

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 497**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)  
**A23C 9/123** (2006.01)  
**A23L 1/03** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)  
**A61P 7/06** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2006 E 06758032 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1904074**

54 Título: **Uso de Lactobacillus para aumentar la absorción de un metal elegido entre Fe, Zn, Ca y sus iones**

30 Prioridad:

**05.07.2005 SE 0501556**

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

**20.09.2013**

73 Titular/es:

**PROBI AB (100.0%)  
Sölvegatan 41  
223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**BERGGREN, ANNA y  
ALENFALL, JAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 423 497 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

Uso de *Lactobacillus* para aumentar la absorción de un metal elegido entre Fe, Zn, Ca y sus iones

## 5 Área técnica de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de al menos una cepa especificada de *Lactobacillus plantarum* para aumentar la absorción, en un mamífero, de metales o iones metálicos escogidos entre Fe y sus iones. La invención se refiere además a una composición farmacéutica que contiene al menos una cepa especificada de *Lactobacillus plantarum*, para usar en el tratamiento de la anemia

## Antecedentes técnicos

15 La deficiencia de hierro y los bajos depósitos de hierro son frecuentes en niños, adolescentes y mujeres en edad fértil, tanto en Occidente como en los países en desarrollo. Una causa de la deficiencia de hierro es la baja biodisponibilidad del hierro de los alimentos, que se debe parcialmente a factores inhibidores de la dieta, como ácido fítico y compuestos fenólicos. Otros factores mejoran la absorción de hierro. Éstos incluyen tejido muscular, ácido ascórbico y algunos otros ácidos orgánicos.

20 El ácido fítico se encuentra principalmente en la fracción de fibra de los cereales, verduras y frutas. El efecto inhibitorio del ácido fítico se debe a la formación de complejos insolubles con hierro al pH intestinal. Una reducción en el contenido de ácido fítico en esos alimentos o una manera de inhibir la unión del complejo con el hierro eliminaría el problema de la baja absorción de hierro de los alimentos que son ricos en él y que de otro modo son considerados saludables y nutritivos. El ácido fítico es hidrolizado por las fitasas que se encuentran en ciertas plantas, microorganismos y tejidos animales. La mayoría de las fitasas de los cereales tienen un pH óptimo en el rango de 5.0 a 5.6. Bajando el pH de los alimentos se pueden activar las fitasas endógenas de los cereales y verduras, y reducir así el contenido de ácido fítico, como por ejemplo en la fermentación ácida de la masa.

30 EP 1 003 532 describe el uso de lactobacilos en la preparación de composiciones entéricas no fermentadas para facilitar o aumentar la absorción de minerales de la dieta. Los únicos experimentos realizados allí para respaldar la absorción reivindicada es un modelo in vitro de las respuestas de calcio o del transporte de calcio utilizando líneas intestinales Caco-2 (una línea de células cancerígenas).

35 De conformidad con la presente invención se ha realizado la absorción de un metal o ion metálico en un estudio in vivo en humanos. Se encontró sorprendentemente que no todos los lactobacilos tienen la absorción deseada que se reivindica en EP 1 003 532. Se encontró además que ciertas cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* logran una sorprendentemente buena absorción de dichos metales o iones metálicos en el organismo.

## Resumen de la invención

40 La presente invención se refiere en un aspecto al uso de al menos una cepa de *Lactobacillus plantarum* elegida del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, para la preparación de una composición para aumentar la absorción de al menos un tipo de metal o ion metálico elegido entre Fe y sus iones, en un mamífero, preferentemente un ser humano.

50 Al proporcionar el uso de las composiciones mencionadas previamente, se puede mejorar significativamente la salud general de los mamíferos, preferentemente los seres humanos y especialmente las mujeres y los niños gracias a la mayor absorción de dichos metales o iones metálicos en el organismo. Por lo tanto, el cuerpo humano puede hacer uso de una porción más grande de los metales o los iones metálicos de los alimentos consumidos, lo que resulta en un mejor estado de salud general y que las personas se sientan mejor. Otra ventaja de la invención es que los individuos no necesitan aumentar el consumo de los respectivos metales o iones metálicos, como Fe, para lograr la absorción deseada. Ésta tendrá lugar sin la adición de cantidades complementarias de los respectivos metales o iones metálicos. Por consiguiente, se pueden evitar los efectos negativos que pudieran derivarse de un aumento en el consumo, por ejemplo de Fe, que en el pasado era la manera de aumentar la absorción de un determinado metal. Los ejemplos de tales efectos negativos que se pueden evitar con la presente invención son cáncer de colon; se ha visto, por ejemplo, que un consumo demasiado alto de Fe puede derivar en cáncer de colon, véase por ejemplo "Iron intake and the risk of colorectal cancer", Wurzelmann JI *et al*, in Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Jul; 5(7):503-7.

