

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 965**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A23C 21/02 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2006 E 06705161 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 1853284**

54 Título: **Uso de *Lactobacillus kefiranofaciens* como un probiótico y un simbiótico**

30 Prioridad:

11.02.2005 US 651657 P

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

22.09.2014

73 Titular/es:

**BIOLACTIS INC. (100.0%)
Caves Village Building No. 10, Office No. 4, West
Bay Street, P.O. Box N-7532
Nassau, BS**

72 Inventor/es:

**LEMIEUX, PIERRE;
PRECOURT, LOUIS-PHILIPPE y
SIMARD, ERIC**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 496 965 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 kefiranofaciens* como un probiótico y un simbiótico

5 Antecedentes de la invención

(a) Campo de la invención

10 Esta invención se refiere al uso de *Lactobacillus kefiranofaciens* como un probiótico que tiene efectos sobre el problema de salud intestinal asociado a la obesidad, tal como el control de los niveles de lípidos en sangre.

(b) Descripción de la técnica anterior

15 La definición tradicional de un microorganismo probiótico requiere que la bacteria (y sus componentes) no sean tóxicos, sobreviva a través de entornos gástricos/intestinales, se adhiera/persista en el tracto gastrointestinal, exista como parte de la microflora humana normal y ejerza beneficios para la salud. Sin embargo, la evidencia reciente ha demostrado que algunos efectos probióticos se pueden obtener a partir de lactobacilos de origen no humano y que los efectos probióticos se pueden obtener con *lactobacillus* que fueron inactivados con calor o radiación, y en algunos casos a partir de lisados bacterianos (patente de los Estados Unidos núm. 4,347,240). Los beneficios para la salud observados a partir de lactobacilos probióticos son frecuentemente específicos de cepas y pueden variar enormemente. Algunos de los efectos descritos para lactobacilos probióticos incluyen: la modulación de la microflora intestinal, la competencia con y eliminación de microorganismos patógenos, la modulación de la función inmune, el control de alergias, la promoción de la salud gastrointestinal, la regulación de los niveles de lípidos en sangre, el control de la diabetes (la regulación de la glucosa y la insulina en sangre), la protección contra el cáncer de colon y el control de peso corporal.

25 El kéfir ha sido usado para fermentar la leche durante siglos. Los granos de kéfir están compuestos de bacterias de ácido láctico gram-positivas hetero y homofermentativas. Las bacterias de ácido acético gram-negativas, y las levaduras fermentadoras y las no fermentadoras de lactosa, se mantienen juntas por kéfiran, un biopolímero de la familia de exopolisacáridos secretado por la bacteria *Lactobacillus kefiranofaciens* subespecie (subsp.) *kefiranofaciens*. Los lactobacilos de las especies *L. kefiranofaciens* son lactobacilos homofermentativos y representan a la principal población bacteriana de los granos de kéfir. Aunque originalmente clasificadas como 2 especies independientes, *Lactobacillus kefiranofaciens* y *Lactobacillus kefirgranum* fueron reclasificadas recientemente como subespecies de la especie *L. kefiranofaciens* basado en sus secuencias idénticas de ARN16S (Vancanneyt y otros, Int J Syst Evol Microbiol. 54(Pt 2):551-556, 2004). La clasificación de las dos subespecies se realiza sobre la base de la morfología en placas de agar y en cultivo líquido, sobre la producción de ácido a partir de diferentes azúcares, y en perfiles de proteína a partir de la PAGE. Las cepas de la subespecie *kefiranofaciens* son a menudo altos productores de kéfiran, que es esencial en la composición y la formación de granos de kéfir. La producción de kéfiran de cepas de *kefiranofaciens* se reconoce a partir la morfología de las colonias (que muestran aspecto brillante o gelatinoso) en placas de agar, mientras que las cepas de la subespecie *kefirgranum* (que muestran colonias secas y compactas) no producen niveles significativos de kéfiran. Sin embargo, la producción de kéfiran a partir de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* ha demostrado ser muy sensible al subcultivo. Las cepas de *Kefirgranum* pueden producir ácido a partir de trehalosa, mientras las cepas de *kefiranofaciens* no pueden. Adicionalmente, las cepas de la subespecie *kefirgranum* se flocculan y sedimentan en cultivos líquidos.

45 El hecho de que ninguna toxicidad se ha asociado con el kéfir a lo largo de los años es un fuerte argumento para la seguridad y la no toxicidad de las cepas de *Lactobacillus* aisladas de él. La especie *Lactobacillus kefiranofaciens* se ha clasificado en el grupo *L. acidophilus* filogenéticamente cerca de las especies *L. crispatus* y *L. acidophilus*, que contienen varias cepas probióticas bien descritas.

50 Santos y otros (System. Appl. Microbiol., 26:434-437, 2003) describen cuatro cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* que muestran resistencia al ácido y la bilis, y diferentes propiedades antimicrobiana y de adherencia.

55 La patente de los Estados Unidos núm. 4,347,240 describe el aislamiento de una nueva cepa de *Lactobacillus* KPB-176 de la clasificación indefinida de la cepa (*Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*) de granos de kéfir, que produce grandes cantidades de kéfiran, no posee selectividad estricta para los medios específicos y no implica ninguna reducción en la productividad de polisacáridos incluso durante subcultivo.

WO030 53158 describe la matriz de proteína maleable que comprende un microorganismo que se puede seleccionar de *Lactobacillus kefiranofaciens*.

60 Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición probiótica que comprende una cantidad efectiva de *Lactobacillus kefiranofaciens* en asociación con un portador adecuado como se define en las reivindicaciones.

5 El *Lactobacillus kefiranofaciens* es una cepa seleccionada del grupo que consiste en R2C2 (número de acceso IDAC 041202-3), INIX (número de acceso IDAC 041202-4), K2 (número de acceso IDAC 041202-1); ES1 (número de acceso IDAC 041202-2).

10 El efecto probiótico es la protección contra la inflamación intestinal. La composición puede ser formulada de forma adecuada para la administración oral, rectal o vaginal.

15 De acuerdo con la presente descripción, se proporciona además un método para proporcionar una modulación positiva de la microflora intestinal en un sujeto que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de tal *Lactobacillus kefiranofaciens*.

20 Además de acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición para usar en un método para proteger un sujeto contra la inflamación intestinal que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de *Lactobacillus kefiranofaciens*. Dicha inflamación intestinal puede ser causada por ejemplo por una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC) o por un síndrome del intestino irritable (IBS).

25 Más aun de acuerdo con la presente descripción, se proporciona un método para proteger a un sujeto contra las alergias y/o enfermedades autoinmunes que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de tal *Lactobacillus kefiranofaciens*.

30 Además de acuerdo con la presente descripción, se proporciona además un método para proteger a un sujeto contra la diarrea que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de tal *Lactobacillus kefiranofaciens*.

35 De acuerdo con la presente descripción, se proporciona un método para proteger a un sujeto contra la diabetes que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de tal *Lactobacillus kefiranofaciens*.

40 Se proporciona además de acuerdo con la presente descripción un método para proteger a un sujeto contra la hiperlipidemia que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de tal *Lactobacillus kefiranofaciens*.

45 Aún de acuerdo con la presente descripción, se proporciona además un método para proteger a un sujeto contra el cáncer de colon que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de tal *Lactobacillus kefiranofaciens*.

50 En una modalidad, el *Lactobacillus kefiranofaciens* se administra en una forma seleccionada del grupo que consiste en una población bacteriana viva, una población bacteriana liofilizada, como un producto lácteo fermentado y como una muestra bacteriana no viable, tal como una bacteria muerta por calor, una bacteria irradiada o una bacteria lisada.

55 Una modalidad de la presente descripción proporciona además el uso de tal *Lactobacillus kefiranofaciens* como un compuesto probiótico que tiene un efecto antiinflamatorio.

60 Una modalidad de la descripción proporciona el uso de tal *Lactobacillus kefiranofaciens* como un compuesto probiótico para el tratamiento de la soriasis.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona además el uso de *Lactobacillus kefiranofaciens* en asociación con un compuesto antiinflamatorio, en donde el compuesto antiinflamatorio es 5-ASA o un corticosteroide.

50 La presente descripción proporciona además el uso de *Lactobacillus kefiranofaciens* como un compuesto probiótico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la soriasis.

55 En una modalidad de la descripción, el *Lactobacillus kefiranofaciens* se usa para fermentar suero, en donde dicho suero es suero de queso.

De acuerdo con la presente descripción, se proporciona además el uso de un producto obtenido a partir de la fermentación de suero por *Lactobacillus kefiranofaciens* para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

60 De acuerdo con la presente descripción, se proporciona además el uso de un producto obtenido de la fermentación de suero por *Lactobacillus kefiranofaciens* para el tratamiento de hipertensión.

La presente descripción proporciona además el uso de un producto obtenido de la fermentación de suero por *Lactobacillus kefiranofaciens* para el tratamiento de trastornos del peso.

5 De acuerdo con la presente descripción, se proporciona además el uso de un producto obtenido de la fermentación de suero por *Lactobacillus kefiranofaciens* para el tratamiento de la hiperlipidemia

La presente descripción proporciona además el uso de un producto obtenido de la fermentación de suero por *Lactobacillus kefiranofaciens* para el tratamiento de trastornos de los triglicéridos.

10 La presente descripción proporciona además el uso de tal *Lactobacillus kefiranofaciens* como un compuesto probiótico. El compuesto probiótico puede usarse para el tratamiento del síndrome metabólico que se asocia con 5 problemas que son hipertensión, HDL bajo, grasa en el vientre, resistencia a la insulina y altos niveles de triglicéridos. Así, el compuesto probiótico de la presente invención puede usarse para el tratamiento y/o prevención de los problemas asociados con el síndrome metabólico.

15 La presente descripción proporciona además el uso de tal *Lactobacillus kefiranofaciens* como un compuesto probiótico para controlar el manejo del peso.

20 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan lactobacilos probióticos con diversas aplicaciones en productos alimenticios y en medicina. La invención se relaciona con una especie probiótica de *Lactobacillus kefiranofaciens* (que incluye *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *Kefirgranum*), definida por las 4 cepas descritas más abajo, que han mostrado potencial probiótico significativo que sigue *per os* el tratamiento en modelos animales. Entre estos efectos probióticos se observó la adherencia intestinal, la modulación positiva de la microflora intestinal, la inmunomodulación, alergias, diarrea, control de peso, hipertensión y la hiperlipidemia. Las diferentes cepas aisladas de esta especie han demostrado efectos beneficiosos para la salud tanto los comunes como los cepa específicos. Se pueden administrar por vía oral ya sea como población bacteriana viva o liofilizada, como un producto lácteo fermentado (leche o a base de suero) o como muestras de bacterias no viables (bacterias muertas por calor, irradiadas o lisadas).

La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se dan más bien para ilustrar la invención que para limitar su alcance.

Algunos de los ejemplos se han incluido para el único propósito de referencia.

Ejemplo 1

40 Identificación de cinco cepas probióticas de *lactobacillus* de granos de kéfir

Tres de las cepas descritas en la presente solicitud, R2C2 (número de acceso IDAC 041202-3), K2 (número de acceso IDAC 041202-1) y ES1 (número de acceso IDAC 041202-2) se aislaron a partir de granos de kéfir previamente adaptados para el crecimiento en el suero.

