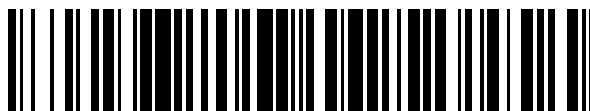


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 434**

51 Int. Cl.:

A23C 9/20 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008 E 08718285 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2131859**

54 Título: **Simbióticos para mejorar la microbiota intestinal**

30 Prioridad:

28.03.2007 EP 07105074

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

14.07.2016

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**HUBER-HAAG, KARL-JOSEF;
FICHOT, MARIE-CLAIRE;
ROCHAT, FLORENCE y
SPRENGER, NORBERT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 577 434 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

Simbióticos para mejorar la microbiota intestinal

5 Sector de la invención

La presente invención, se refiere a la administración, a niños pequeños lactantes (bebés), nacidos mediante una operación de cesárea, de una mezcla específica de simbióticos, a saber, un probiótico y un oligosacárido, capaz de fomentar una microbiota bifidogénica del intestino.

10

Antecedentes y trasfondo de la invención

Se cree que, inmediatamente antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal de un niño pequeño lactante o bebé, es estéril. Durante el proceso normal de nacimiento, éste se encuentra con bacterias procedentes del tracto digestivo, de la piel, y del entorno medioambiental de la madre, y así, por lo tanto, su intestino comienza a colonizarse. La microbiota o microflora fecal de un niño pequeño lactante o bebé, sano, el cual haya nacido por vía vaginal, que se alimente de leche del pecho materno (amamantamiento), que tenga una edad de 2 a 4 semanas, y la cual puede tomarse como una microbiota o flora intestinal óptima, para este grupo, se encuentra dominada por las especies de Bifidobacterias, con algunas especies de Lactobacilos, y unas cantidades menores de bacteroides, como las especies *Bacterioides fragilis*, hasta la exclusión de patógenos potenciales tales como los consistentes en las Crostidias. Después de haberse completado la finalización del destete, a una edad de aprox. 2 años de edad, de empieza a establecer, en el intestino del niño pequeño lactante o bebé, un modelo patrón de la microbiota o microflora intestinal, la cual se asemeja a la microbiota o microflora intestinal de una persona adulta.

15

20

25

30

Debería tomarse debida nota, en cuanto al hecho consistente en que, en el niño pequeño lactante o bebé, sano, el cual haya nacido por vía vaginal, y que se alimente de leche del pecho materno, las Bifidobacterias, forman la base de la microbiota o flora intestinal, la cual alcanzar un porcentaje del 60 % – 90 % de las bacterias en el intestino del niño pequeño. La nutrición mediante el amamantamiento o alimentándose de la leche materna, fomenta el desarrollo de la barrera intestinal, el cual, conjuntamente con el dominio de las bifidobacterias, conduce a una absorción mejorada y así, por lo tanto, a la utilización mejorada de la nutrición ingerida.

35

40

Grönlund *et al.*, han estudiado la microbiota fecal de los niños pequeños lactantes o bebés, los cuales han nacido mediante una operación de cesárea, y la han comparado con la un grupo de niños pequeños lactantes o bebés comparables, los cuales hayan nacido por vía vaginal. Éstos llegaron a la conclusión de que, la flora intestinal de los niños pequeños lactantes los cuales habían nacido mediante una operación de cesárea, pueden encontrarse desequilibrada, hasta lo seis meses después del nacimiento. De una forma específica, éstos han notado el hecho de que, las tasas de colonización de las Bifidobacterias y de los Lactobacilos, en el grupo de niños pequeños lactantes (bebés) los cuales habían nacido mediante una operación de cesárea, alcanzaban las tasas de colonización correspondiente al grupo de niños pequeños lactantes (bebés), nacidos por vía vaginal, sólo después de un mes y de días, respectivamente (véase, a dicho efecto, el trabajo de Grönlund *et al.*, "Fecal Microflora in Healthy Infants Born by Different Methods of Delivery: Permanent Changes in Intestinal Flora After Cesarean Delivery", - Microflora fetal en los niños pequeños lactantes (bebés), nacidos mediante diferentes procedimientos de parto : Cambios permanentes en la flora intestinal, después de parto por cesárea -, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28 : 19 - 25).