60 La invención se refiere en otro aspecto a una composición farmacéutica que contiene al menos una cepa de *Lactobacillus plantarum* elegida del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316.

65

Cualquier trastorno o enfermedad en los que haya una deficiencia de uno de los metales o iones metálicos mencionados antes, se puede tratar o prevenir con el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

## 5 Descripción de la invención

En una realización de la invención, dicho al menos un metal o ion metálico se elige del grupo integrado por Fe y sus iones. Es posible además que dicho al menos un metal o ion metálico esté asociado a otro elemento o unido a un complejo con otro elemento. Por lo tanto, puede tener lugar la mayor absorción de cualquiera de los metales o iones metálicos mencionados, aunque los metales o iones metálicos existan en otra forma.

En otra realización de la invención dicha composición contiene un material portador. Dicho material portador se puede elegir entre el grupo integrado por papilla de harina de avena, alimentos fermentados por ácido láctico, almidón resistente, inulinas, fructanos y alcoholes de azúcar, fibras vegetales, carbohidratos, proteínas, proteínas glucosiladas y lípidos. El portador puede ser además una combinación de los portadores mencionados antes, proporcionando una mezcla de, por ejemplo, un lípido, un carbohidrato y una proteína. Dicho material portador se puede fermentar con una o más de las cepas elegidas del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313.

En otra realización de la invención dicha composición se elige del grupo compuesto por un producto alimenticio, un suplemento alimenticio, un producto nutritivo, un alimento funcional y un alimento médico. Dicho producto alimenticio se puede elegir del grupo integrado por bebidas, yogures, jugos, helados, panes, galletas, cereales, barritas nutritivas y pastas para untar. Las composiciones mencionadas pueden ser fermentadas o no fermentadas, se prefieren las composiciones fermentadas.

En otra realización dicha composición contiene al menos uno de los metales o iones metálicos elegidos del grupo integrado por Fe y sus iones. Al incluir los metales y iones metálicos en la composición que se va a tomar se puede observar una absorción incluso en vista del incremento de la concentración.

En otra realización dicha al menos una cepa de la composición está presente en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^{19}$  UFC, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{12}$ , y más preferentemente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$ .

En otra realización más de la invención dicha composición farmacéutica es una formulación líquida o una formulación sólida. La formulación sólida se puede elegir del grupo integrado por comprimidos, comprimidos para chupar, golosinas, comprimidos masticables, gomas de mascar, cápsulas, sobres, polvos, gránulos, partículas recubiertas y comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas con recubrimiento entérico, y películas y láminas fundentes. Dicha formulación líquida se puede elegir del grupo integrado por soluciones, suspensiones, emulsiones y jarabes orales.

En otra realización dicha composición farmacéutica contiene al menos un tipo de los metales o iones metálicos elegidos del grupo integrado por Fe y sus iones. Dicho al menos un metal o ion metálico puede estar asociado además a otro elemento o unido a un complejo con otro elemento, siempre que se obtenga la absorción deseada.

En otra realización dicha al menos una cepa está presente en la composición farmacéutica en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  UFC, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{12}$ , y más preferentemente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$ .

Aún en otra realización se proporciona una composición que contiene al menos una cepa de *Lactobacillus plantarum* elegida del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, en combinación con al menos un metal o ion metálico elegido del grupo integrado por Fe y sus iones, donde dicho al menos un metal o ion metálico está asociado a otro elemento o unido a un complejo con otro elemento. Dicha al menos una cepa puede ser viable, inactivada o suprimida, o muerta. Dicha al menos una cepa también puede ser genéticamente modificada. Mediante la administración de una composición de la invención se puede promover la salud general de los seres humanos. Especialmente la salud de las mujeres que menstrúan u otras personas con bajos depósitos de hierro puede ser promovida mediante el uso de las composiciones de la invención. Dichos seres humanos no necesitan estar anémicos, pero la salud general se mejoraría.

En otra realización dicha composición contiene un material portador, donde dicho material portador se puede elegir entre el grupo integrado por papilla de harina de avena, alimentos fermentados por ácido láctico, almidón resistente, inulinas, fructanos y alcoholes de azúcar, fibras vegetales, carbohidratos, proteínas, proteínas glucosiladas y lípidos. Dicho material portador se puede fermentar además con una o más de las cepas elegidas del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313.

En una realización de la invención dicha composición se elige del grupo compuesto por un producto alimenticio, un suplemento alimenticio, un producto nutritivo, un alimento funcional y un alimento médico. Dichos productos alimenticios se pueden elegir del grupo integrado por bebidas, yogures, jugos, helados, panes, galletas, cereales, 5  
barritas nutritivas y pastas para untar. Dicha al menos una cepa está presente en la composición en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  UFC, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{12}$ , y más preferentemente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$ .