45 Una cepa, INIX (número de acceso IDAC 041202-4) se aisló de una colonia superproductora de kéfir en placas de agar de la cepa de referencia *kefiranofaciens* de ATCC (número de acceso ATCC 43761).

50 BioSp fue una cepa de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* fuertemente floculante en cultivos líquidos de Technologie Biolactis inc.

Basado en sus secuencias del gen ARN 16S, las cepas descritas en la presente solicitud se han asignado a la especie *Lactobacillus kefiranofaciens*. Las propiedades morfológicas en cultivo líquido y en placas de agar y el perfil de fermentación de carbohidratos también han permitido una asignación más específica de las cepas a cualquiera de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (R2C2, ES1 y INIX) y para *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (K2 y BioSp).

Ejemplo 2

60 Caracterización *in vitro* de las cepas de *lactobacillus*

ES 2 496 965 T3

5 R2C2: generalmente bacilos cortos gram positivos, individuales o en cadenas de 2 a 4, que no producen o producen pocos exopolisacáridos. La longitud y el ancho de los bacilos varían mucho según el medio de cultivo usado y el medio de conservación. En las placas RCW, forma colonias de apariencia cristalina secas y lisas, blancas con centro beige, convexo, con la parte superior en relieve. Esta cepa tiene un buen crecimiento en medios pobres (por ejemplo, en suero no suplementado) y produce aglomerados de pequeños tamaños en cultivo líquido (aproximadamente 10 bacterias y menos).

10 INIX: alargados, generalmente bacilos más largos que los de R2C2, gram positivos, solos o en cadenas de 2 a 4 bacilos. En la placa de RCW, forma colonias de apariencia gelatinosa o pegajosa, que se fusionan a las colonias vecinas. Las tasas de producción de kéfirán en cultivos líquidos RCW son altas y estables en el subcultivo. Esta cepa tiene un débil crecimiento en medios pobres; típico de cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y producen aglomerados de pequeños tamaños en cultivo líquido (aproximadamente 10 a 50 bacterias).

15 ES1: Similar a la cepa R2C2, pero presenta un peor crecimiento en medios pobres.

20 K2: Bacilos de longitud promedio ligeramente más marchitos que R2C2, solos o en cadenas de 2 a 4 bacilos. Colonias similares a R2C2. No producen o producen pocos exopolisacáridos. Crece en medio pobre, pero que alcanza la fase estacionaria a un nivel inferior que las otras cepas para todos los medios de cultivo probados (RCW: 5 a 7 X 10⁸ bacterias comparado con 1,5 a 3 X 10⁹ para R2C2 y ES1). Presenta aglomerados de tamaño medio en cultivo líquido (aproximadamente 50 a 100 bacterias).

25 BioSP: Bacilos de longitud media, con superficie irregular de células, se marchitan más que todas las demás cepas, solos o en cadenas de 2 a 4 bacilos, que no produce o pocos exopolisacáridos. Gram positivos, la formación de agregados de tamaño grande de lactobacilos en cultivo líquido además que contienen proteínas precipitadas (más de 100 bacterias). En las placas RCW, forma colonias blancas, convexas, con la parte superior más uniforme, pero que presentan puntos blancos finos en la superficie. Crecimiento en medios pobres, pero fuertemente reducido en presencia de fuerte concentración de calcio (CaCl₂ 1% p/v).

30 Perfiles de fermentación

La Tabla 1 proporciona los datos acerca de los perfiles de fermentación de las cepas descritas anteriormente.

Tabla 1
Resultados de la fermentación para carbohidratos usando API 50CH

Sustratos	R2C2	INIX	K2	ES1	ATCC 43761
Número de pruebas	4	2	3	3	
Glicerina					
Eritritol					
D-Arabinosa					
L-Arabinosa					
Ribosa					
D-xilosa					
L-xilosa					
Adonitol					
β-Metil glicósido					
Galactosa					
D-Glucosa	■	■	■	■	■
D-Fructosa	■	■	■	■	■
D-Manosa	■	■	■	■	■
L-Sorbosa					
Ramnosa					
Dulcitol					
Inositol					
Manitol	■	■		■	
Sorbitol					
α-metil-D-					
α-metil-D-					
N-acetil	■	■	■	■	
Amigdalina					
Arbutina					
Esculina	■		■	■	■
Salicina		■	■	■	
Celobiosa					
Maltosa	■	■	■	■	■
Lactosa	■	■	■	■	
Melibiosa					
Sacarosa	■	■		■	■
Trehalosa	■	■		■	
Inulina					
Melezitosa					
D-Rafinosa		■		■	
Almidón					
Glicógeno					
xilitol					
β-Gentibiosa			■		
D-Turanosa					
D-Lixosa					
D-Tagarosa					
D-Fucosa					
L-Fucosa					
D-Arabitol					
L-Arabitol					
Gluconato					
2-ceto-gluconato					
5-ceto-gluconato					

60 ■ Fuerte ■ Moderado □ Débil

Perfiles de fermentación de metabolitos

Las Tablas 2 a 4 proporcionan los datos acerca de la fermentación de metabolitos (escala de 1 a 5 definida como 1 es débil a 5 que es fuerte, + = 5 y - significa que no hay reacción).

Tabla 2

Fermentación de metabolitos para la cepa R2C2																
	JM 3				JM 19				2 JM7				JJFT			
Tiempo de incubación (h)	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Glicerina																
Eritritol																
D-Arabinosa																
L-Arabinosa																
Ribosa																
D-xilosa																
L-xilosa																
Adonitol																
β-Metil glicósido																
Galactose	5	5	5	5												
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5	+	+	+	+	4	5	5	
D-Fructosa	5	5	5	5	5	5	5	5	+	+	+	+	4	5	5	
D-Manosa	3	5	5	5	-	3	3	3	+	+	+	+	-	-	1	
L-Sorbosa																
Ramnosa																
Dulcitol																
Inositol																
Manitol	4	4	5	5	2	4	5	5	4	4	+	+	1	4	5	
Sorbitol																
α-Metil-D-Manosida																
α-Metil-D-glucósido														1	-	-
N-acetil glucosamina	4	5	5	5					+	+	+	+	0	4	5	
Amigdalina																
Arbutina					-	-	1	2	1	3	4	+				
Esculina	1	4	4	4	3	4	4	4	3	4	+	+	4	5	5	
Salicina	1	1	1	2	-	3	3	3	1	4	+	+	-	-	2	
Celobiosa																
Maltosa	3	4	5	5	2	4	5	5	+	+	+	+	1	3	3	

5	Lactosa	5	5	5	5	5	5	5	5	+	+	+	+	2	5	5	
	Melibiosa									-	-	1	3	-	-	2	7
	Sacarosa	4	5	5	5	-	1	2	1	3	+	+	+	1	5	5	
	Trehalosa	5	5	5	5	-	3	5	5	4	+	+	+	-	5	5	
	Inulina																
10	Melezitosa																
	D-Rafinosa	3	5	5	5	-	1	2	1	-	3	+	+	-	2	2	
	Almidón																
	Glicógeno																
15	xilitol																
	β-Gentibiosa																
	D-Turanosa																
20	D-Lixosa																
	D-Tagarosa																
	D-Fucosa																
25	D-Arabitol																
	L-Arabitol																
	Gluconato																
30	2-ceto-gluconato																
	5-ceto-gluconato																

35

Tabla 3

Formación del metabolito para la cepa INIX									
		JM 35				JM 18			
Tiempo de incubación (h)		24	48	72	96	24	48	72	96
	Glicerina								
	Eritritol								
45	D-Arabinosa								
	L-Arabinosa								
	Ribosa								
50	D-xilosa								
	L-xilosa								
	Adonitol								
55	β-Metil glicósido								
	Galactose								
	D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5
60	D-Fructosa	5	5	5	5	5	5	5	5

ES 2 496 965 T3

	D-Manosa	4	4	5	5	2	5	5	5
	L-Sorbosa								
	Ramnosa								
	Dulcitol								
5	Inositol								
	Manitol	4	4	5	5	1	3	5	5
	Sorbitol								
10	α -Metil-D-Manosida								
	α -Metil-D-glucósido								
	N-acetil glucosamina	1	3	5	5	-	1	1	1
15	Amigdalina								
	Arbutina					1	1	2	2
	Esculina	2	4	4	4	4	4	4	5
20	Salicina	1	3	3	3	1	2	3	4
	Celobiosa								
	Maltosa	3	4	5	5	2	4	5	5
25	Lactosa	5	5	5	5	5	5	5	5
	Melbiosa								
	Sacarosa	3	4	5	5	-	1	3	3
30	Trehalosa	5	5	5	5	1-	5	5	5
	Inulina								
	Melezitosa								
35	D-Rafinosa	1	3	5	5	-	1	2	2
	Almidón								
	Glicógeno								
40	Xilitol								
	β -Gentibiosa								
	D-Turanosa								
45	D-Lixosa								
	D-Taqarosa								
	D-Fucosa								
50	D-Arabitol								
	L-Arabitol								
	Gluconato								
55	2-ceto-gluconato								
	5-ceto-gluconato								

60

	Trehalosa												
	Inulina												
5	Melezitosa												
	D-Rafinosa	1	0	-	-	2	4	5	5	-	3	+	
10	Almidón												
	Glicógeno												
	xilitol												
15	β-Gentibiosa	4	5	5	5	4	4	4	4	+	+	+	+
	D-Turanosa												
	D-Lixosa												
20	D-Tagarosa												
	D-Fucosa												
	D-Arabitol												
25	L-Arabitol												
	Gluconato												
	2-ceto-gluconato												
	5-ceto-gluconato												
30	Trehalosa												

35 Clasificación de la cepa para especies de *Lactobacillus kefiranofaciens*:

La comparación de secuencias de ARN 16S es un medio ampliamente aceptado para la clasificación de cepas de *lactobacillus*. El gen 16S de las cinco cepas de lactobacilos diferentes fueron amplificadas por PCR (mediante el uso de las secuencias de iniciador directo de sec. con núm. de ident.:1 y la del iniciador inverso de sec. con núm. de ident.:2) y se secuenciaron. Las diferentes cepas se clasificaron todas filogenéticamente para las especies de *Lactobacillus kefiranofaciens* a través de un alineamiento de las secuencias obtenidas con las de 80 secuencias 16S de *Lactobacillus* disponibles en NCBI y de la cepa de referencia ATCC 43761.

45 Las secuencias complementarias correspondientes de secuencias de ARN 16S de las cepas R2C2 (sec. con núm. de ident.:3), INIX (sec. con núm. de ident.:4) , BioSP (sec. con núm. de ident.:5), K2 (sec. con núm. de ident.:6) y ES1 (sec. con núm. de ident.:7) se enumeran en el listado de secuencias.