45

50

55

60

65

Otros investigadores, han sugerido el hecho de que, esta colonización retardada / anormal, puede tener unas consecuencias específicas, en términos de desarrollo subsiguiente del niño pequeño lactante (bebé) y han relacionado estas consecuencias a las diferencias en la flora intestinal. Así, por ejemplo, Laubereau *et al.*, encontraron el hecho consistente en que, los niños pequeños lactantes o bebés, nacidos mediante una operación de cesárea, tenían un mayor riesgo de sufrir de diarrea, que lo niños pequeños lactantes o bebés nacidos por vía vaginal (véase, a dicho efecto, Laubereau *et al.*, *Caesarean Section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis and sensitisation during the first year of life*", - Partos por cesárea y síntomas gastrointestinales, dermatitis atópica y sensibilización, durante el primer año de vida - (del niño pequeño nacido, se entiende)-, *Arch Dis Child* 2004; 89 : 993 -997). Negele *et al.*, encontraron que, el parto por cesárea, puede ser un factor de riesgo adicional, para el jadeo o respiración silbante y la sensibilización a los alérgenos alimentarios, hasta la edad de dos años (véase, a dicho efecto, el trabajo de Negele *et al.* "Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life" – Forma de parto, y desarrollo de una enfermedad atópica, durante los 2 años de edad – (del bebé, se entiende) -, *Pediatr Allergy Immunol* 2004: 15: 48 - 54). Se ha sugerido también el hecho de que, puede también encontrarse implicada una inflamación sistémica de grado reducido y una subóptima macrobiota intestinal, en del desarrollo de la obesidad (véase, a dicho efecto, el trabajo de Fantuzzi G. "Adipose tissue, adipokines, and inflammation" – Tejido adiposo, adipocinas, e inflamación -, *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 911 – 919. Véase, también, el trabajo Bäckhed F, Ding H, Wang T, *et al.* "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage" – La microbiota intestinal, es un factor medioambiental, el cual regula el almacenamiento de la grasa -, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 15718 - 15723).

La leche materna, es la que se recomienda para todos los niños pequeños lactantes o bebés. Sin embargo, no

obstante, en algunos casos, la alimentación por amamantamiento, es inadecuada o infructuosa, debido a razones médicas, o bien debido al hecho de que, la madre, decido no amamantar, es decir, no dar el pecho, para alimentar al niño pequeño lactante o bebé. Las fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés, se han desarrollado para estas situaciones.

5 En un pasado reciente, ciertas cepas de bacterias, han atraído una considerable atención, debido a que se ha encontrado que, éstas, exhiben unas valiosas propiedades para el hombre, si se procede a su ingestión. De una forma particular, se ha encontrado que, las cepas específicas del género Lactobacilli (lactobacilos) y Bifidobacteria (bifidobacterias), son aptas para colonizar el intestino, para reducir la capacidad de que las bacterias patogénicas se adhieran al epitelio intestinal, para tener unos efecto inmunomoduladores y para asistir o ayudar en el mantenimiento del bienestar. A tales tipos de bacterias, se les denomina, a menudo, probióticos, y se ha propuesto ya el hecho de que se añadan bacterias probióticas apropiadas, a las fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés.

15 Se ha procedido a llevar a cabo extensos estudios, con objeto de identificar nuevas cepas probióticas. Así, por ejemplo, en la patente europea EP 0 199 535, en la patente europea EP 0 768 375, en la publicación de patente internacional WO 97 / 0 0078, en la patente europea EP 0 577 903 y en la publicación de la patente internacional WO 00 / 53 200, se dan a conocer cepas específicas de Lactobacilli (lactobacilos) y de Bifidobacteria (bifidobacterias), y sus efectos beneficiosos.

20 Más recientemente, se han expresado algunas inquietudes, a propósito de la adición de las bacterias probióticas en las fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés, las cuales se pretendan como siendo la única fuente de nutrición para los niños pequeños lactantes o bebés, en los primeros seis meses de vida. Estas preocupaciones, se han resumido en el documento de posicionamiento médico del Comité en asuntos de Nutrición de la Sociedad Europea para la gastroenterología, hepatología y nutrición pediátricas ESPGHAN (de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition), titulado, "Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants", - Bacterias probióticas en productos dietéticos para niños pequeños lactantes o bebés -, (Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, 38: 365 - 374).

30 Otro método de ensayo propuesto para fomentar los valores o números y / o actividades de bacterias beneficiosas, en el colon, es la consistente en la adición de prebióticos a las materias o productos alimenticios. Un prebiótico, es un ingrediente alimenticio no digerible, el cual afecta, de una forma beneficiosa, al huésped, procediendo a la estimulación, de una forma selectiva, del crecimiento y de la actividad de una bacteria, o de un limitado número de bacterias, en el colon, y mejorar así, de este modo, la salud del huésped. Tales tipos de ingredientes, son no digestibles, en el sentido de que, éstos, no se descomponen ni tampoco se absorben en el estómago o en el intestino delgado, y así, de éste modo, éstos pasan intactos al colon, en donde, éstos se fermentan, de una forma selectiva, mediante las bacterias beneficiosas. Los ejemplos de los prebióticos incluyen a ciertos oligosacáridos, tales como los consistentes en los fructooligosacáridos (FOS) y en los galactooligosacáridos (GOS).