Una "parte" de una cepa en la presente especificación significa una parte de una célula bacteriana como una parte de ADN, pared celular, membrana celular o cualquier otra parte de la célula bacteriana, que tenga la actividad necesaria para aumentar la absorción de metales o iones metálicos según se describe en este documento. Una parte de una cepa en el presente contexto también podría ser un homogeneizado total o parcial.

Un "metal o un ión metálico" según se usa en este documento significa un metal puro y un ión metálico, respectivamente, como Fe. La absorción dada a conocer en este documento puede tener lugar naturalmente, incluso si dichos metales o iones metálicos están en otra forma como unidos a un complejo o asociados a otro elemento.

"Unido a un complejo con un elemento" o "asociado a un elemento" significa en este documento, cualquier forma de metales o iones metálicos que pueda existir y en la que la absorción deseada siga teniendo lugar.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención parte experimental

#### Experimento 1

En el presente estudio, se estudió el efecto del *L. plantarum* 299v y sus productos de fermentación, del ácido láctico y del ácido acético, en la absorción de hierro no hémico de una comida con baja biodisponibilidad de hierro usando un diseño cruzado. Para probar el efecto específico del *L. plantarum* 299v y los ácidos orgánicos se incluyeron cuatro papillas de avena diferentes: una papilla de avena fermentada con *L. plantarum* 299v activo, una papilla de 25  
avena fermentada pasteurizada con los productos de fermentación, pero las bacterias inactivadas, una papilla de 30  
avena sin fermentar con el pH ajustado y una papilla de avena sin fermentar con agregado de ácidos orgánicos.

#### Sujetos y métodos

##### Sujetos

Se ofrecieron voluntariamente setenta mujeres y se les realizó una evaluación selectiva 2 a 4 semanas antes del estudio. Se seleccionaron 24 mujeres para el estudio basándose en que tuvieran depósitos de hierro relativamente bajos pero que no estuvieran anémicas, es decir, una concentración de ferritina sérica  $\leq 40 \mu\text{g/L}$  y una concentración de hemoglobina  $\geq 110 \text{ g/L}$ . Las 24 voluntarias eran mujeres jóvenes sanas con un promedio de edad ( $\pm$  DE) de  $25 \pm 4$  años, un peso promedio de  $62 \pm 7 \text{ kg}$  y un índice de masa corporal promedio de  $21.3 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$ . Todas las participantes eran no fumadoras y ninguna de ellas estaba embarazada ni en período de lactancia, ni había tomado 40  
vitaminas ni suplementos minerales por  $\geq 2$  meses antes ni durante el estudio. Dieciocho participantes usaban anticonceptivos orales, pero ninguna estaba tomando rutinariamente algún otro medicamento. No se permitió la donación de sangre por  $\geq 2$  meses antes ni durante el estudio. Cada participante recibió información oral y escrita 45  
acerca del estudio antes de proporcionar su consentimiento por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de ética municipal de Copenhague y Frederiksberg, Dinamarca (expediente N° KF 01-219/03) y el National Institute of Radiation Hygiene, Dinamarca.

##### Diseño experimental

El estudio fue un ensayo cruzado completamente aleatorizado, doble ciego, en el cual a cada participante se le sirvieron 4 comidas de prueba: (A) una papilla de avena fermentada, (B) una papilla de avena fermentada pasteurizada, (C) una papilla de avena sin fermentar (pH ajustado con ácido láctico) y (D) una papilla de avena sin 50  
fermentar con agregado de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético).

La absorción del hierro de las 4 comidas de prueba se determinó con el método de doble etiquetado con marcador extrínseco. Utilizando este método se midió la absorción del hierro de las 4 comidas de prueba midiendo la absorción del hierro de 2 comidas de prueba simultáneamente en cada uno de 2 periodos. Las dos comidas de prueba diferentes de cada período se marcaron extrínsecamente con  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$ , respectivamente, y se sirvieron 60  
dos veces en 4 mañanas consecutivas para reducir al mínimo los posibles efectos de la variación día a día, por ejemplo en el orden ABBA. Las comidas se sirvieron en los 12 órdenes posibles y se asignaron al azar a las participantes, para que todas las comidas de prueba fueran igual cantidad de veces la primera comida servida en un período. Esto era importante para poder validar el posible efecto de arrastre de la papilla de avena fermentada con las bacterias de colonización vivas, dentro de un período.