Procedimiento de conteo bacteriano

50 El método FACS para evaluar el número de bacterias y la supervivencia se usó como sigue. Antes de realizar un conteo de bacterias mediante el uso de un citómetro, todos los agregados tienen que ser disociados. Las cepas de lactobacilos R2C2 e INIX presentadas en la presente tienen una tendencia a formar agregados pequeños e inestables. La disociación se puede conseguir fácilmente por resuspensión de las cepas en PBS pirofosfato (15 mM). Las cepas BioSP y K2 (particularmente BioSP) forman agregados de gran tamaño que no pueden ser disociados mediante el uso de sólo PBS pirofosfato. Después de la resuspensión, estas dos cepas se deben calentar a 55 °C durante un período de 30 minutos. Después, las cepas se exponen durante 15 minutos a temperatura ambiente a bromuro de etidio, que se une al ADN para que cada bacteria se vuelva detectable por citometría. Las series de diluciones (1/10, 1/100, 1/1000) se llevan a cabo a continuación, para hacer un conteo más preciso.

Otros métodos tal como el método de conteo en placa y el número más probable (serie de inoculaciones con diferentes diluciones que permiten contar) también se pueden usar.

5 Características del crecimiento en MRS, RCW y suero

Un precultivo de las diferentes cepas se preparó en un medio en RCW a 37 °C por 12-24 horas. Las células frescas de los cultivos con crecimiento exponencial se contaron e inocularon en una concentración de 10^8 cfu/ml en los diferentes medios. Los cultivos se incubaron a 37 °C y se contaron las células a intervalos de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 32 y 48 horas mediante el uso de los métodos de conteo FACS.

Desarrollo de un método de detección directa por PCR

Un método de amplificación por PCR específico de especie fue desarrollado para permitir la detección de *L. kefiranofaciens* en diferentes tejidos. La prueba de detección por PCR consiste en una amplificación del gen ARN 16S. Estos iniciadores fueron diseñados a partir de secuencias de ADN únicas de *L. kefiranofaciens* identificadas a través de los resultados del alineamiento de las secuencias 16S de *Lactobacillus* con la de nuestras cepas y de la cepa de referencia número de acceso ATCC 43761. La especificidad de los iniciadores fue probada experimentalmente contra el ADN de 5 diferentes cepas de lactobacilos. Esta prueba también se ha usado con éxito para detectar ADN de *L. kefiranofaciens* en muestras experimentales aisladas a partir de materia fecal, el contenido del colon, la mucosa y todo el colon. Estos resultados demostraron que los iniciadores son altamente específicos, en detectar la presencia de ADN de *L. kefiranofaciens* por toda la importante diversidad de ADN bacteriano en la flora intestinal.

Las secuencias específicas de iniciadores de PCR de *L. kefiranofaciens* son R2C2-16SF (sec. con núm. de ident.:8) y R2C2-16SR (sec. con núm. de ident.:9).

Los parámetros de los ciclos de amplificación de PCR son como sigue: 94 grados de 10 minutos, seguido de 30 repeticiones de 94 grados durante 30 segundos, 69 grados durante 30 segundos, y 72 grados durante 1 minuto, y luego terminando con un sola etapa de 72 grados durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Supervivencia en soluciones gástricas/intestinales

La supervivencia y el crecimiento de estas diferentes cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* se examinaron en un pH bajo y soluciones gástricas. Para los experimentos, las diferentes cepas se precultivaron en medio RCW y suero a 37 °C durante 24 horas, antes de ser presentado a la solución gástrica estéril. La supervivencia de las diferentes cepas bajo condiciones ácidas se ensayó como sigue.

40 a) Supervivencia de cepas de lactobacillus en solución ácida

Las células de cultivos frescos se cuentan y después se recogen por centrifugación, se lavan dos veces en PBS y se resuspenden a una concentración de 10^7 cfu/ml en caldo de cultivo MRS o suero ajustado a pH 3.5, 3.0, 2.5 y 2.0. Las células se incubaron a 37 °C y la supervivencia medida a intervalos de 15, 30, 60 y 120 min mediante el uso de FACS y métodos de conteo de placa.

45 b) Supervivencia de las cepas de lactobacillus en solución gástrica humana

Las células de cultivos frescos en RCW se contaron y después se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en solución gástrica humano a una concentración final de 10^8 cfu/ml. Después de 30 minutos, 1 hora o 2 horas de incubación a 37 °C en solución gástrica humana, los cultivos se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en caldo de RCW. Se controló la supervivencia después de 24 horas de incubación a 37 °C en RCW por espectrometría (640 nm) y se comparó con los valores de O.D. de los cultivos no tratados. La solución gástrica se prepara como sigue: 3.2 g/l de pepsina, 2.0 g/l de NaCl y se preparó para el propósito de este experimento a pH 2.0. La supervivencia de las cepas fue excelente después de 30 minutos de incubación en soluciones gástricas. Todas las cepas parecían alcanzar el nivel equivalente de cultivo como las cepas no tratadas como se muestra en la Tabla 5.

60

Tabla 5

Valores de O.D. para cultivos incubados 30 minutos en solución gástrica en comparación con cultivos no tratados		
		O.D. (640 nm)
R2C2	no tratados	4.63
	30 min.	6.96
INIX	no tratados	3.29
	30 min.	4.13
BioSP	no tratados	2.91
	30 min.	4.94
K2	no tratados	3.30
	30 min	3.45

Resistencia a la bilis

Las células de cultivos frescos en RCW se contaron y después se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en solución intestinal humana estéril a una concentración final de 10^8 cfu/ml. Después de 30 minutos, 1 hora o 2 horas de incubación a 37 °C en solución intestinal, los cultivos se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en caldo de cultivo RCW. Se controló la supervivencia después de 24 horas de incubación a 37 °C en RCW por espectrometría (640 nm) y se comparó con los valores de O.D. de los cultivos no tratados. La solución intestinal se prepara como sigue: 10 g/l de pancreatina, 6.8 g/l de KH_2PO_4 , 0.15% de sales biliares y se preparó, para el propósito de este experimento, a pH 8.0. La supervivencia de las cepas fue excelente después de 30 minutos de incubación en solución intestinal. Todas las cepas parecían alcanzar el nivel equivalente de cultivo como las cepas no tratadas como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Valores de O.D. para cultivos incubados 30 minutos en solución intestinal en comparación con cultivos no tratados		
		O.D. (640 nm)
R2C2	no tratados	4.63
	30 min.	6.99
INIX	no tratados	3.29
	30 min.	2.87
BioSP	no tratados	2.91
	30 min.	3.99
K2	no tratados	3.30
	30 min.	3.15

Adhesión *In vitro* a CaCo-2/HT-29

La capacidad de las diferentes cepas se evaluó para adherirse a las células epiteliales intestinales. Las monocapas de células Caco-2 y HT-29 células se dejaron crecer hasta confluencia y para diferenciar durante 14 días en placas de 24

5 pocillos. 108 cfu/ml de las diferentes cepas de bacterias se añadieron, previamente marcadas con colorante Syto9 (kit BacLight) a cada pocillo (por triplicado) en DMEM (sin antibióticos) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de esto, las células se lavaron 4 veces con PBS, todo el contenido del pocillo se recolectó por tratamiento con tripsina durante 10 minutos, y el número de bacterias por pocillo se evaluó por FACS. La cepa R2C2 mostró buenas propiedades de adhesión en células Caco-2 ya que el 15% de las bacterias estaban todavía en el pocillo después de los lavados. Por otra parte, la adhesión de R2C2 en las células fue claramente más alta que la de *L. GG*, un probiótico conocido por sus buenas propiedades de adhesión.

Tabla 7

Adhesión <i>in vitro</i> de bacterias en las células CaCo-2 de intestino humano	
Porcentaje de bacterias adherentes	
R2C2	15%
<i>L. GG</i>	3%

Potencial inmunomodulador en cocultivos *in vitro*

20 Un sistema de cocultivo de células epiteliales intestinales humanas (HT-29) y PBMC humanas se usa como un modelo *in vitro* para evaluar los efectos inmunomoduladores de las cepas bacterianas a nivel intestinal. Brevemente, las células epiteliales humanas HT-29 se sembraron en la cámara superior de un sistema Transwell (a 10⁶ células por ml) y se cultivaron hasta que se produjo la diferenciación (4 semanas en RPMI 1640 cambiado todos los días). Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad a partir de sangre humana fresca y 10⁶ células se añaden a la cámara inferior. Los efectos inmunomoduladores de las diferentes cepas se evalúan mediante la adición de 10⁶ bacterias por triplicado a ya sea la cámara inferior o la superior seguido de 48 horas de incubación. Los controles contenían medios solos. Después de esto, los sobrenadantes de cultivo de células se eliminan y se evalúan para los niveles de citocinas extracelulares mediante el uso de kits ELISA estándar (R&D systems, Minneapolis, MN USA). La evaluación de los niveles de expresión de citocinas se determina por RT-PCR del ARN total obtenido a partir de muestras por triplicado agrupadas de cada grupo.

Potencial inmunomodulador *in vitro* de suero fermentado con R2C2 sobre las células intestinales humanas

35 Un sistema de cultivo de células epiteliales intestinales humanas (HT-29) se usa como un modelo *in vitro* para evaluar los efectos inmunomoduladores de suero fermentado con R2C2. Las células epiteliales humanas HT-29 (a 10⁶ células por ml) se cultivan hasta que se produce la diferenciación (4 semanas en RPMI 1640 cambiado todos los días). El efecto inmunomodulador de las diferentes cepas se evalúa mediante la adición de MPM (matriz de proteína maleable) en varias concentraciones, seguido de 48 horas de incubación. Los controles contenían medios solos. Para la determinación del potencial antiinflamatorio de MPM en las células intestinales humanas, se añadieron lipopolisacáridos (LPS) en los medios de cultivo para inducir la producción de citocinas inflamatorias. Después de estos diferentes protocolos, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo de células y se evaluaron para los niveles de citocinas extracelulares mediante el uso de kits ELISA estándar (R&D systems). La evaluación de los niveles de expresión de citocinas se determinó por RT-PCR del ARN total obtenido a partir de muestras por triplicado agrupadas de cada grupo. Las células expuestas a LPS y varias concentraciones de MPM mostraron una clara reducción de la expresión de TNF α . Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Inmunomodulación <i>in vitro</i> de MPM en las células HT-29 expuestas a LPS	
	Expresión relativa de TNF α
Controles	1,0
Controles+LPS	4,2
MPM 1/100+LPS	1,3
MPM 1/1000+LPS	2,1
MPM 1/10000+LPS	2,3

Ejemplo 3

Caracterización *in vivo* de las cepas de *Lactobacillus* y potencial probiótico

Adhesión de *L. kefiranofaciens in vivo*

Se examinó la adhesión *in vivo* y la persistencia de las diferentes cepas. En este modelo, los ratones C57BU6 se trataron por sonda (p.o.) con 10^8 cfu/ml de las diferentes cepas durante 7 días. Las muestras de colon se recogieron a partir de 3 ratones de cada grupo de tratamiento en el día 1, el día 3 y el día 10 siguiendo el extremo de las sondas para evaluar la persistencia de estas bacterias en el tejido del colon. Las muestras se abrieron longitudinalmente, el contenido colónico se recogió por lavado con solución salina y capa de la mucosa se recogió por raspado. La materia fecal también se recogió en el último día de sondas para evaluar la presencia de las cepas en los animales tratados. La presencia de las diferentes bacterias se evaluó por PCR, mediante el uso de iniciadores específicos de la especie desarrollados y descritos anteriormente, en la materia fecal, el contenido colónico y muestras de mucosa.