40 La leche humana, según se conoce, contiene una mayor cantidad de oligosacáridos no digeribles, que la mayoría de otras leches de animales. Así, de hecho, los oligosacáridos no digeribles, representan el tercer mayor componente sólido (después de la lactosa y de los lípidos), en la leche materna, la cual se encuentra en una concentración de 12 - 15 g / l, en el colostrum (calostro o primera leche humana, después de los primeros días del parto), y de 5 - 8 g / l, en la leche madura. Los oligosacáridos de la leche humana, son muy resistentes a la hidrólisis enzimática, indicando el hecho de que, estos oligosacáridos, pueden exhibir una funciones esenciales, la cuales no se encuentran directamente relacionadas con su valor calórico.

50 A medida que, la composición de la leche humana, se va conociendo cada vez de una forma mejor, se ha propuesto así mismo, también, el añadir probióticos a la fórmula para niños pequeños lactantes o bebés. En el mercado, se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, varias fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés, la cuales se encuentran suplementadas con prebióticos, tales como las mezclas de fructooligosacáridos y de galactooligosacáridos. Sin embargo, no obstante, tales tipos de mezclas, se aproximan sólo de una tosca forma, a la mezcla de oligosacáridos la cual se encuentra presente en la leche humana. Se han detectado más de 100 diferentes componentes de oligosacáridos en la leche humana, y algunos de ellos, no se han detectado todavía, de modo alguno, en las leches de los animales, tales como las leches consistentes en la leche bovina, o bien, éstos componentes oligosacáridos, se han detectado únicamente en pequeñas cantidades. Los ejemplos de las clases de oligosacáridos de la leche humana, la cuales se encuentran presentes, en la leche bovina, y en el calostro, lo están únicamente en muy pequeñas cantidades, o no lo están en absoluto, y éstos son los oligosacáridos sialilados o los oligosacáridos fucosilados.

60 Las fórmulas paran niños pequeños lactantes o bebés, las cuales contienen ambos, probióticos y prebióticos, han sido también propuestas, en la aventura continuada para producir fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés, las cuales reproduzcan tan cercanamente como sea posible, la composición y la eficacia de la leche humana. Así, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO 2005 / 000 748, se propone el suplementar la fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés, con una mezcla de una cepa de *Bifidobacterium breve*, de galactooligosacáridos y de fructooligosacáridos (inulina). Se argumenta el hecho de que, esta mezcla, la cual se

describe como un simbiótico, regula la población de bifidobacterias, en el colon de los niños pequeños lactantes o bebés, los cuales consumen la fórmula suplementada, convirtiéndola en una población “parecida a la de un niño pequeño lactante o bebé”; es decir, mas baja en las especies de *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium*, y más alta en las especies de *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*. La mezcla, se especifica así mismo, también, como siendo de utilidad para la prevención o el tratamiento de una condición inmune.

El comunicado científico “Effect of a new infant formula enriched with prebiotics, probiotics, nucleotides and LC-PUFA on recovery after infection” – Efecto de una nueva fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, enriquecida con prebióticos, probióticos, nucleótidos y CL-PUFA, en la recuperación después de una infección -, (Rivero M. et al, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, - Avances en la Medicina y la Biología experimentales -, Spring ST., NY, vol. 569, 1 de Enero del 2005, páginas 186 - 187), describe un estudio para evaluar el efecto de una nueva fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, , después de varios tipos de infecciones (infecciones respiratorias, infecciones digestivas...). Los niños pequeños lactantes o bebés, pertenecientes al estudio, se alimentaron con una fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, y de seguimiento, enriquecida con prebióticos, (galactooligosacáridos), nucleótidos y LC-PUFA (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga -, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Long-chain polyunsaturated fatty acids), con un reducido nivel de lactosa. Las formulas de seguimiento utilizadas en la alimentación de los niños pequeños lactantes o bebés, en el grupo de estudio, contenían así mismo, también, probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium infantis*). De cualquier modo, el documento en cuestión, no se refiere a ninguna subpoblación específica para niños pequeños lactantes o bebés, ni tampoco a las condiciones asociadas a ser tratadas, éste tampoco se refiere a ningunas cantidades ni a la naturaleza de los prebióticos, más allá de los galactooligosacáridos, en general, ni tampoco se refiere al efecto que la alimentación investigada, pueda tener en el desarrollo de una microbiota bifidogénica temprana.