Las actividades de ambos isótopos se midieron en una muestra de sangre 18 días después de la ingestión, en lo sucesivo el segundo periodo se llevó a cabo con las restantes comidas de prueba. La actividad residual del isótopo del primer periodo se restó de los niveles de actividad del isótopo en la muestra de sangre del segundo periodo.

#### 5 Composición de las comidas de prueba y procedimiento de servicio

Las papillas de avena se prepararon a partir de harina de avena mezclada con agua, y después se trataron con enzimas y se pasteurizaron (obtenido por Probi AB). A continuación, la papilla de avena A se fermentó con *L. plantarum* 299v (DSM 9843, recuento de viables  $1.1 \times 10^9$  ufc/g) [20]. La papilla de avena B fue una papilla de avena A pasteurizada (recuento de viables  $<10$  ufc/g), la papilla de avena C fue la papilla de avena básica sin fermentar acidificada con ácido L-láctico hasta un pH equivalente al de las papillas de avena A, B y D, y la papilla de avena D fue una papilla de avena básica sin fermentar con agregado de los ácidos orgánicos, ácido DL-láctico y ácido acético, en cantidades equivalentes a las que se esperaba que se produjeran en la papilla de avena A durante la fermentación. Para cada comida de prueba se sirvió una papilla de avena de 100 g (A, B, C o D) con un panecillo de harina integral de 140 g (60.0 g de harina de trigo, 20.0 g de harina de trigo integral, 2.0 g de sal, 2.0 g de levadura, 16.0 g de aceite de colza, 40.0 g de agua ultra pura) con 10 g de manteca y un vaso de agua ultra pura (200 mL). Las papillas de avena se prepararon del mismo lote y se almacenaron frías (4 °C) hasta que se sirvieron. Los panecillos de harina integral se prepararon en una hornada, se almacenaron congelados y se volvieron a calentar en un horno a 200 °C durante 10 min antes de servirlos.

Las comidas de prueba se sirvieron en la mañana después de 12 h de ayuno. Se permitió la ingesta de un máximo de 0.5 L de agua durante la noche. No se permitió actividad física moderada ni fuerte, ni la ingesta de alcohol o medicamentos, durante las 12 horas anteriores a la ingesta de las comidas. Después de consumir las comidas de prueba, a las participantes no se les permitió comer ni beber durante 2 horas y se les prohibió consumir alcohol durante 24 horas. Las participantes completaron un cuestionario relacionado con cada comida de prueba para asegurar que se habían apegado a todos los procedimientos, y se les indicó que comieran y bebieran alternativamente y que enjuagaran bien, con agua, el vaso que contenía la papilla de avena para garantizar la ingesta total de la dosis del isótopo. Un miembro del personal se aseguró de que todo había sido ingerido.

Durante el período experimental las participantes completaron un cuestionario detallado sobre sus hábitos alimentarios diarios.

#### Isótopos y procedimiento de marcado

Todas las comidas se marcaron extrínsecamente agregando 1 mL de solución de isótopo [ $^{55}\text{FeCl}_3$  (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA) o  $^{59}\text{FeCl}_3$  (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) en 0.1 mol/L HCl] directamente a las papillas de avena 18 h antes de servir las, para el intercambio del isótopo. En el primer período cada dosis contuvo 37 kBq de  $^{55}\text{FeCl}_3$  o  $^{59}\text{FeCl}_3$  y en el segundo período 74 kBq de  $^{55}\text{FeCl}_3$  o  $^{59}\text{FeCl}_3$ .

#### 40 Análisis dietéticos

Las 4 papillas de avena y el pan se liofilizaron, homogeneizaron y analizaron por duplicado para determinar el total de hierro, calcio, zinc y ácido fólico. Se calculó el contenido energético con el uso de una base de datos nacional de composición de alimentos (Danish Tables of Food Composition, DANKOST 2000, versión 1.20, Herlev, Dinamarca). El total de hierro, calcio y zinc se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Spectra-AA 200, Varian, Mulgrave, Australia) después de incinerar por vía húmeda en un sistema solvente de extracción MES 1000 (CEM Corp., Matthews, NC) con 65% (p/v) de ácido nítrico supra puro (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). Se usó un material estándar de referencia de una dieta típica 1548a (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) como referencia para el hierro (media  $\pm$  DE:  $35.3 \pm 3.77$   $\mu\text{g/g}$ ), calcio ( $1.96 \pm 0.11$   $\text{mg/g}$ ) y zinc ( $24.6 \pm 1.79$   $\mu\text{g/g}$ ), y los valores analizados fueron 33.38  $\mu\text{g/g}$ , 2.00  $\text{mg/g}$  y 23.25  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. El ácido fólico se analizó como tri-a hexafosfatos de inositol individuales (IP<sub>3-6</sub>)<sup>1</sup> por cromatografía iónica de alto rendimiento. La concentración de ácidos orgánicos en las papillas de avena se determinó por cromatografía gaseosa capilar.