Modulación de la microflora intestinal en ratones

Se evaluó la capacidad de las diferentes cepas de modular la microflora intestinal. Los ratones C57BU6 se trataron por sonda (p.o.) con 10^8 cfu/ml de las diferentes cepas durante 7 días. Se recogieron después muestras fecales de cada grupo para evaluar los niveles de bacterias ácido lácticas, coliformes (LAB) y también se midió el pH fecal. La materia fecal se rompió mecánicamente en solución salina y la presencia de coliformes se evalúa con placas Petrifilm de Conteo total de coliformes™ (3M). Los niveles de LAB fueron evaluados mediante el uso de placas Petrifilm de conteo total de aerobios, se incubaron anaeróbicamente con caldo de cultivo MRS. Las cuatro cepas ensayadas mostraron una reducción de 3 a 4 veces de los niveles de coliformes en muestras fecales. Las cepas que muestran el efecto más importante y constante son R2C2 y BioSP como se muestra en la Tabla 9. Por otra parte, la cepa R2C2 mostró la capacidad de aumentar ligeramente conteos de LAB a pesar de reducir el pH fecal. Estos efectos sugieren que R2C2 posiblemente puede adherirse en el tracto intestinal de los animales.

Tabla 9

Modulación de la microflora intestinal en ratones			
	Coliformes/mg de materia fecal	LAB/mg de materia fecal	pH fecal
Controles	625.24	9.5×10^6	7.32
R2C2	193.17	1.4×10^7	7.18
INIX	258.64	n/d	n/d
BioSP	160.71	n/d	n/d
K2	244.19	n/d	n/d

Modulación del potencial inmunomodulador de las poblaciones de leucocitos

Se ensayó el efecto de las cepas para modificar las poblaciones de células de leucocitos. Los ratones C57BU6 se trataron por sonda (p.o.) con 10^8 cfu/ml de las diferentes cepas durante 7 días. Al comienzo y final del periodo de tratamiento, se recogieron muestras de sangre y se analizaron por citometría de flujo para la evaluación de poblaciones de leucocitos. Las diferentes cepas mostraron efectos variables sobre las poblaciones de leucocitos. Las cuatro cepas parecían modular el sistema inmune de ratones, estimulando linfocitos totales y los números de leucocitos. Sin embargo, sólo la cepa R2C2 tiene la capacidad de aumentar el número de células polimorfonucleares (PMN) y sólo BioSP puede estimular ligeramente los monocitos como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Inmunomodulación: Poblaciones de leucocitos de ratones posterior a un tratamiento de 7 días (# de células por 20 ul de sangre)				
	Linfocitos	Monocitos	PMN	Total leucocitos
Controles	1553.25	205.25	209.00	1967.50
R2C2	2175.00	236.20	244.60	2655.80
INIX	2512.80	245.40	227.20	2985.40
BioSP	2520.75	281.50	230.75	3033.00
K2	2083.75	194.25	205.50	2483.50

Cepas de *L. kefiranofaciens* en la prevención/tratamiento de la inflamación intestinal

El potencial de las cepas de *L. kefiranofaciens* para prevenir y reducir los síntomas de la inflamación intestinal se evaluó en el modelo de ratón inducido por DSS.

a) Prevención de la inflamación intestinal

Los ratones C57BU6 se trataron por sonda (p.o.) con 10^8 cfu/ml de las diferentes cepas una vez por día durante 7 días, antes de la inducción de la inflamación con DSS, y luego hasta el final del experimento. La inflamación intestinal se induce, en el día 8, mediante la adición de DSS (2.5%) en el agua potable durante 7 días. El nivel y la progresión de la inflamación se evaluaron a través de mediciones de pérdida de peso, diarrea, sangre oculta, hematocritos, y longitudes de colon (postmortem). Los diferentes grupos de tratamiento mostraron distintos grados de efectos sobre los diferentes parámetros seguidos. Las cepas R2C2, BioSP y K2 mostraron un fuerte efecto preventivo contra el desarrollo de la inflamación, mientras que la cepa INIX tuvo un efecto más moderado. Además, la cepa *L. GG* no mostró ningún efecto beneficioso en este modelo, excepto para los recuentos combinados de sangre oculta y la diarrea y hematocrito. Los resultados se muestran en las Tablas 11-14.

Grupos experimentales:

Grupo 1: 5 ratones, agua + solución salina p.o.

Grupo 2: 5 ratones, agua-DSS + solución salina p.o.

Grupo 3: 5 ratones, agua-DSS + R2C2 (1×10^8 cfu/ml) p.o.

Grupo 4: 5 ratones, agua-DSS + INIX (1×10^8 cfu/ml) p.o.

Grupo 5: 5 ratones, agua-DSS + BioSP (1×10^8 cfu/ml) p.o.

Grupo 6: 5 ratones, agua-DSS + K2 (1×10^8 cfu/ml) p.o.

Grupo 7: 5 ratones, agua-DSS + *L. GG* (1×10^8 cfu/ml) p.o.

Tabla 11

Pérdida de peso (%) asociada con cierto número de días consumiendo DSS				
Grupo	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
2	-0.54	-1.87	-5.92	-6.50
3	0.10	-0.52	-4.00	-4.69
4	0.13	-0.88	-4.83	-6.41
5	0.44	0.62	-3.39	-2.99
6	2.28	1.95	-2.97	-3.46
7	-1.10	-1.30	-6.09	-6.67

Tabla 12

Niveles de hematocrito después de 8 días de exposición a DSS	
Grupo	Nivel de hematocrito (%)
1	46.00
2	37.33
3	40.50
4	37.20
5	39.83
6	38.83
7	38.60

Tabla 13

Recuentos combinados de sangre oculta y diarrea (evaluados en una escala de 8) después de un cierto número de días, consumiendo DSS. (Más específicamente el recuento se realiza como sigue: Hemocult II (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canadá) se usaron portaobjetos de serie de exámenes de rutina de muestreo para sangre fecal oculta para evaluar las hemorragias rectales en una escala de 0-4, que se define como sigue: 0- No hay sangre, 4 materia fecal con sangre. La consistencia de la materia fecal también se evaluó en una escala de 0-4, se define como sigue: 0-consistencia normal, 4- materia fecal líquida. Los valores de consistencia de materia fecal y hemorragias rectales se combinaron y se definen como el "recuento clínico". Los recuentos fueron dados por un evaluador a ciegas).

Grupo	Día 6	Día 7
2	4.50	5.17
3	2.67	3.40
4	3.00	4.67
5	2.20	3.00
6	3.00	3.60
7	4.00	4.67

Tabla 14

Longitud del colon (postmortem) después de 7 días consumiendo DSS	
Grupo	Longitud del colon (cm)
1	7.43
2	5.70
3	6.30
4	5.50
5	6.03
6	5.85
7	5.68

b) tratamiento de inflamación intestinal

Los ratones C57BL/6 fueron tratados por sonda (p.o.) con 10^8 cfu/ml de las diferentes cepas de una vez por día durante la duración del experimento. La inflamación intestinal fue inducida, en el día 0, por la adición de DSS (2.5%) al agua potable durante 8 días y luego se reemplazó por agua fresca durante 8 días para evaluar la recuperación de la inflamación de los diferentes grupos de tratamiento. El nivel y la progresión de la inflamación se evaluaron a través de mediciones de pérdida de peso, diarrea, sangre oculta, hematocritos, y longitudes de colon (postmortem). Todas las cepas de *L. kefiranofaciens* mostraron efectos positivos, aunque varían en resistencia para las diferentes cepas, en el período de recuperación posinflamatorio. Las cepas R2C2 y BioSP mostraron el mejor potencial para ayudar a los animales en recuperarse de una lesión inducida por DSS. De hecho, los ratones que recibieron la cepa BioSP comenzaron a ganar peso de nuevo 3 días antes de cada otro grupo. Las cepas R2C2 y BioSP mostraron mejor progreso en la integridad del colon. Además, la cepa *L. GG* no mostró ningún efecto beneficioso en este modelo. Estos resultados se muestran en las Tablas 15 y 16.

Grupos experimentales:

Grupo 1: 5 ratones, agua + solución salina p.o.

Grupo 2: 5 ratones, agua-DSS + solución salina p.o.

Grupo 3: 5 ratones, agua-DSS + R2C2 p.o.

Grupo 4: 5 ratones, agua-DSS + INIX p.o.

Grupo 5: 5 ratones, agua-DSS + BioSP p.o.

Grupo 6: 5 ratones, agua-DSS + K2 p.o.

Grupo 7: 5 ratones, agua-DSS + *L. GG* p.o.

Tabla 15

Variación del peso (%) durante el período de recuperación, después de 8 días de consumo de DSS								
Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
2	-15.37	-16.27	-17.09	-16.99	-15.75	-14.39	-14.48	-13.51
3	-17.01	-18.79	-18.39	-17.56	-14.60	-13.29	-13.55	-9.75
4	-17.13	-17.37	-16.90	-14.21	-13.06	-11.80	-10.83	-7.30
5	-14.99	-15.72	-13.78	-10.36	-8.54	-5.77	-6.01	-3.58
6	-16.95	-16.95	-16.41	-16.74	-14.16	-13.59	-12.21	-9.74
7	-20.97	-23.21	-25.18	-24.69	-22.36	-19.98	-17.82	-14.24

Tabla 16

Longitud del colon (postmortem) después de 8 días de consumo de DSS y 8 días de recuperación	
	Longitud del colon (cm)
1	7.44
2	6.13
3	6.55
4	6.32
5	6.70
6	6.42
7	6.15

Efecto de bacterias pasteurizadas o irradiadas sobre la inflamación intestinal

Los ratones C57BL/6 fueron tratados por sonda (p.o.) con 10^8 cfu/ml de diferentes cepas de *L. kefiranofaciens* una vez por día durante la duración del experimento. Los animales recibieron las cepas R2C2 o BioSP como bacterias vivas, pasteurizadas o irradiadas. La inflamación intestinal fue inducida por la adición de DSS (2.5%) al agua potable durante 8 días y luego se reemplazó con agua fresca durante 8 días para evaluar la rapidez del proceso de recuperación de la inflamación para los diferentes grupos de tratamiento. El nivel y progresión de la inflamación se evaluó a través de mediciones de la variación de peso y recuentos combinados de diarrea y sangre oculta. La longitud del colon y la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en el colon también se evaluaron al final del experimento. Las cepas R2C2 y BioSP mostraron efectos positivos, reduciendo la pérdida de peso durante la exposición a DSS, reduciendo los recuentos combinados de diarrea y sangre oculta. El aumento de peso también se inició con anterioridad durante el período de recuperación posinflamatorio. La integridad del colon fue también mejor para estos grupos, como se indica por el acercamiento a la longitud normal y la actividad de MPO. No se observó ninguna diferencia importante entre los grupos tratados con bacterias vivas, pasteurizadas o irradiadas. Para todos estos grupos, se observó un efecto protector similar. 5-ASA se usó para comparar la eficacia en ese experimento, debido a sus efectos antiinflamatorios conocidos. Para todos los parámetros evaluados, 5-ASA, R2C2 y BioSP mostraron efectos protectores comparables. Los resultados se muestran en las Tablas 17-20.