El documento científico "Probiotics and prebiotic galactooligosacáridos in the prevention of allergic diseases: A randomized, double blinded, placebo controlled trial"-, “Probióticos y galactooligosacáridos prebióticos, en la prevención de enfermedades alérgicas: Un ensayo aleatorio, doble ciego, controlado por placebo -, (Kukkonen et al., *Journal of Allergy and clinical Immunology*, - Diario de la Alergia y de la inmunología clínica -, Elsevier Amsterdam NL, vol. 119, no. 1, 1 de Enero del 2007, páginas 192 - 198), describe un estudio el cual se refiere al efecto de una mezcla de 4 cepas de bacterias probióticas, conjuntamente con galacto-oligosacáridos prebióticos, en la prevención de enfermedades alérgicas. Los ingredientes administrados a los niños pequeños lactantes o bebés recién nacidos, eran los consistentes en *Lactobacillus rhamnosus*, en asociación con otros probióticos y un jarabe de azúcar, con un contenido de 0,9 g de galactooligosacárido. De cualquier modo, el documento en cuestión, no se refiere a niños pequeños lactantes o bebés nacidos mediante una operación de cesárea, como una subpoblación específica para niños pequeños lactantes o bebés, con condiciones asociadas a ser tratadas, éste tampoco se refiere a ningunas cantidades ni a la naturaleza de los prebióticos, más allá de los galacto-oligosacáridos, en general. La microbiota o microflora intestinal, juega un rol interpretativo importante en la hidrólisis de los oligosacáridos y polisacáridos no digeribles, convirtiéndolos en monosacáridos absorbibles, y en la activación de la lipoproteína lipasa, mediante la acción directa en el epitelio veloso. De una forma adicional, se ha demostrado, recientemente, el hecho de que, la leche humana, contiene no únicamente oligosacáridos, sino también, Bifidobacterias. Al mismo tiempo, los estudios genómicos, han mostrado, de una forma convincente, el hecho de que, las bifidobacterias presentes en el intestino, de los niños amamantados a pecho, mediante leche materna, tales como el *Bifidobacterium longum*, se encuentran especialmente equipados para utilizar oligosacáridos de la leche materna, como nutrientes. El *Bifidobacterium longum*, se encuentra también adaptado a las condiciones existentes en el intestino grueso, en donde tiene lugar la recolección de energía, de los hidratos de carbono lentamente absorbibles (de absorción lenta).

En resumen, cada vez va saliendo a la luz más y más evidencias, las cuales sugieren el hecho de que, el establecimiento de una apropiada microbiota o microflora intestinal, la cual sea temprana en la vida, puede ser de significativa importancia, en desarrollo subsiguiente de la salud. Al mismo tiempo, la proporción de partos por cesárea, continúa incrementándose, y alcanza un porcentaje tal alto como el correspondiente a un 70 % de todos los nacimientos, en algunos países. Está por lo tanto claro, el hecho de que existe una necesidad encanto al hecho de proporcionar medios par fomentar un rápido establecimiento de una microbiota o microflora intestinal la cual sea apropiada, en los niños pequeños lactantes o bebés, en donde ello no acontece de una forma natural. Esta necesidad, es particularmente importante, dado la práctica usual de administrar, de una forma rutinaria, dosis profilácticas de antibióticos a las mujeres embarazadas, las cuales experimentan un parto el cual se ha elegido por cesárea.

Resumen de la invención

Tal y como se ha anotado anteriormente, arriba, el niño pequeño lactante o bebé, sano, el cual haya nacido por vía vaginal, y el cual se esté alimentando mediante leche materna, (mediante amamantamiento), las Bifidobacterias, forman la base de la microbiota o microflora intestinal, significando un porcentaje del 60 – 90 % de total de bacterias, en intestino del niño pequeño lactante o bebé en cuestión. Las especies de Bifidobacterias las cuales se encuentran de una forma predominante, en dichos niños pequeños lactantes o bebés, son las consistentes en las

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium infantis*, y *Bifidobacterium longum*.

Los presentes inventores, han encontrado ahora, de una forma sorprendente, el hecho de que, la coadministración de una subespecie específica, a saber, una cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje de un 5 % – 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 % – 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y un porcentaje del 5 % - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, fomenta, de una forma sinérgica, el desarrollo de una microbiota o microflora intestinal bifidogénica temprana, en niños pequeños lactantes o bebés que hayan nacido vía una operación de cesárea.

De una forma correspondientemente en concordancia, la presente invención, proporciona el uso de una cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje del 5 % - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 % - 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y un porcentaje del 5 - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, en la fabricación de un medicamento o de una composición nutritiva, para reducir el riesgo de una subsiguiente desarrollote de la alergia, en niños pequeños lactantes o bebés que hayan nacido vía una operación de cesárea.

En un aspecto adicional, la presente invención, proporciona el uso de una cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y de una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje del 5 % - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 % - 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y un porcentaje del 5 % - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, en la fabricación de un medicamento o de una composición nutritiva, para prevenir o para tratar la diarrea, en niños pequeños lactantes o bebés que hayan nacido vía una operación de cesárea.

La presente invención, se extiende a un procedimiento para reducir el riesgo de que, un niño pequeño lactante o bebé, el cual haya nacido vía una operación de cesárea, desarrolle una alergia, el cual comprende la administración de una cantidad terapéutica de una cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje del 5 % - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 % - 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y un porcentaje del 5 % - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, a un niño pequeño lactante o bebé, el cual haya nacido vía una operación de cesárea, y que se encuentra en necesidad del mismo.