#### 55 Determinación del estado del hierro

Las restricciones respecto a la ingesta y al ejercicio antes de la extracción de las muestras de sangre fueron las mismas que se describieron para las comidas de prueba. Se extrajeron muestras de sangre de la vena cubital después de que las participantes habían descansado durante 10 min en posición supina. El análisis de hemoglobina se llevó a cabo en sangre venosa (3.5 mL) recogida en tubos que contenían EDTA disuelto (Vacutainer system, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) usando un analizador hematológico automatizado Sysmex KX-21 (Sysmex America Inc., Mundelein, IL) y controles adecuados (Eight check-3WP, 22490822, Sysmex America Inc.). Las variaciones intraensayo y entre ensayos fueron 0.5% ( $n = 12$ ) y 0.6% ( $n = 27$ ), respectivamente. Los análisis de ferritina sérica y  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina (ACT) se llevaron a cabo en sangre venosa (5.0 mL) recogida en tubos simples (sistema Vacutainer, Becton Dickinson). La ferritina sérica se determinó en un analizador Immulite 1000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) mediante un ensayo inmunométrico quimioluminiscente, y también se analizaron sueros de referencia apropiados (3<sup>er</sup> estándar internacional para ferritina (80/578), WHO, NIBSC, South

Mimms, Reino Unido). Las variaciones intraensayo y entre ensayos fueron 2.7% ( $n = 15$ ) y 5.0% ( $n = 15$ ), respectivamente. Se determinó ACT en un analizador Cobas Mira (Roche Diagnostic Systems, F. Hoffman-La Roche Ltd., Basilea, Suiza) con el uso de una técnica inmunoturbidimétrica y también se analizaron sueros de referencia apropiados (material de referencia 470 certificado por la Comisión Europea, N° 11924, IRMM, Geel, Bélgica). Las variaciones intraensayo y entre ensayos fueron 1.4% ( $n = 12$ ) y 3.2% ( $n = 14$ ), respectivamente.

Determinación de la absorción de hierro no hémico

Se determinó la actividad de  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  de muestras de sangre (60 mL) recogidas en tubos que contenían heparina como anticoagulante (Vacutainer system, Becton Dickinson). La determinación simultánea de  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  se realizó por incineración en seco seguida de recristalización y solubilización antes de contar en un analizador de centelleo líquido Tricarb 2100TR (Packard Instruments, Meriden, CT) con corrección de la extinción automática, por el método descrito previamente.

15 Análisis estadístico

Los datos de absorción de hierro no hémico se convirtieron a logaritmos antes del análisis estadístico, y los resultados se volvieron a convertir a antilogaritmos. Todos los datos utilizados para los análisis estadísticos se distribuyeron normalmente, con la homogeneidad de varianzas analizada por gráficas de residuos. La absorción de hierro no hémico de diferentes comidas se comparó usando un modelo lineal mixto con log (absorción de hierro no hémico) como la variable dependiente, comida, comida alternativa y ferritina como variables fijas independientes, y sujeto y sujeto por período de interacción como efectos aleatorios:

25 
$$\text{Log (absorción de hierro no hémico)} = \mu (\text{comida}_i) + \alpha (\text{comida alternativa}_i) + b \times \text{ferritina}_i + A (\text{sujeto}_i) + B (\text{sujeto}_i \times \text{período}_i) + \epsilon_i$$

Los datos se presentan como estimaciones de las medias por mínimos cuadrados y diferencias entre las estimaciones de las medias con un IC del 95%. El análisis estadístico se realizó con el paquete de software estadístico SAS versión 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC), y los valores se consideraron significativamente diferentes para  $P < 0.05$ .

Resultados

Composición de las comidas de prueba

La composición de las comidas de prueba y el contenido de ácidos orgánicos en las papillas de avena se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1 Composición de las comidas de prueba, que incluyen un panecillo de harina integral con manteca, y pH y concentraciones de ácidos orgánicos en las papillas de avena

	Papilla de avena fermentada A	Papilla de avena fermentada pasteurizada B	Papilla de avena básica (pH ajustado) C	Papilla de avena con ácidos orgánicos
Energía (MJ)	2.5	2.5	2.5	2.5
Hierro no hémico (mg)	2.8	2.8	2.5	2.8
Fitato <sup>1</sup> (mg)	403	393	388	344
( $\mu\text{mol}$ )	645	635	621	551
Calcio (mg)	39.6	42.2	39.5	41.1
Zinc (mg)	2.2	2.2	2.1	2.2
Ácido láctico ( $\mu\text{mol/g}$ )	110	89	61	43
Ácido acético ( $\mu\text{mol/g}$ )	4.0	3.7	1.1	3.7
Ácido succínico ( $\mu\text{mol/g}$ )	0.3	0.3	0	0
pH	3.9	4.1	4.2	4.0