Grupos experimentales:

Grupo 1: 5 ratones, agua normal + solución salina p.o.

Grupo 2: 5 ratones, agua-DSS + solución salina p.o.

Grupo 3: 5 ratones, agua-DSS + R2C2 viva p.o.

Grupo 4: 5 ratones, agua-DSS + R2C2 Pasteurizado p.o.

Grupo 5: 5 ratones, agua-DSS + R2C2 Irradiada p.o.

Grupo 6: 5 ratones, agua-DSS +BioSP Viva p.o

Grupo 7: 5 ratones, agua-DSS + BioSP Pasteurizada p.o.

Grupo 8: 5 ratones, agua-DSS + BioSP Irradiada p.o.

Grupo 9: 5 ratones, agua -DSS + 5-ASA p.o

Tabla 17

Pérdida de peso (%) asociada con 8 días de exposición a DSS				
Grupo	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1	-0.20	2.26	0.35	1.26
2	-1.83	-5.23	-8.79	-13.5
3	-1.59	-3.74	-6.03	-8.65
4	-1.48	-2.23	-5.18	-7.02
5	-1.83	-3.78	-8.47	-10.4
6	-1.60	-2.69	-5.33	-8.51
7	-1.80	-3.70	-7.04	-9.94
8	-2.50	-4.73	-7.61	-9.18
9	-3.21	-3.64	-5.90	-8.07

Tabla 18

Variación de peso (%) durante un período de recuperación, después de 8 días de exposición a DSS						
Grupo	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1	4.23	3.56	2.29	1.12	3.26	5.21
2	-25.65	-27.36	-29.33	-33.27	-32.98	-34.0
3	-19.05	-18.13	-15.03	-14.49	-12.63	-11.7
4	-18.71	-16.31	-11.67	-10.72	-9.49	-7.22
5	-24.57	-27.39	-25.57	-23.87	-21.71	-20.7
6	-23.15	-22.54	-20.00	-21.06	-17.76	-14.1
7	-21.33	-21.25	-19.61	-21.30	-20.01	-13.0
8	-18.78	-17.05	-15.32	-15.80	-14.03	-11.1
9	-21.64	-20.97	-17.66	-17.11	-16.96	-11.6

Tabla 19

Recuentos combinados de sangre oculta y diarrea (evaluados en una escala de 8) después de un cierto número de días consumiendo DSS				
Grupo	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1	0	0	0	0
2	2.25	4.50	6.50	6.50
3	2.00	1.50	4.75	5.25
4	2.00	2.80	2.75	5.25
5	2.00	2.25	4.00	5.25
6	1.50	3.75	4.75	6.00
7	2.00	3.00	5.20	5.40
8	1.40	3.00	4.25	6.00
9	1.75	3.75	4.25	5.50

Tabla 20

Longitud del colon y actividad MPO en el colon (postmortem) después de 8 días consumiendo DSS y 8 días de recuperación		
Grupo	Longitud del colon (cm)	actividad MPO (U/g de tejido)
1	7.17	0.056
2	4.79	0.226
3	5.86	0.081
4	6.06	0.066
5	5.84	n/d
6	6.38	n/d
7	6.20	n/d
8	6.06	n/d
9	5.81	0.043

Protección contra alergias

El objetivo de este ensayo es verificar la capacidad de las cepas para modular una respuesta alérgica en un modelo de ratón. Los ratones BALB/c se inmunizaron por inyección i.p.(intraperitoneal) de OVA (ovoalbúmina) en alumbre (gel de Al(OH)₃) en el día 0 y el día 14, y el suero se recogió en los días 21, 35, y 42 para detectar IgG total y respuesta de anticuerpos OVA específicos. Este calendario de vacunación es suficiente para inducir una reacción alérgica fuerte a OVA en los ratones de control. El efecto antialérgico de las cepas de *Lactobacillus* (en comparación con *L. casei*) se evaluó en los grupos de ratones tratados por vía oral con las diferentes cepas para la duración del protocolo de inmunización. El desarrollo de una reacción alérgica se evalúa a través de la detección de la producción de IgG total y anticuerpos OVA específicos en el suero por ELISA. Los esplenocitos cultivados, de los diferentes grupos de tratamiento también están expuestos a OVA *in vitro* para evaluar la reacción alérgica a través de citocinas y la producción de anticuerpos.

Tratamiento de la hiperlipidemia

Los modelos animales seleccionados para evaluar los efectos de las cepas en la hiperlipidemia tienen varios parámetros fenotípicos en común (tales como la hiperlipidemia, la obesidad y la diabetes) y se han usado para confirmar de manera independiente los efectos beneficiosos de las cepas sobre estos.

Las diferentes cepas bacterianas fueron probadas por su capacidad para regular los niveles de lípidos en sangre en un modelo de rata de hiperlipidemia. Este protocolo describe la evaluación comparativa de las diferentes cepas con niacina (vitB3), un agente hipolipidémico potente, en la regulación de la hiperlipidemia inducida artificialmente en ratas. Las ratas Wistar inyectadas i.p. con poloxámero 407 desarrollaron rápidamente hiperlipidemia grave pero transitoria. Los niveles séricos de glucosa también se incrementan por este tratamiento. El efecto hipolipidémico de cepas de *L. kefiranofaciens* se evalúa en los grupos de ratas pretratadas por vía oral durante 7 días antes de la inyección de poloxámero. Los lípidos en sangre se midieron antes de la inyección y en 24 y 72 horas después de la inducción de la hiperlipidemia. Los niveles plasmáticos de triglicéridos, y colesterol se evaluaron. Después de un pretratamiento de 7 días, los triglicéridos plasmáticos se redujeron en el grupo tratado con niacina, mientras que se observó una reducción menos pronunciada en el grupo tratado con R2C2. Una reducción de los triglicéridos plasmáticos también se observó en todos los grupos de tratamiento 72 horas después de la inducción de la hiperlipidemia. La reducción más importante se observó en el grupo que recibe niacina (Tabla 21).

Grupo 1: 4 ratas, sonda solución salina

Grupo 2: 4 ratas, sonda niacina (100 mg/kg)

Grupo 3: 4 ratas, sonda R2C2 (1×10^8 cfu/ml)

Grupo 4: 4 ratas, sonda INIX (1×10^8 cfu/ml)

Grupo 5: 4 ratas, sonda BioSP (1×10^8 cfu/ml)

Grupo 6: 4 ratas, sonda K2 (1×10^8 cfu/ml)

Tabla 21

Triglicéridos en plasma (mmol/l) en animales tratados por 7 días y 72 horas después de la inducción de hiperlipidemia		
Grupo	Triglicéridos (mmol/l) después de 7 días de tratamiento	Triglicéridos (mmol/l) 72h postinducción de hiperlipidemia
1	1.55	95.42
2	0.97	69.96
3	1.31	84.24
4	1.52	75.70
5	1.43	82.75
6	1.89	85.90

Protección contra cáncer de colon

El objetivo del presente ensayo fue verificar la capacidad de las cepas para proteger a los ratones contra la formación de tumores en el modelo genético C57BL/6J-ApcMin. En este modelo, el 100% de los ratones heterocigotos ApcMin desarrollan por lo menos 30 adenomas intestinales espontáneos cuando se exponen a una dieta rica en grasas. El efecto antitumorigénico de las cepas se evaluó en los grupos de ratones heterocigotos ApcMin tratados por vía oral 3 veces por semana con las diferentes cepas durante el período de la formación de tumores.

Ejemplo 4

Digestión de la proteína encontrada en el suero

L. kefiranofaciens R2C2 se evaluó para su capacidad de hidrolizar un sustrato de proteína durante la fermentación. El suero se usó como un sustrato para mostrar que las bacterias tienen una capacidad de digerir la proteína común encontrada en suero tal como albúmina de suero bovino (BSA), alfa-lactalbumina (α -LAC), Beta-lactoglobulina (bLG) con el tiempo. El análisis se realizó por HPLC (Columna RP C-4 300 A (Phenomenex, Torrance, CA, USA) con un gradiente de elución (Tabla 22).

Tabla 22

Análisis HPLC de degradación (%) de proteína			
Tiempo (horas)	% de degradación α -LAC	% de degradación BSA	% de degradación bLG
0	100	100	100
24	90	96	25
48	81	93	4
72	45	79	0
96	24	64	0

Ejemplo 5

Potencial antiinflamatorio de un producto de suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 en dermatitis de contacto atópica

Un modelo murino de dermatitis de contacto atópica inducida con oxazolona en ratones se usó para determinar el efecto antiinflamatorio del suero fermentado con *Lactobacillus kefiranofaciens*R2C2. Este modelo de inflamación ha demostrado ser una herramienta sensible y útil para determinar la eficacia y la potencia de varios medicamentos antiinflamatorios e inmunosupresores usados en los trastornos dermatológicos como la soriasis, por ejemplo. Los medicamentos como glucocorticoides se usan comúnmente para aliviar la piel y la inflamación articular. El suero fermentado con R2C2 administrado por vía oral, ya sea de modo profiláctico (Tabla 24) o terapéutico (Tabla 23) reduce la inflamación como se muestra con una reducción de alrededor del 30% de la oreja y el espesor en ambos casos. En más detalles, el modelo murino de dermatitis de contacto atópica se basa en aquello descrito primeramente por Garrigue y otros (Contact Dermatitis., 30(4):231-273, 1994) y modificado como sigue: el abdomen de ratones CD-1 se les retiró el pelo y se realizó la fase de sensibilización con la aplicación de 100 microlitros de oxazolona 5% en acetona en el abdomen (Sigma-Aldrich, Oakville, On). Después de 4 días, la fase de elicitación (primer reto) se llevó a cabo con la aplicación de 50 microlitros de oxazolona 5% en acetona en la oreja derecha (25 microlitros a cada lado de la oreja). El segundo reto se realizó 7 días después del primer reto con el mismo procedimiento. El grosor de la oreja de los ratones se midió cada día.

Protocolo profiláctico (MPM) - dermatitis de contacto atópica de ratón

El potencial antiinflamatorio profiláctico de MPM (patente PCT/CA2002/01988) se evaluó primeramente por la administración de MPM, 7 días antes de la sensibilización. Tres grupos de 10 ratones CD-1 recibieron por sondas, cada día, 100 microlitros de MPM liofilizado reconstituido, agua y 1 mg de hidrocortisona soluble en agua (10 mg/ml). La dermatitis se indujo como se ha descrito previamente y el grosor de la oreja se midió cada día. El potencial antiinflamatorio terapéutico de MPM se evaluó por la administración de MPM sólo después del primer reto. Tres grupos de 10 ratones CD-1 recibieron por sondas, cada día, 100 microlitros de MPM liofilizado reconstituido, agua y 1 mg de hidrocortisona soluble en agua (10 mg/ml). La dermatitis de contacto atópica de ratón se realizó como se describió previamente y el grosor de la oreja se midió cada día. El peso de los ratones se midió dos veces a la semana.

