyentes se mezclaron con algo de agua para conseguir una consistencia pulposa. A los Grupos 1 y 2 se les proporcionó alimento de ratón normal, el Grupo 3 recibió el alimento normal complementado con polvo de escaramujo (1,6 g por día), el Grupo 4 recibió alimento normal complementado con *L. plantarum* 299v (10^{10} bacterias por dosis) y el Grupo 5 recibió alimento normal complementado tanto con el polvo de escaramujo como con el *L. plantarum* 299v. Los ratones se alimentaron una vez al día durante 6-8 días antes de

25 inducir una lesión de reperfusión/isquemia. La lesión se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo de disección: se proporcionó a los ratones 0,15 ml de solución de Ketamina/Xilacina (7,85 mg/ml y 2,57 mg/ml, respectivamente) por vía subcutánea para anestesiarse. Se realizó una incisión abdominal en la línea media y la arteria mesentérica superior se ocluyó usando lazos vasculares atraumáticos y pinza hemostática. Se inyectaron 1,0 ml de PBS en la cavidad peritoneal para reanimación de fluidos. La arteria se ocluyó durante 30 minutos antes de que se retiraran el

30 lazo vascular y la pinza hemostática y el tejido se observó con respecto a reperfusión inmediata. Después se cerró el abdomen usando una sutura de vicril continuo 3-0. Se permitió que el animal despertara de la anestesia y se retiró de la almohadilla de calentamiento y se situó de nuevo en la jaula. Después de 4 horas y 15 minutos, se proporcionó de nuevo anestesia al animal y se obtuvieron muestras de tejido y heces en el siguiente orden y se colocaron en tubos pesados previamente: tejido de hígado, tejido de mesenterio del íleon y heces del ciego para toma de

35 muestras bacteriológicas y tejido del ciego y el íleon para ensayo colorimétrico con respecto a peroxidación lipídica, y tejido del ciego y el íleon para examinación histológica. Las muestra para evaluación bacteriológica se pesaron y se colocaron en medio de congelación y se congelaron inmediatamente a -70 °C. Las muestras para ensayo colorimétrico (LPO586) se aclararon en PBS, se pesaron, se homogeneizaron, se separaron en alícuotas y después se congelaron inmediatamente a -70 °C.

40 *Procedimientos de análisis*

Se realizó evaluación bacteriológica por conteo viable por incubación anaerobia (BBL Gas Pak Plus, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, Estados Unidos) en agar Rogosa (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37 °C durante 3 días, agar VRBD (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37 °C durante 24 horas y agar de infusión de cerebro-corazón (BHI; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) a 37 °C durante 3 días. También se realizó conteo viable

en BHI de forma aerobia.

Se realizó un ensayo colorimétrico para peroxidación lipídica con la ayuda de un espectrofotómetro y el kit de análisis Bioxytech® LPO-586™ (OxisResearch™, Oxis Health Products, Inc., Portland). El análisis se realizó de acuerdo con la descripción del fabricante.

- 5 La peroxidación lipídica es un mecanismo bien establecido de lesión celular y se usa como un indicador de tensión oxidativa en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen para formar una compleja serie de compuestos incluyendo compuestos de carbonilo reactivos. Los peróxidos de ácido graso poliinsaturado generan malondialdehído (MDA) y 4-hidroxialquenos (HAE) tras la descomposición. La medición de MDA puede usarse como un indicador de peroxidación lipídica. Loo-586™ es un ensayo colorimétrico diseñado para cuantificar MDA y se basa en la reacción de un reactivo cromogénico, N-metil-2-fenilindol con MDA a 45 °C. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol para producir un cromóforo estable con absorbancia máxima a 586 nm.

Resultados

- 15 La peroxidación lipídica medida como malondialdehído (MDA) por gramo de tejido colónico se midió en los ratones tratados de forma diferente y los resultados se presentan en la Tabla 3. La reperfusión/isquemia aumentó el MDA. El pre-tratamiento de ratones con polvo de escaramujo (Grupo 3) o *L. plantarum* 299v (Grupo 4) en el alimento redujo el MDA en comparación con el control positivo (Grupo 2). Sin embargo, el efecto de pre-tratamiento combinado con polvo de escaramujo y *L. plantarum* 299v redujo el MDA de forma mucho más pronunciada (Grupo 5).

Tabla 3. Peroxidación lipídica después de lesión por reperfusión/isquemia en ratones.

Grupo de ratón	Malondialdehído (MDA) por g de tejido colónico [valor de la mediana]
G1. Control A; sin lesión (sin isquemia/reperfusión); alimento normal	4,3
G2. Control B; alimento normal	6,3
G3. Alimento normal + polvo de escaramujo (RHP)	5,1
G4. Alimento normal + <i>L. plantarum</i> 299v	5,8
G5. Alimento normal + RHP + <i>L. plantarum</i> 299v	3.6

- 20 Los resultados del conteo viable se presentan en la Tabla 4. La lesión de reperfusión/isquemia aumentó los conteos viables en BHI y agar Rogosa con un factor de 10 (comparar Grupo 1 y Grupo 2). El polvo de escaramujo solo (Grupo 3) dio como resultado un conteo viable más bajo que las otras alternativas de alimentación. El grupo al que se proporcionó tanto *L. plantarum* 299v como polvo de escaramujo (Grupo 5) mostró el mismo conteo viable que los grupos de lesión de reperfusión/isquemia sin polvo de escaramujo (Grupos 2 y 4) excepto para Enterobacterias que fue más bajo. Sin embargo, el conteo viable en el sustrato que permite el crecimiento de lactobacilos estaba ahora (en el Grupo 5) dominado por *L. plantarum* 299v.