<sup>1</sup>Representa los tetra- a hexafosfatos de inositol individuales

Estado de hierro y absorción de hierro no hémico

5 Las concentraciones de hemoglobina en las participantes estuvieron en el rango de 111 a 137 g/L y las concentraciones de ferritina sérica en el rango de 12 a 40 µg/L. Como la concentración de ferritina sérica es sensible a la inflamación, se determinó la proteína de fase aguda ACT en el suero, como marcador de una respuesta de fase aguda. Las concentraciones estuvieron en la región de 0.20 a 0.37 g/L, lo que indica una respuesta de fase no aguda (ACT<0.6 g/L) y por lo tanto una medición válida del estado de hierro de las participantes.

10 La absorción de hierro no hémico de las 4 comidas de prueba calculada del análisis según el modelo lineal mixto se muestra en la tabla 2, véase a continuación.

Tabla 2 Absorción de hierro no hémico de las comidas que contienen las 4 papillas de avena diferentes

	Papilla de avena fermentada	Papilla de avena fermentada pasteurizada	Papilla de avena con ácidos orgánicos	Papilla de avena básica
Hierro no hémico absorbido en la sangre (%) <sup>1</sup>	1.1 (0.8, 1.5)*	0.6 (0.4, 0.7)	0.5 (0.4, 0.7)	0.5 (0.4, 0.7)
Comida de prueba:comida de control <sup>2</sup>	2.2 (1.7, 2.9)*	1.1 (0.8, 1.4)	1.0 (0.8, 1.3)	-
<sup>1</sup> Media geométrica de las estimaciones por mínimos cuadrados del análisis según el modelo lineal mixto con IC de 95% entre paréntesis, n = 24 <sup>2</sup> Media geométrica de las estimaciones de las diferencias del análisis según el modelo lineal mixto con IC de 95% entre paréntesis, n = 24 * Los valores son significativamente diferentes de todos los otros valores en cada fila (P<0.0001)				

15 Los resultados muestran un efecto altamente significativo de la comida de prueba con la papilla de avena fermentada cuando se comparan tanto los valores absolutos de absorción de hierro no hémico como los cocientes con respecto a la papilla de avena con el pH ajustado (P<0.0001), en los cuales se toman en cuenta las variaciones entre individuos.

20 Como *L. plantarum* 299v puede colonizar la mucosa intestinal humana durante aproximadamente 2 semanas y como la comida de prueba con la papilla de avena fermentada aumentó la absorción de hierro no hémico, se evaluó el efecto de arrastre específico de esta comida de prueba en las siguientes comidas de prueba ingeridas dentro de un período. No se observó ningún efecto general de arrastre de las comidas de prueba, pero mirando el efecto específico de la comida con la papilla de avena fermentada el efecto de arrastre estuvo cerca de alcanzar significación estadística (P = 0.06).

25 Los cocientes de absorción de las diferentes comidas de prueba mostraron un aumento muy significativo en la absorción de hierro no hémico de la comida de prueba con la papilla de avena fermentada con ácido láctico, en tanto no hubo ningún efecto de las comidas de papilla de avena fermentada pasteurizada y de papilla de avena sin fermentar, que sirvieron como diferentes controles. Como el contenido de hierro y fitato en las 4 comidas de prueba fue constante, este efecto significativo puede ser atribuido a un efecto de la fermentación de *L. plantarum* 299v. Si es un efecto de *L. plantarum* 299v activo o un efecto de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación se debe determinar por comparación del cociente de absorción para la comida con papilla de avena fermentada y los cocientes de absorción para las comidas con *L. plantarum* 299v inactivado (papilla de avena fermentada pasteurizada) y la papilla de avena sin fermentar con agregado de ácidos orgánicos, puesto que el ácido láctico y el acético ácido se agregaron a esta última en las concentraciones que normalmente se producen durante el proceso de fermentación. Los resultados del análisis de los ácidos orgánicos muestran que no fue posible alcanzar niveles similares de ácidos orgánicos en las 3 papillas de avena en el momento de la ingestión (Tabla 2). La comida con la menor diferencia en la concentración de los ácidos orgánicos en comparación con la papilla de avena fermentada fue la papilla de avena fermentada pasteurizada, en la cual la concentración de ácido láctico y de ácido acético fue 19% y 8% menor, respectivamente. Al comparar los cocientes de absorción de hierro para esas 2 comidas el cociente se redujo al 50% para la papilla de avena fermentada pasteurizada. Como el nivel de ácido láctico en la papilla de avena con agregado de ácidos orgánicos fue 52% menor que en la papilla de avena fermentada pasteurizada y el cociente de absorción se redujo tan solo 9%, es improbable que el aumento en la absorción de hierro en la papilla de avena fermentada se haya debido principalmente a un efecto de los ácidos orgánicos. Los resultados del presente estudio indican, por lo tanto, que la bacteria acidoláctica activa, *L. plantarum* 299v ( $1.1 \times 10^{11}$  ufc), fue capaz de aumentar la absorción del hierro no hémico de una comida con baja biodisponibilidad de hierro, en mujeres jóvenes.