Protocolo terapéutico (R2C2) - modelo de ratón de la dermatitis de contacto atópica

El potencial antiinflamatorio terapéutico de R2C2 se evaluó en un modelo animal de la dermatitis de contacto atópica por la alimentación de la suspensión bacteriana después del primer reto. El efecto protector de R2C2 se comparó con el de la hidrocortisona, debido a sus efectos antiinflamatorios bien conocidos sobre la dermatitis. R2C2 mostró una buena reducción de la inflamación, demostrado por el reducido grosor de la oreja. La eficacia fue comparable a la de la hidrocortisona. Los resultados se muestran en la Tabla 23-25.

Tabla 23

Tratamiento de dermatitis de contacto atópica (día 17)	
Tratamiento	Grosor de la oreja (mm)
Controles	0,55
Suero fermentado con R2C2	0,38
Hidrocortisona	0,29

Tabla 24

Protección contra la dermatitis de contacto atópica (día 9)	
Tratamiento	Grosor de la oreja (mm)
Controles	0,45
Suero fermentado con R2C2	0,32
Hidrocortisona	0,30

Tabla 25

Mediciones del grosor de la oreja (mm) durante la dermatitis de contacto atópica en animales de laboratorio			
	Día 15	Día 17	Día 22
Controles	0.26	0.39	0.34
R2C2	0.19	0.28	0.17
Hidrocortisona	0.18	0.27	0.15

Ejemplo 6

Potencial antitrigliceridemia de un producto de suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2

Animales

Para el experimento, las ratas hembras Wistar, 7 semanas de edad, con un peso 125-150g. fueron adquiridas de Charles River Canadá. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos diferentes, cada uno compuesto de al menos 6 animales. Las ratas recibieron una dosis de 1 ml de MPM, 1 ml de una suspensión de solución salina que contiene 10⁹ bacterias/ml de *Lactobacillus* R2C2 (la cepa de *Lactobacillus* usada para fermentar el suero), 1 ml PBS (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá) y 100 mg/kg de niacina (Sigma) como controles. Ellos fueron alojados en condiciones libres de patógenos específicos y se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 24h. Todos los animales consumieron la dieta estándar y recibieron agua *ad libitum*. La MPM estaba en una forma liofilizada y se preparó diariamente mediante la adición de 80% de agua y se mezcló para crear de nuevo un producto similar al yogur. La cepa bacteriana *Lactobacillus* R2C2 fue rutinariamente cultivada en caldo de cultivo MRS (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canadá) a 37 °C durante un período de 24h. Las bacterias se sedimentaron después por centrifugación a 4.000 rpm durante 8 minutos y se resuspendieron en una concentración de 10⁹ células/ml en PBS estéril (Invitrogen). La niacina se disolvió en agua para que las ratas recibieran una dosis de 100 mg de tratamiento por kg. La niacina no solubilizó perfectamente por lo que tuvo que ser sonicada 20 minutos. Los animales recibieron los tratamientos para un período de 7 días antes de la inyección del poloxámero 407 F-127 Pluronic de (BASF corporation, Mississauga, ON, Canadá). La solución de poloxámero 407 para inyección intraperitoneal (i.p.) se preparó al combinar el agente con agua estéril y refrigerar durante la noche para facilitar la disolución del polímero por el método en frío de incorporación.

Inducción de hiperlipidemia

5 Después del tratamiento de 7 días con los diferentes productos, todos los animales se hicieron hiperlipidémicos por una inyección i.p. de una dosis de 300 mg de poloxámero 407. Todas las jeringas fueron colocadas en hielo antes de la administración del poloxámero 407 para mantener el polímero en un estado viscoso móvil para facilitar la inyección, ya que las soluciones de poloxámero 407 a concentraciones mayores de aproximadamente 23% p/p exhiben propiedades térmicas inversas de gelatina.

10 Recolección de sangre

15 Aproximadamente 1 ml de sangre se recogió de la vena yugular en jeringas de 3 ml y se transfirieron inmediatamente en tubos de plástico heparinizados con litio (Sarstedt, Montreal, QC, Canadá). Los tubos se agitaron suavemente durante 10 segundos, y después se centrifugaron para permitir la separación del plasma. Las muestras de plasma se recogieron en eppendorf limpio de 1,5 ml y se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta el momento de análisis. Para la recogida de sangre, cada animal fue anestesiado mediante el uso de isoflurano (AErrane, Baxter Corporation, Deerfield, IL, Estados Unidos). La recogida de sangre se realizó después del tratamiento de 7 días con los diferentes productos, antes de la inyección de poloxámero 407 (t = 0, comparación de los niveles de lípidos postratamiento), 24 horas después de la inyección (t = 24h, comparación de los niveles de lípidos inducidos) y 72h después de la inyección (t = 72h, comparación de la recuperación hacia los niveles normales). Los animales fueron sacrificados después de la última recolección de sangre por el método de asfixia con CO₂. Todos los procedimientos para la alimentación de los diferentes tratamientos, para la administración de poloxámero 407 y subsecuentes recogidas de sangre estuvieron de acuerdo con la guía de la institución para el cuidado y uso de animales de laboratorio y aceptadas por el Comité de Ética.

25 Análisis de lípidos

Se analizaron las muestras de todos los grupos experimentales para el colesterol total y los triglicéridos. Todos los análisis se realizaron en un laboratorio independiente (Laboratoire medical Biron, 4105-F Matte Blvd, Brossard, Québec, Canadá, J4Y 2P4), ISO 9002 certificada, que ofrece un servicio de cuantificación de lípidos plasmáticos fiable.

30 R2C2 mostró una ligera capacidad de regular los niveles de triglicéridos basales (mmol/l) después de un tratamiento de 7 días, como se muestra en la Tabla 26. El mejor efecto se obtuvo con suero fermentado con bacterias. Las bacterias R2C2 redujeron los niveles de triglicéridos basales en cerca de un 30% y el suero fermentado con R2C2 redujo los niveles de triglicéridos basales en cerca de 40%, similar a la niacina, después de 7 días de tratamiento. Los niveles de triglicéridos también se redujeron 72h después de la inducción de la hiperlipidemia en el grupo tratado con R2C2, pero fueron particularmente modulados en los grupos tratados con niacina o MPM.

Tabla 26

40

Triglicéridos en plasma (mmol/L) en animales tratados por 7 días y 72 horas después de la inducción de hiperlipidemia		
Tratamiento	Niveles de triglicéridos (día 7 del tratamiento)	Niveles de triglicéridos (72 horas posinducción de hiperlipidemia)
45 Controles	1,83	95.42
R2C2	1,30	84.24
Suero fermentado con R2C2	1,12	61.99
50 Niacina	1,00	66.96

Tabla 27

<u>Niveles de colesterol (%) en animales tratados por 7 días y 72 horas después de la inducción de hiperlipidemia</u>	
Tratamiento	Niveles de CH (72 horas posinducción de hiperlipidemia) (%)
Controles	100
R2C2	95
Suero fermentado con R2C2	29
Niacina	33

Ejemplo 7

Potencial antihipertensivo de un producto de suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2

El potencial antihipertensivo de un producto de suero fermentado con R2C2 (MPM) se evaluó mediante el uso de ratas hembra SHR (6 semanas de edad). 12 ratas se asignaron al azar de acuerdo con su peso en cada grupo de tratamiento. Ellas fueron alojadas en condiciones libres de patógenos específicos y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los animales consumieron la dieta estándar y recibieron agua *ad libitum*. Los grupos fueron forzados a alimentarse diariamente, ya sea 1 ml de agua (grupo de placebo), MPM (5 ml/kg) o Enalapril-malato (10 mg/kg), debido a sus efectos hipotensores bien conocidos. La presión arterial sistólica (SBP) se midió semanalmente por el método de brazalete en la cola con el sistema automatizado de presión sanguínea de cola RTBP2000 (Kent Scientific, Torrington, CT, Estados Unidos). Las colecciones de datos se realizaron semanalmente y una media de 3 mediciones fue tomada como la SBP media inicial. Los datos fueron adquiridos y analizados con el software Biopac Student Lab Pro® versión 3.6.1 (Biopac System, Goleta, CA, Estados Unidos). Después de 2 semanas de tratamientos, el grupo tratado con enalapril tenía una SBP normalizada que va desde 184 mm Hg a 156 mm Hg. Una disminución constante de la SBP se observó cada semana con un cambio máximo de al menos 25% en la semana 4 para los animales forzados a alimentarse con MPM. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28

Presión sanguínea sistólica (mm Hg) de ratas SHR que recibieron varios tratamientos					
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Controles	185	181	184	183	187
Suero fermentado con R2C2	186	175	174	172	162
Enalapril	184	165	156	154	154
Enalapril + suero fermentado con R2C2	185	155	150	145	148

Ejemplo 8

Tratamiento de hiperlipidemia, obesidad y diabetes

Los modelos animales seleccionados para evaluar los efectos de las cepas sobre la hiperlipidemia, la obesidad y la diabetes tienen varios parámetros fenotípicos en común (tales como la hiperlipidemia, la obesidad y la diabetes) y se han usado para confirmar de manera independiente los efectos beneficiosos del suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2.

a) Modelo de hiperlipidemia

El suero que se fermentó con *L. kefiranofaciens* R2C2 se probó para su capacidad de regular los niveles de lípidos en sangre en un modelo de rata de hiperlipidemia. Este protocolo describió la evaluación comparativa con la niacina (vitB3), un agente potente hipolipidémico, en la regulación de la hiperlipidemia inducida artificialmente en ratas. Las ratas Wistar inyectadas i.p. con poloxámero 407 desarrollan rápidamente hiperlipidemia grave pero transitoria. Los niveles séricos de glucosa también se incrementaron por este tratamiento. El efecto hipolipidémico de *L. kefiranofaciens* se evalúa en los grupos de ratas pretratadas por vía oral durante 7 días antes de la inyección de poloxámero. Los lípidos en sangre se midieron antes de la inyección y en 24 y 72 horas después de la inducción de la hiperlipidemia. Se evaluaron los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol, HDL, LDL y glucosa. Después de un pretratamiento de 7 días, los triglicéridos plasmáticos se redujeron en el grupo tratado con niacina. Una reducción de los triglicéridos plasmáticos también fue observada en el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* grupo R2C2 72 horas después de la inducción de la hiperlipidemia.

Grupo 1: 4 ratas, sonda solución salina

Grupo 2: 4 ratas, sonda niacina (100 mg/kg)

Grupo 3: 4 ratas, sonda suero fermentado con *L. kefiranofaciens*R2C2 (1 ml por sonda)

Tabla 29

Triglicéridos plasmáticos (mmol/l) en animales tratados por 7 días y 72 horas después de la inducción de hiperlipidemia		
Grupo	Triglicéridos (mmol/l) después de 7 días de tratamiento	Triglicéridos (mmol/l) 72h posinducción de hiperlipidemia
1	1.55	97.72
2	0.97	69.96
3	1.31	68.76

b) Modelo de hipertrigliceridemia y obesidad

El suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 se ensayó para su capacidad para regular la ganancia de peso y los niveles de lípidos en sangre en un modelo de rata de hiperlipidemia inducida por la dieta. Este protocolo permite una comparación con niacina (vitB3) en la regulación de la hiperlipidemia inducida por la dieta en ratas. Las ratas Wistar expuestas a la fructosa (en una concentración de 10%) en el agua potable muestran una ganancia de peso gradual y desarrollan hiperlipidemia en un periodo de cuatro semanas. Los efectos hipolipidémicos de suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 durante el periodo de tratamiento con fructosa fueron evaluados. Las muestras de sangre se recogieron antes del inicio de tratamiento con fructosa, y una vez a la semana por 4 semanas durante la inducción de la hiperlipidemia. Los niveles de triglicéridos en suero se midieron.