La presente invención, se extiende así mismo, también, a un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la diarrea, en un niño nacido mediante una operación de cesárea, procedimiento éste el cual comprende el proceder a proporcionar una cantidad terapéutica de *Lactobacillus rhamnosus* y de una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje del 5 % - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 % - 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y un porcentaje del 5 % - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, a un niño pequeño lactante o bebé, el cual haya nacido vía una operación de cesárea, y que se encuentra en necesidad del mismo.

Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, los presentes inventores, creen que, la administración de una cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y de una mezcla de oligosacáridos, la cual comprenda un porcentaje del 5 % - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 % -90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo consistente en Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1,

6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y un porcentaje del 5 % - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, a un niño pequeño lactante o bebé, el cual haya nacido vía una operación de cesárea, de algún modo, y de una forma todavía no completamente comprendida, prepara el tracto gastrointestinal del niño pequeño lactante o bebé, para favorecer la subsiguiente colonización mediante dichas especies de Bifidobacterias, las cuales se encuentran de una forma común, en los tractos de los niños sanos, los cuales han nacido por vía vaginal. Se cree que, esta beneficiosa colonización, reduce el riesgo de episodios de diarrea, tales como los que han mostrado afligir a los niños pequeños lactantes o bebés, los cuales hayan nacido vía una operación de cesárea. De una forma adicional, se cree así mismo, también, que esta colonización adicional, reduce el riesgo de un subsiguiente desarrollo de la alergia, tal y como ésta se manifiesta, por ejemplo, mediante el jadeo o respiración silbante y / o sensibilización a los alérgenos alimenticios.

Debería notarse debida nota, en cuanto a hecho de que, ni es un objeto, ni tampoco el sentido, de tal tipo de tratamiento, el fomentar la colonización de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en sí mismo, sino, más bien, el fomentar la colonización con otras especies, de tal forma que de consiga una microbiota o microflora intestinal, la cual sea comparable con la de los niños pequeños lactantes o bebé, sanos, los cuales hayan nacido por vía vaginal.

Descripción resumida de los dibujos

La figura 1, muestra el recuento de *Staphylococcus aureus* y de *Clostridium perfringens*, en muestras de las heces, en el día 14 del tratamiento en ratones gnotobióticos alimentados mediante sonda con una microbiota humana de bebés, y

La figura 2, muestra el recuento de *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum*, en muestras de las heces, en el día 14 del tratamiento en ratones gnotobióticos alimentados mediante sonda con una microbiota humana de bebés.

Descripción detallada de la invención

En esta especificación, los términos los cuales se facilitan a continuación, tienen los siguientes significados:

"Microbiota bifidogénica intestinal temprana" (o microflora bibidogéncia intestinal temprana), significa, para un niño pequeño lactante de una edad de hasta 12 meses, una microbiota o microflora intestinal, la cual se encuentra dominada por Bifidobacterias, tales como las consistentes en las *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, y *Bifidobacterium longum*, hasta la exclusión de poblaciones apreciables de tales tipos de especies, tales como las consistentes en las Clostridias y en los Streptococci (Estreptococos) y la cual es comparable, de una forma general, con la que se encuentra en los niños pequeños lactantes, nacidos por vía vaginal, y que se alimentan mediante de leche del pecho materno (amamantamiento), de la misma edad.

"Niño pequeño lactante o bebé", significa un niño pequeño, de una edad inferior a los 12 meses.

"Prebiótico", significa un ingrediente alimenticio, no digerible, el cual afecta, de una forma beneficiosa, al huésped, mediante la estimulación selectiva del crecimiento y / o la actividad de una bacteria, o de un limitado número de bacterias, en el colon y el cual, mejora así, de este modo, la salud del huésped (véase, a dicho efecto, el trabajo de Gibson y Roberfroid "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics" -, Modulación dietética de la microbiota colónica humana: Introducción del concepto de Prebióticos -, J. Nutr 125: 1401 - 1412).

"Probiótico", significa preparaciones o componentes celulares microbianas, con un efecto beneficioso en la salud o en el bienestar del huésped (véase, a dicho efecto, el trabajo de Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined", - Probióticos: Cómo deben éstos definirse -, Trends Food Sci. Technol. 1999 :10 107 - 10).

Todas las referencias a los porcentajes, se refieren a porcentajes en peso, a menos que especifique expresamente de otro modo.

Las cepas apropiadas de probióticos de *Lactobacillus rhamnosus*, incluyen a la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, disponible, entre otras proveedores, de la firma Valio Oy de Finlandia, bajo la marca comercial de LGG, y la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724. Una dosis diaria apropiada, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde las 10e5 hasta las 10e11 unidades de formación de colonias (ufc, ó también, cfu, de sus unidades en idioma inglés, correspondientes a colony forming units), siendo dicha dosis diaria, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde las 10e7 hasta las 10e10 ufc.

El probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, se coadministra conjuntamente con una mezcla de oligosacáridos, los cuales

- comprenden un porcentaje del 5 % - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1,4 Glc, un porcentaje del 20 % - 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, y un porcentaje del 5 % - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc. Tal tipo de mezcla, se describe, de una forma más detallada, en la publicación de patente internacional WO 2007 / 09 0894, cuyos contenidos, se incorporan aquí, en este documento de solicitud de patente, a título de referencia, y a los cuales se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento de solicitud de patente, como "la mezcla de oligosacáridos la cual se ha descrito anteriormente, arriba". El término coadministración, incluye a ambos, a la administración simultánea del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y la mezcla de oligosacáridos y a la administración secuencial del *Lactobacillus rhamnosus* y la mezcla de oligosacáridos.
- De una forma preferible, la mezcla de oligosacáridos descrita anteriormente, arriba, comprende un porcentaje del 10 % - 70 %, en peso, del (de los) oligosacárido(s) N-acetilado(s), un porcentaje del 20 % - 80 % del (de los) oligosacárido(s) neutro(s), y un porcentaje del 10 % - 50 %, en peso, del (de los) oligosacárido(s) sialilado(s). De una forma más preferible, la mezcla de oligosacáridos descrita anteriormente, arriba, comprende un porcentaje del 15 % - 40 %, en peso, del (de los) oligosacárido(s) N-acetilado(s), un porcentaje del 40 % - 60 % del (de los) oligosacárido(s) neutro(s), y un porcentaje del 15 % - 30 %, en peso, del (de los) oligosacárido(s) sialilado(s). Una mezcla particularmente preferible, es la que comprende un porcentaje del 30 %, en peso, del (de los) oligosacárido(s) N-acetilado(s), un porcentaje del 50 % del (de los) oligosacárido(s) neutro(s), y un porcentaje del 20 %, del (de los) oligosacárido(s) sialilado(s).
- De una forma alternativa, la mezcla de oligosacáridos descrita anteriormente, arriba, comprende, de una forma conveniente, un porcentaje del 5 % - 20 %, en peso, del (de los) oligosacárido(s) N-acetilado(s), un porcentaje del 60 % - 90 % del (de los) oligosacárido(s) neutro(s), y un porcentaje del 5 % - 30 %, del (de los) oligosacárido(s) sialilado(s).
- La mezcla de oligosacáridos descrita anteriormente, arriba, puede prepararse a partir de una o de más leches animales. La leche, puede obtenerse a partir de cualquier tipo de mamífero, de una forma particular, de vacas, de cabras, de búfalos, de caballos, de elefantes, de camellos o de ovejas.
- De una forma alternativa, la mezcla de oligosacáridos descrita anteriormente, arriba, puede prepararse procediendo a comprar y mezclar los componentes individuales. Así, por ejemplo, los galactooligosacáridos sintetizados, tales como los consistentes en los Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y las mezclas de éstos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, bajo las marcas comerciales de Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos, son la firmas Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
- De una forma alternativa, pueden utilizarse glicosiltransferasas específicas, tales como las consistentes en las galactosiltransferasas, para producir oligosacáridos neutros.
- Los oligosacáridos N-acetilados, pueden prepararse mediante la acción de la glucosaminidasa y / o la galactosaminidasa, en la N-acetil-glucosa y / o la N-acetil-galactosa. Igualmente, las N-acetil-galactosiltransferasas y / o las N-acetil-glicosiltransferasas, pueden utilizarse para este propósito. Los oligosacáridos N-acetilados, pueden también producirse mediante tecnología de fermentación, utilizando las respectivas enzimas (bien ya sea recombinantes o bien ya sea neutras), y / o fermentación microbiana. En el último caso, los microbios, o bien pueden expresar sus enzimas y sustancias naturales, o bien éstos pueden concebirse para producir los respectivos substratos y enzimas. Pueden utilizarse cultivos microbianos individuales, o bien, cultivos mezclados. La formación de los oligosacáridos N-acetilados, puede iniciarse mediante substratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (DP – de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a degree of polymeritation), desde DP = 1, en adelante. Otra opción, es la consistente en la conversión química de las cetohechosas (tal como, por ejemplo, la fructosa), bien ya sea libre, o bien ya sea unida a un oligosacárido, según se describe por parte Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38: 827 - 828.
- Los oligosacáridos sialilados consistentes en la 3'sialil-lactosa y la 6'sialil-lactosa, pueden aislarse mediante tecnología cromatográfica o de filtración, a partir de una fuente natural, tal como la consistente en las leches de animales. De una forma alternativa, éstos pueden también producirse, así mismo, mediante biotecnología, utilizando sialiltransferasas, bien ya sea mediante una enzima basada en tecnología de fermentación, (enzimas recombinantes o naturales), o bien ya sea mediante tecnología de fermentación microbiana. En el último caso, los microbios, o bien pueden expresar sus enzimas y substratos naturales, o bien éstos pueden concebirse para producir los respectivos substratos y enzimas. Pueden utilizarse cultivos microbianos individuales, o cultivos celulares mezclados. La formación de sialil-oligosacáridos, puede iniciarse mediante substratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (DP), desde DP = 1, en adelante.
- Pueden administrarse otras bacterias probióticas, con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus*. Puede utilizarse, a