50 Normalmente se describe que la absorción de hierro se produce en el duodeno y en el intestino delgado proximal. Los ácidos orgánicos pequeños de los alimentos, como el ácido láctico y el ácido acético de la papilla de avena fermentada pasteurizada y la papilla de avena con agregado de ácidos orgánicos, son absorbidos muy rápidamente en el tracto gastrointestinal. Una explicación posible de la mayor absorción de hierro no hémico de la papilla de

avena fermentada podría ser la colonización de *L. plantarum* 299v en la mucosa del intestino delgado más proximal o posiblemente el colon, donde la producción local de los ácidos orgánicos por la bacteria activa puede disminuir el pH local y el ácido láctico puede formar complejos solubles con el hierro como describieron Derman *et al.* Esta hipótesis puede ser reforzada por el hecho de que el efecto de arrastre de la comida con la papilla de avena fermentada estuvo cerca de alcanzar significación ( $P = 0.06$ ), lo que indica un efecto de *L. plantarum* 299v en la absorción de hierro no hémico de los alimentos ingeridos los días siguientes cuando la bacteria aún colonizaba el intestino.

Al comparar los cocientes de absorción para las comidas de prueba con la papilla de avena fermentada, la papilla de avena fermentada pasteurizada y la papilla de avena con agregado de ácidos orgánicos (como se describió antes) parece claro que el aumento en la absorción de la comida de prueba con la papilla de avena fermentada no se puede asignar a un efecto de los ácidos orgánicos solos, como se había planteado antes, sino que hay un efecto específico del *L. plantarum* 299v activo.

## Experimento 2

Reactivos: Todos los reactivos fueron de GTF (Gotemburgo, Suecia), a menos que se indique lo contrario. Cultivo de células Caco-2. Se obtuvieron células Caco-2 de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) en el pasaje 17 y se utilizaron para los experimentos en los pasajes 20 a 35. Se mantuvieron cultivos de reserva en medio esencial  $\alpha$  modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero de feto de ternero al 20% (v/v) (FSC), 100 unidades/L de penicilina G y 100 mg/L de estreptomycin a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire - 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada dos a tres días. Las células se dividieron hasta una confluencia de ~80% usando 0.5 gr/L de tripsina con 0.5 mmol/L de EDTA en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) de Dulbecco. Antes de los experimentos, se sembraron 100 000 células en 0.5 mL de DMEM complementado en insertos de membranas de policarbonato microporosas de 0.4  $\mu$ m (insertos de 1 cm<sup>2</sup> Tranwell; Corning, Acton, MA). La cámara basolateral contenía 1.5 mL de DMEM complementado. El medio en ambos lados del inserto de filtro se cambió cada 2 a 3 días. Todos los experimentos de captación y transferencia de hierro se llevaron a cabo 14 a 17 días después de la siembra. Cultivos bacterianos. Se cultivaron *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM9843), (5), *Lactobacillus plantarum* 299, (1), *Lactobacillus plantarum* Heal 9 (DSM 15312), (2), *Lactobacillus plantarum* Heal 19 (DSM15313), (4), mutante de *Lactobacillus plantarum* 299v (AMJ1277), (3) y *Lactobacillus reuteri*, (6) en caldo MRS en un agitador rotatorio (37 °C, 200 rpm). Las bacterias se cosecharon en la fase exponencial (DO<sub>600</sub>, máx = 1.3). Se calculó el volumen del cultivo celular correspondiente a un cierto número de células de una curva estándar predeterminada. Las células se centrifugaron a 5000 rpm (Sorvall heraeus, multifuge) durante 2 minutos y luego se resuspendieron en una solución de transporte de HBSS (PAA), HEPES 2.5% (1 M, PAA) y FeCl<sub>3</sub> 10  $\mu$ M. El ensayo se realizó con una concentración celular de  $6.7 \times 10^7$  células/ml para todas las especies salvo el *Lactobacillus reuteri* que se agregó en una concentración de  $3.35 \times 10^7$  células/ml. El ensayo se repitió 2 veces.