Grupo 1: sonda solución salina

Grupo 2: sonda niacina (100 mg/kg)

Grupo 3: sonda suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 (1 ml por sonda dos veces al día)

Grupo 4: sonda de 1 % Exopolisacárido

Tabla 30:

Niveles de triglicéridos			
Grupo	% con relación a la solución salina el Día 0	% sobre el grupo de solución salina Día 7	% sobre el grupo de solución salina Día 21
1	100	260	270
2	100	150	160
3	100	170	150
4	100	220	290

Tabla 31

Ganancia de peso en fructosa				
Grupo	% con relación al día 0 Día 7	% con relación al día 0 Día 16	% con relación al día 0 Día 25	% con relación al día 0 Día 33
1	7	12	17	21
3	2	6	11	14
4	3	9	17	22

c) Modelos del manejo del peso y la grasa

El suero que se fermentó con *L. kefiranofaciens* R2C2 se ensayó para su capacidad para regular la distribución de la grasa así como la ganancia de peso en el modelo de rata hipertensiva espontánea y en ratas ovariectomizadas. Se usó el modelo SHR como se ha descrito anteriormente solamente usado para controlar los niveles de grasa visceral que se acumulan en el vientre a continuación. Los animales se alimentaron con 1 ml de suero fermentado con *L.kefiranofaciens* R2C2 (20% de sólido) una vez al día durante 56 días (P.O. q1x56)

Grupo 1:12 ratas, sonda solución salina

Grupo 2:12 rata, sonda niacina (100 mg/kg)

Grupo 3:12 ratas, sonda suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 (1 ml por sonda)

Tabla 32

Modelo SHR	
Grupo	% de animales con grasa visceral
1	100
2	70
3	20

Tabla 33

Ratas ovariectomizadas	
Cuarenta y cinco ratas Wistar de 12 meses de edad fueron usadas y asignadas aleatoriamente en 2 grupos operados artificialmente y 2 grupos de ovariectomía (OVX), es decir, OVX con solución salina (grupo OVX), un OVX con suero fermentado con <i>L.kefiranofaciens</i> R2C2 (1 ml por sonda). La administración oral diaria comenzando el día 4 después de OVX durante 12 semanas. La diferencia es de aproximadamente 8% de ganancia de peso en favor de los animales alimentados con suero fermentado con <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2.	
Grupo	ganancia de peso en comparación con las operadas artificialmente alimentadas con cualquier solución salina de suero fermentado con <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2 (1 ml por sonda)
1 (OVX solución salina)	1.32 X
2 (OVX con suero fermentado con <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2)	1.24 X

Ejemplo 9

Efecto del suero fermentado con *L. Kefiranofaciens* R2C2 en la piel humana

La actividad tópica de suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 se controló por medio de biomarcadores sensibles y significativos de la integridad de la piel tales como la prostaglandina E2 (PGE2) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), ambos guardianes del grado de homeostasis epitelial (8). El suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 se comparó con un fármaco antiinflamatorio no esterooidal (ibuprofeno), un inhibidor no selectivo de la Cox-2 y con un producto comercial caro con un nombre de marca popular, Regenerist Olay®. El objetivo fue controlar el efecto del suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 en la expresión de Cox-2 y también los niveles basales e inducidos de PGE2 que siguen a un daño inducido por luz ultravioleta ambiental (UVB) y solar. En estos experimentos el suero fermentado con *L. kefiranofaciens*R2C2 fue usado profilácticamente o terapéuticamente en la piel humana. En todas las condiciones experimentales probadas, el suero fermentado con *L. kefiranofaciens*R2C2 mostró un efecto inhibidor significativo en ambos biomarcadores de integridad La expresión de Cox-2 se redujo seguido de la exposición al suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 como se muestra por la RT-PCR. Siguiendo esta observación, hemos tratado de explicar la inhibición de la Cox-2 mediante la exploración de los genes que podrían diferenciar y explicar esta actividad y descartar un potencial afecto negativo. Hemos encontrado que, además de reducir la expresión de Cox-2, que la expresión de 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH), un enzima degradante de la prostaglandina que fisiológica y naturalmente antagoniza con la Cox-2 estaba aumentada. Para impulsar aún más esta observación, se midió la consecuencia de la reducción de la Cox-2 en la de la biosíntesis de PGE2 en los queratinocitos humanos y la piel humana expuesta al suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2. Se encontró que el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 estaba reduciendo los niveles basales de PGE2 en aproximadamente 75% después de una exposición de 24 horas en ausencia de daño externo. En una situación donde se usó UVB como un daño ambiental, el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 previno la inducción de PGE2 lo que sugiere un papel protector del suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2. Finalmente, cuando se usa, ya sea antes o después de la exposición a UVB, suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 se exhibe la misma actividad protectora e incluso una actividad terapéutica como se demuestra cuando el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 se aplicó después de la exposición a UVB. También es importante señalar que Regenerist Olay® fue menos eficaz que el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 incluso usado sin diluir.El suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 no pudo ser probado en un estado no diluido en este diseño experimental pero creemos que su actividad tópica podría aún más estar incrementada si se usa sin diluir. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 exhiben una funcionalidad biológica interesante en la piel humana.

Efecto del suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2

Ejemplo 10

Efecto del suero fermentado con *L. Kefiranofaciens* R2C2

Tres voluntarios estuvieron dispuestos en su propio consentimiento para consumir el suero fermentado con *L. kefiranofaciens* R2C2 por varios periodos de tiempo. Dos individuos tenían el colesterol alto y uno tenía diabetes y la presión arterial alta lo que se traduce en entumecimiento ocasional en las manos. Los primeros 2 voluntarios con colesterol alto tomaron por un período de 10 días el equivalente de 25 gramos por día, mientras que el voluntario con la diabetes gestacional y la presión arterial alta tomó el producto (100 ml húmedo) por un período de 3 semanas. Los resultados fueron como sigue, hubo una reducción de 12% y 15% de colesterol total para los primeros 2 individuos y un total alivio del entumecimiento e incluso una prevención de la diabetes gestacional. Estos resultados sugieren que algunos efectos beneficiosos positivos deben ser probados en un formato clínico más riguroso y rígido.

Tabla 34

Efecto de la consumación de suero fermentado con <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2 por varios periodos de tiempo		
Análisis	Voluntario 1	Voluntario 2
colesterol total (mmol/l)	De 4.9 a 4.2 (15% reducción)	De 7.68 a 6.77 (12%)
Triglicéridos (mmol/l)	De 3 a 3.5	De 1.66 a 1.33
Coolest LDL (Calculado)	De 2.7 a 1.9	De 5.57 a 5.04
relación Coolest/HDL	De 6.2 a 6.0	NA

El *Lactobacillus kefiranofaciens* de la presente invención también puede usarse para fermentar sustratos como los productos de leche, suero de leche y suero de queso que conducen al producto beneficioso que tiene varios efectos. Los procesos de fermentaciones de suero de queso se usan para la producción de un suplemento alimenticio rico en proteínas de rumiantes, en la producción de vino. El suero de queso fermentado tiene también la capacidad de actuar como un antioxidante, antihipertensivo, antitumoral, hipolipemiente, antiviral, antibacterial, y agente quelante.

Listado de secuencias

<110> Technologies Biolactis Inc.
SIMARD, Eric
PRECOURT, Louis-Philippe
LEMIEUX, Pierre

<120> Uso de *Lactobacillus kefiranofaciens* como un probiótico y un simbiótico.

<130> 15468-9PCT

<140> 06705161.5

<141> 2006 02 10

<150> 60/651,657

<151> 2005-02-11

<160> 9

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador sentido para amplificar el gen 16S de 5 lactobacilos diferentes

<400> 1

20 agagtttgat cmtggctcag

5 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223>Iniciador antisentido para amplificar el gen 16S de 5 lactobacilos diferentes

<400> 2

20 aaggagggtga tccarccgca

15 <210> 3
<211> 1411
<212> ADN
<213> Lactobacillus kefiranofacien

20 <223> Cepa R2C2

<400> 3

25 gcagaatcac ttcggtgagg acgctgggaa agcgaagcggc ggatgggtga graacacgtg 60
gggaacctgc ccttaagtct gggataccac ttggaaacag gtgctaatac cggataagaa 120
agcagttcgc atgaacagct tttaaaaggc ggcgcaagct gtcgctaag gatggaccg 180
cgggtgatta gctagttggt aaggtaacgg cctaccaagg cagtgatgca tagccgagtt 240
gagagactga tcggccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca 300
gtagggaaac ttccacaatg gacgcaagtc tgaaggagca acgcccgtg agtgaagaag 360
gttttcggac cgtaaagctc tgttgttggg gaagaaggat agaggtagta actggccttt 420
atttgacggc aatcaaccag aaagtcacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac 480
gtaggtggca agcgttgctc ggatttattg ggcgtaaaag gagegcagcc ggaagaataa 540
gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaattgcat cggaaactgt tttcttgag 600
tgcagaagag gagagtagaa ctccatgtgt agcggtgga tgcgtagata tatggaagaa 660
taccagtgcc gaagcgctc tctggtctgc aactgacgct gaggctcga agcatgggta 720
gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgagtgct aagtgttggg 780

35 agcctccgc ctctcagtc tgcagctaac gcattaagca ctccgctcgg ggagtacgac 840
cgcaaggttg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga gcatgtggtt 900
taattcgaag caacgcgaag aacctfaccg ggtcttgaca tctagtgcga tttgtagaga 960
tacaaagtcc cttcggggac gctaaagcag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgctg 1020
tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg ttattagtty ccagcatata 1080
gttgggact ctaatgagac tggcggtagc aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag 1140
tcacatgccc ccttatgacc tgggttacac acgtgctaca atgggcagca caacgagcag 1200
cgagcctgca aaggcaagca aatctctgaa agctgttctc agttcggact gcagcttgcg 1260
actcagctgc acgaagctgg aatcgttagt aatcgcggat cagcagcggc cggtgaaatc 1320
gttcccgggc cttgtacaca ccgccgtca cccatggga gctcgaatg cccaagccg 1380
gtggcctaac cgcaaggaag gagccgtcta a 1411