Tabla 4. Flora bacteriana en el ciego después de lesión de reperfusión/isquemia en ratones.

Ratón	Mediana de conteo viable (UFC por g de contenido del ciego)			
	Anaerobios totales	Aerobios totales	Lactobacilos	Enterobacterias
G1. Control A; sin lesión (sin isquemia/reperfusión); alimento normal	2x10 ⁸	1x10 ⁸	5x10 ⁸	3x10 ³
G2. Control B; alimento normal	3x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁹	4x10 ³
G3. Alimento normal + polvo de escaramujo (RHP)	1x10 ⁸	4x10 ⁸	1x10 ⁸	<10 ²
G4. Alimento normal + <i>L. plantarum</i> 299v	3x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	3x10 ³
G5. Alimento normal + RHP + <i>L. plantarum</i> 299v	4x10 ⁹	2x10 ⁹	3x10 ⁹	<10 ²

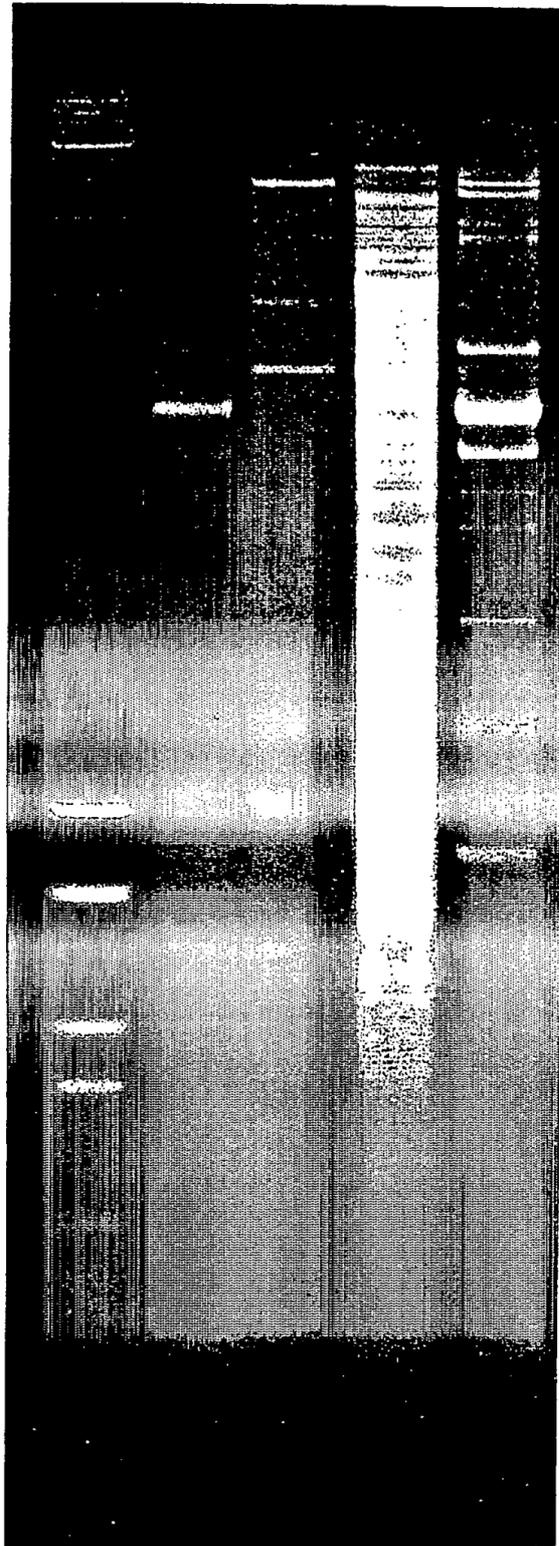
Conclusión

5 Los taninos en el escaramujo redujeron la carga total de bacterias en el intestino de los ratones con lesión, pero cuando se administró a los ratones *L. plantarum* 299v simultáneamente con escaramujo la reducción se mitigó y la reducción inducida por taninos se sustituyó por el *L. plantarum* 299v. Por lo tanto, los taninos soportaron el equilibrio de la flora intestinal a favor de la cepa probiótica. La peroxidación lipídica se mitigó por administración de polvo de escaramujo pero este efecto se potenció por la presencia de *L. plantarum* 299v junto con el polvo de escaramujo.

Las cepas *L. plantarum* 299v HEAL 9, HEAL 19 y HEAL 99 tienen actividad tanasa más alta que *L. plantarum* 299v y además la capacidad para adherirse a células de mucosa colónica humana es más alta que para *L. plantarum* 299v.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una o más cepas productoras de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316 y tanino.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene además un vehículo.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada por** ser una composición alimentaria.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada por** ser una composición farmacéutica.
5. Una cepa productora de tanasa, que es *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312.
6. Una cepa productora de tanasa, que es *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313.
- 10 7. Una cepa productora de tanasa, que es *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316.
8. Uso de una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316 y tanino, para la preparación de un medicamento para tratamiento profiláctico o curativo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), síndrome del
15 intestino irritable (IBS), infecciones gastrointestinales, cáncer, enfermedad de Alzheimer o enfermedades con un origen autoinmune.
9. Una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316 y tanino, para su uso en tratamiento profiláctico o curativo de enfermedades cardiovasculares, diabetes,
20 enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), infecciones gastrointestinales, cáncer, enfermedad de Alzheimer o enfermedades con un origen autoinmune.
10. Uso de una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, en combinación con tanino, para la conservación de alimentos.
- 25 11. Uso de una cepa productora de tanasa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, en combinación con tanino, para la producción de un nuevo alimento.



1 2 3 4 5