dicho efecto, cualesquiera bacterias del ácido láctico o Bifidobacterias, con una características probióticas establecidas. Las bacterias probióticas del ácido láctico, las cuales son apropiadas, incluyen a la *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 comercialmente obtenible en el Mercado, de procedencia de la firma Biogaia, o a la *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.

5 Las cepas probióticas de bifidobacterias apropiadas, incluyen a la cepa de *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446, comercializada, entre otros, por la firma Christian Hansen company de Dinamarca, bajo la marca comercial de Bib12, a la cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, comercializada por la firma Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón, bajo la marca comercial de BB536, a la cepa de *Bifidobacterium breve*, comercializada por la firma Danisco, bajo la marca comercial de Bb-03, a la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por la firma Morinaga, bajo la marca comercial de M-16V, y a la cepa de *Bifidobacterium breve*, comercializad por el instituto Institut Rosell (Lallemand), bajo la marca comercial de R0070. Puede también utilizarse una mezcla de bacterias del ácido láctico y de bifidobacterias.

15 El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y la mezcla de oligosacáridos y la mezcla de oligosacáridos, la cual se ha descrito anteriormente, arriba, se administran, de una forma preferible, a un niño pequeño lactante o bebé, inmediatamente después del parto, y después de ello, por lo menos en los primeros dos meses de vida del niño pequeño lactante o bebé, y hasta que éste alcance los seis meses de edad. El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y la mezcla de oligosacáridos la cual se ha descrito anteriormente arriba, la cual se ha descrito anteriormente arriba, pueden administrarse, de una forma conveniente, en una fórmula para niños pequeños lactantes o bebés.

25 Una fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, para su uso en concordancia con la presente invención, puede contener un fuente de proteínas, en una cantidad correspondiente a una tasa la cual no sea superior a los 2,0 g / 100 kcal, siendo dicho contenido de proteínas, de una forma preferible, el consistente en una cantidad correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes, los cuales van desde lo 1,8 g / 100 kcal hasta los 2,0 g / 100 kcal. No se cree que el tipo de proteína, sea crítico para los efectos de la presente invención, con la condición de que se encuentre asegurado el cumplimiento de los requerimientos mínimos en cuanto a lo referente al contenido de aminoácidos esenciales, y que se asegure un crecimiento satisfactorio, si bien se prefiere el hecho de que, una cantidad correspondiente a un porcentaje que sea superior a un 50 %, en peso, de la fuente de proteína, sea el consistente en suero lácteo. Así, de este modo, pueden utilizarse las fuentes de proteína basadas en el suero lácteo, la caseína, o mezclas de éstas, así como también pueden utilizarse las fuentes de proteína basadas en la soja. Siempre y cuando se trate de proteínas de suero lácteo, la fuente de proteínas, puede basarse en el suero lácteo ácido, o en el suero lácteo dulce, o en mezclas de éstos, y ésta puede incluir a la alfa-lactoalbúmina y a la beta-lactoglobulina, en cualesquiera proporciones las cuales se deseen.

35 Las proteínas, pueden ser las consistentes en proteínas intactas o bien en proteínas hidrolizadas. Podría ser deseable el hecho de proporcionar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis, el correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 2 % y un 20 %), tal como, por ejemplo, para niños pequeños lactantes o bebés, los cuales se crea que se encuentren en riesgo de desarrollar una alergia a la leche de vaca. En el caso en el que se requiera el uso de las proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis, puede llevarse a cabo de la forma que se desee, tal y como se conoce en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, un hidrolizado de proteína de suero lácteo, puede prepararse de procediendo a hidrolizar de una forma enzimática la fracción de suero lácteo, en una o en más etapas. En el caso en el que, la fracción de suero lácteo la cual se utilice como material de partida, se encuentre substancialmente exento de lactosa, se encuentra entonces el hecho de que, la proteína en cuestión, sufre un bloqueo de la lisina mucho menor, durante el proceso de hidrólisis. Este hecho capacita el que la extensión del bloqueo de lisina, se reduzca desde un porcentaje de aprox. un 15 %, en peso, de la lisina total, a un porcentaje de menos de aprox. un 10 %, en peso, de lisina; tal como, por ejemplo, a un porcentaje de aprox. un 7 %, en peso, de lisina, los cual mejora en una gran forma, la calidad nutricional de la fuente de proteínas.