45 <210> 4
<211> 1411
<212> ADN

50 <213> Lactobacillus kefiranofaciens
<223> Cepa INIX

<400> 4

```

5  gcagaatcac ttcggtgagg acgctgggaa agcgagcggc ggatgggtga gtaacacgtg 60
   gggaaacctgc ccttaagtct gggataccac ttggaaacag gtgctaatac cggataagaa 120
   agcagttcgc atgaacagct tttaaaaggc ggcgcaagct gtcgctaaag gatggaccgg 180
   cggtgcaatta gctagttggt aaggtaacgg cctaccaagg cagtgatgca tagccgagtt 240
   gagagactga tccgccaatg tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca 300
   gtagggaatc tccacaatg gacgcaagt tgatggagca acgcccgtg agtgaagaag 360
   gtttccggac cgtaaagctc tgttgttgg gaagaaggat agaggtagta actggccttt 420
   atttgacggt aatcaaccag aaagtcacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac 480
   gtaggtgcca agcgttgccc ggatttattg ggcgtaaaag gagcgcagcc ggaagaaata 540
   gtcctgatgt aaagccctcg gcttaaccga ggaattgcat cggaaaactgt ttttcttgag 600
10  tgcagaagag gagagtagaa ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tatggaagaa 660
   taccagtggc gaagcggctc tctggtctgc aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta 720
   gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca tgcgtaaac gatgagtgt aagtgttggg 780
   aggcctccgc ctctcagtcg tgcagtaac gcattaaaga ctccgcttgg ggagtacgac 840
   cgcaaggttg aaactcaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt 900
   taattcgaag caacgcgaag aaccttacc ggtcttgaca tctagtcca ttttagaga 960
   tacaagttcc cttcggggac gctaagacag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtctcg 1020
15  tgagatgttg ggttaagctc cgcaacgagc gcaacccttg ttattagttg ccagcattaa 1080
   gttgggcaact ctaatgagac tgcggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgcgctcaag 1140
   tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atgggcagca caacgagcag 1200
   cgagcctgca aaggcaagca aatctctgaa agctgttctc agttcggact gcagctctga 1260
   actcgactgc acgaagctgg aatcgcctagt aatcgcggat cagcacgccc cggtaatac 1320
   gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgta caccatggga gtctgcaatg cccaagccc 1380
   gtggcctaac cgcaaggaag gagccgtcta a

```

```

20  <210> 5
     <211> 1411
     <212> ADN
25  <213> Lactobacillus kefiranofaciens
     <223> Cepa BioSP

```

```

30  gcagaatcac ttcggtgagg acgctgggaa agcgagcggc ggatgggtga gtaacacgtg 60
   gggaaacctgc ccttaagtct gggataccac ttggaaacag gtgctaatac cggataagaa 120
   agcagttcgc atgaacagct tttaaaaggc ggcgcaagct gtcgctaaag gatggaccgg 180
   cggtgcaatta gctagttggt aaggtaacgg cctaccaagg cagtgatgca tagccgagtt 240
   gagagactga tccgccaatg tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca 300
   gtagggaatc tccacaatg gacgcaagt tgatggagca acgcccgtg agtgaagaag 360
   gtttccggac cgtaaagctc tgttgttgg gaagaaggat agaggtagta actggccttt 420
   atttgacggt aatcaaccag aaagtcacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac 480
   gtaggtgcca agcgttgccc ggatttattg ggcgtaaaag gagcgcagcc ggaagaaata 540
   gtcctgatgt aaagccctcg gcttaaccga ggaattgcat cggaaaactgt ttttcttgag 600
35  tgcagaagag gagagtagaa ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tatggaagaa 660
   taccagtggc gaagcggctc tctggtctgc aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta 720
   gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca tgcgtaaac gatgagtgt aagtgttggg 780
   aggcctccgc ctctcagtcg tgcagtaac gcattaaaga ctccgcttgg ggagtacgac 840
   cgcaaggttg aaactcaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt 900
   taattcgaag caacgcgaag aaccttacc ggtcttgaca tctagtcca ttttagaga 960
   tacaagttcc cttcggggac gctaagacag gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtctcg 1020
40  tgagatgttg ggttaagctc cgcaacgagc gcaacccttg ttattagttg ccagcattaa 1080
   gttgggcaact ctaatgagac tgcggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgcgctcaag 1140
   tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atgggcagca caacgagcag 1200
   cgagcctgca aaggcaagca aatctctgaa agctgttctc agttcggact gcagctctga 1260
   actcgactgc acgaagctgg aatcgcctagt aatcgcggat cagcacgccc cggtaatac 1320
45  gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgta caccatggga gtctgcaatg cccaagccc 1380
   gtggcctaac cgcaaggaag gagccgtcta a

```

```

50  <210> 6
     <211> 1411
     <212> ADN
     <213> Lactobacillus kefiranofaciens
55  <223> Cepa K2
     <400> 6

```


5
 10
 15
 20

```

gcagaatcac ttcggtgagg acgctgggaa agcgcgcggc ggatgggtga gtaacacgtg 60
gggaacctgc ccttaagtct gggataccac ttggaaacag gtgctaatac cggataagaa 120
agcagttcgc atgaacagct tttaaaaggc ggcgcaagct gtgcgtaaaag gatggaccgc 180
cgggtgactga gctagttggt aaggtaacgg cctaccaagg cagtgatgca tagccgagtt 240
gagagactga tgcggccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca 300
gtaggggaatc tttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca acgcccgtg agtgaagaag 360
gttttcggac cgtaaagctc tgttgrtggg gaagaaggat agaggtagta actggccttt 420
atttgacggg aatcaaccag aaagtacagg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat 480
gtagggtggca agcgtttgtcc ggatttattg ggcgtaaacg gagcgcaggc ggaagataa 540
gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaattgcat cggaaactgt ttttcttgag 600
tgcagaagag gagagtagaa ctccatgtgt agcgggtgaa tgcgtagata tatggaagaa 660
taccagtggt gaagcggctc tctygtctgc aactgacgct gaggctcgaag agcargggta 720
gcgaacagga ttagataccg tggtagtcca tgcctgaaac gatgagtgct aagtgttggg 780
aggcttcggc ctctcagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcttgg ggagtacgac 840
cgcaaggttg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgttggg gcatgtgttt 900
taactcgaag caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tctagtgcga tttgtagaga 960
tacaagaatt ctctggggac gctaagacag gtgggtgcat gctgtctgca gctcgtgtcg 1020
tgagatgttt gyttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg ttattagtgt ccagcattaa 1080
gttgggcact ctaatgagc tgcctgtgac aaaccggagg aaggtgggga tgcgtcaag 1140
tcatcatgac cttatgacc tgggtacac acgtgtaca atgggcagca caacgagcag 1200
cgagcctgca aaggcaagca aatctctgaa agctgttctc agttcggact gcagctgca 1260
actcagctgc acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagcagcccg cgggtgaatac 1320
gttcccgggc ctgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtctgcaatg cccaaagccg 1380
gtgcccatac cgcaaggaag gagccgtcta a 1411
  
```

25
 30

<210> 7
 <211> 1384
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus kefiranofaciens
 <223> Cepa ES1
 <400> 7

35
 40
 45

```

agaatcactt. cgggtgaggc gctgggaaag cgagcggcgg atgggtgagt aacacgtggg 60
gaacctgccc traagtctgg gataccactt ggaaacaggt gctaataacc gataagaag 120
cagttcgcac gaacagcttt taaaaggcgg cgcaagcgtg cgtataagga tggaccctgc 180
gtgacttagc tagttggtaa ggtaacggcc taacaagcga gtgatgata gccgagttga 240
gagactgac ggccacattg ggaactgagc acggcccata ctctacggg aggcagcagt 300
agggaaactt ccacaatgga cgcgaagtct atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggt 360
tttcggaccg taaagctctg ttgttgggga agaaggatag aggtagtaac tggcctttat 420
ttgacggtaa tcaaccagaa agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt 480
aggtggcaag cgttctcgg atttatttgg cgtaaagcga gcgcagggcg aagaataagt 540
ctgatgtgaa agccctcggc ttaaccgagg aattgcatcg gaaactgttt tttctgagtg 600
cagaagagga gagtagaact ccattgttag cgggtggaatg cgtagatata tggagaagaa 660
ccagtggcga agcggctctc tggcttgcga ctgacgctga ggctcgaag catgggtagc 720
gaacaggatt agataccctg gtatctcatg ccgtaaacga tgagtgcata gtttgggag 780
gcttctgcct ctccagtgct cagctaacgc attaagcact ccgcttgggg agtacgaccg 840
caaggttgaa actcaaaagaa atgacgggg gccccgacaa gcgggtggagc atgtgtttaa 900
attcgaagca actcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc tagtgccatt ttagagata 960
caaaagttcct tcggggagc taagacaggt ggtgcatggc tgtcgtcagc tctgtctgtg 1020
agatgttggg ttaagtccc caacgagcgc aaacctgttt attagtgtcc agcattaaat 1080
tgggcaactc aatgagactg ccggtgacaa accggagaa ggtgggagt acgtcaagtc 1140
atcatgccc ttatgacctg ggtacacac gtgctacaat gggcagcaca acgagcagc 1200
agcctgcgaa ggcgaagaaa tctctgaaag ctgttctcag ttcggactgc agtctgcaac 1260
tcgactgcac gaagctggaa tgcctagtaa tgcggtatca gcacgcccgc gtaatacgt 1320
tctcgggctt tgtacacacc gccctgcaca ccattgggagt ctgcaatgcc caaagccgtt 1380
ggcc 1384
  
```

50
 55
 60

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> iniciador PCR sentido para amplificar específicamente el gen 16S de L. kefiranofaciens R2C2
 <400> 8
 24 taagaaagca gttcgcgatga acag

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> iniciador PCR antisentido para amplificar específicamente el gen 16S de L. kefiranofaciens
R2C2
10
<400> 9
24 gggactttgt atctctacaa atgg

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición probiótica que comprende una cantidad efectiva de *Lactobacillus kefiranofaciens* en asociación con un portador adecuado, en donde dicho *Lactobacillus kefiranofaciens* es una cepa seleccionada del grupo que consiste en R2C2, INIX1 K2, y ES1, para usar en la protección de un sujeto contra la inflamación intestinal.
2. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde se administra una cantidad efectiva de dicha composición.
- 10 3. La composición para usar de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha inflamación intestinal es causada por una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerativa (UC) o por un síndrome del intestino irritable (IBS).
- 15 4. La composición para usar de la reivindicación 1 a 3, en donde dicha composición es para administración oral, rectal o vaginal.
5. La composición para usar de la reivindicación 1 a 4, en donde dicha composición es para administración oral.
- 20 6. La composición para usar de la reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición se administra en una forma seleccionada del grupo que consiste en una población bacteriana viva, una población bacteriana liofilizada, como un producto lácteo fermentado y como una muestra bacteriana no viable.
- 25 7. La composición para usar de la reivindicación 6, en donde dicha muestra bacteriana no viable se selecciona del grupo que consiste en una bacteria muerta por calor, una bacteria irradiada y una bacteria lisada.
8. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde el compuesto probiótico tiene un efecto antiinflamatorio.
9. La composición para usar de la reivindicaciones 1-8, en donde dicha composición se usa en asociación con un compuesto antiinflamatorio.
- 30 10. La composición para usar de la reivindicación 9, en donde el compuesto antiinflamatorio es 5-ASA o un corticosteroide.