Ensayo para captación celular de <sup>55</sup>Fe y transferencia entre monocapas. Se proporcionó medio DMEM complementado, recién preparado, a las células 1 día antes de los ensayos de captación y transferencia. Para estudiar la captación y la transferencia transepitelial de Fe(III) por las células Caco-2, se agregaron trazas de <sup>55</sup>Fe (Perkin Elmer) a las suspensiones bacterianas. Las suspensiones en volúmenes de 0.5 mL se colocaron en el lado apical de las células Caco-2, mientras que la cámara basolateral contenía 1.5 ml de HBSS/HEPES. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera humidificada de 95% de aire - 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 2 h de incubación, las células se lavaron 4 veces con solución amortiguadora de lavado helada (150 mmol/L de NaCl, 10 mmol/L de HEPES, 1 mmol/L de EDTA, pH7) y se homogeneizaron en NaOH 0.5 M. El <sup>55</sup>Fe transferido a la cámara basolateral o asociado a los lisados de Caco-2 se midió con un contador de centelleo líquido. La integridad de las monocapas de células se controló antes y después de los ensayos midiendo la TEER (resistencia eléctrica transepitelial).

Transporte de FeCl<sub>3</sub> (10  $\mu$ mol/l) en HBSS/HEPES con agregado de diferentes cepas de bacterias (véase descripción del método).

Control: como antes pero sin bacterias.

	Transporte %
Control.	0.06
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> 299	0.58
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> Heal 9	0.23
3. <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v mutante	0.32
4. <i>Lactobacillus plantarum</i> heal 19	0.69
5. <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	0.38
6. <i>Lactobacillus reuteri</i>	0.11

Resultados: Las cepas 1 a 5 afectan el transporte de Fe en comparación con la solución de Fe solo. Se observa un aumento entre 3 y 9 veces. En la muestra que contiene *Lactobacillus reuteri* se observa un aumento del transporte, pero no comparable con las diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum*.

5

Por lo tanto, el mayor transporte observado con las diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* muestra un aumento similar en la absorción del hierro, que el observado en el estudio anterior en humanos.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de al menos una cepa viable de *Lactobacillus plantarum* elegida del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, para la preparación de una composición para aumentar la absorción de al menos un tipo de metal o ión metálico elegido del grupo integrado por Fe y sus iones, en un mamífero, preferentemente un ser humano.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho al menos un metal o ión metálico está asociado a otro elemento o unido a un complejo con otro elemento.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicha composición contiene un material portador.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho material portador se elige del grupo integrado por papilla de avena, alimentos fermentados por ácido láctico, almidón resistente, fibras vegetales, carbohidratos, proteínas, proteínas glucosiladas y lípidos.
- 20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde dicho material portador es fermentado con una o más de las cepas elegidas del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313.
- 25 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha composición se elige del grupo integrado por un producto alimenticio, un suplemento alimenticio, un producto nutritivo, un alimento funcional y un alimento médico.
- 30 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho producto se elige del grupo integrado por bebidas, yogures, jugos, helados, panes, galletas, cereales, barritas nutritivas y pastas para untar.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicha composición contiene al menos uno de los metales o iones metálicos elegidos del grupo integrado por Fe y sus iones.
- 35 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho al menos un metal o ión metálico está asociado a otro elemento o unido a un complejo con otro elemento.
- 40 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1a 9, donde dicha al menos una cepa de la composición está presente en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  UFC, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{12}$ , y más preferentemente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$ .
- 45 11. Una composición farmacéutica que contiene al menos una cepa viable de *Lactobacillus plantarum* elegida del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, para usar en el tratamiento de la anemia.
- 50 12. Una composición para usar de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicha composición farmacéutica es una formulación líquida o una formulación sólida.
13. Una composición para usar de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha formulación se elige del grupo integrado por comprimidos, comprimidos para chupar, golosinas, comprimidos masticables, gomas de mascar, cápsulas, sobres, polvos, gránulos, partículas recubiertas y comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas con recubrimiento entérico, y películas y láminas fundentes.
- 55 14. Una composición para usar de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha formulación líquida se elige del grupo que consiste en soluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes.
- 60 15. Una composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde dicha composición contiene al menos un tipo de metal o ión metálico elegido del grupo integrado por Fe y sus iones.
16. Una composición para usar de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho al menos un metal o ion metálico está asociado a otro elemento o unido a un complejo con otro elemento.
17. Una composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, donde dicha al menos una cepa de la composición farmacéutica está presente en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  UFC, preferentemente entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{12}$ , y más preferentemente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$ .