50 La fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, puede contener una fuente de hidratos de carbono. A dicho efecto, puede utilizarse cualquier fuente de hidratos de carbono, la cual se encuentra, de una forma convencional, en las fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés, tales como las consistentes en la lactosa, en la sacarosa, en la maltodextrina, en el almidón, y las mezclas de entre éstos, si bien, no obstante, la fuente de hidratos de carbono preferida, es la lactosa. De una forma preferible, las fuentes de hidratos de carbono, contribuyen en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 35 %, y 65 %, de la energía total de la fórmula.

60 La fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, contienen una fuente de lípidos. La fuente de lípidos, puede ser la consistente en cualquier tipo de lípido o de grasa, los cuales san apropiadas para su uso en la fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés. Las fuentes preferidas de grasas, incluyen a la oleína de palma, al aceite de girasol altamente oleico (es decir, con un alto contenido de ácido oleico), o al aceite de cártamo altamente oleico (es decir con un alto contenido de ácido oleico). Los ácidos grasos esenciales consistentes en el ácido linoleico y en el ácido α -linolénico, pueden también añadirse, así como también puede añadirse reducidas cantidades de aceites, las cuales contengan una altas cantidades de ácido araquidónico preformado y de de ácido docosahexaenoico, tales como los consistentes en los aceites de pescado o en los aceites microbianos. En total, el contenido de grasas, será, de una forma preferible, el correspondiente a una cantidad, la cual contribuya en un porcentaje comprendido dentro

de unos márgenes que van desde un 30 % hasta un 55 %, de la energía total de la fórmula. La fuente de grasa tiene, de una forma preferible, un factor de relación o cociente (ratio) de ácidos grasos n-6, con respecto a ácidos grasos n-3, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde aprox. 5 : 1 hasta aprox. 15 : 1, tal como, por ejemplo, un factor de relación o cociente, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde aprox. 8 : 1 hasta aprox. 10 : 1.

La fórmula para niños pequeños lactantes, puede también contener, así mismo, todas las vitaminas y minerales los cuales se cree que son esenciales en la dieta diaria, y en unas cantidades nutricionalmente significativas. Se han establecido unos requerimientos mínimos, para ciertas vitaminas y minerales. Así, de este modo, los ejemplos de minerales, de vitaminas y de otros nutrientes los cuales pueden encontrarse opcionalmente presentes en la fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, incluyen a la vitamina A, a la vitamina B1, a la vitamina B2, a la vitamina B6, a la vitamina B12, a la vitamina E, a la vitamina K, a la vitamina C, a la vitamina D, al ácido fólico, al inositol, a la niacina, a la biotina, al ácido pantoténico, a la colina, al calcio, al fósforo, al yodo, al hierro, al magnesio, al cobre, al zinc, al magnesio, al cloro, al potasio, al sodio, al selenio, al cromo, al molibdeno, a la taurina, y a la L-carnitina. De una forma usual, los minerales, se añaden en forma de sal. La presencia y las cantidades de los minerales específicos y de otras vitaminas variarán, en dependencia de la población de los niños pequeños lactantes o bebés a la cual se encuentre destinado.

En el caso en el que sea necesario, la fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, puede contener emulsionantes y estabilizantes, tales como los consistentes en la lecitina, en los ésteres del ácido cítrico, en los mono- y di-glicéridos, y por el estilo.

De una forma preferible, la fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, contendrá la mezcla de oligosacáridos la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 0,2 g por litro hasta los 5 g por litro de la fórmula reconstituida, siendo dicha cantidad, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 g por litro hasta los 5 g por litro de la fórmula reconstituida.

La fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, puede contener, de una forma opcional, otras sustancias las cuales pueden tener un efecto beneficioso, tal como las consistentes en la lactoferrina, en los nucleótidos, en los nucleósidos, y por el estilo.

Ambas, la fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, y la fórmula nutritiva, las cuales se han descrito anteriormente, arriba, puede prepararse de cualquier forma la cual sea apropiada. Así, por ejemplo, éstas pueden prepararse procediendo a mezclar, conjuntamente, la proteína, la fuente de hidratos de carbono, y la fuente de grasa, en unas proporciones las cuales sean apropiadas. En el caso en el que éstos se utilicen, los emulsionantes, pueden incluirse en este punto. Las vitaminas y los minerales, pueden añadirse en este punto, pero éstos, de una forma usual, se añaden posteriormente, con objeto de evitar la degradación térmica. Cualesquiera vitaminas lipofílicas, emulsionantes, y por el estilo, pueden disolverse en la fuente de grasa, previamente a proceder al mezclado. Puede entonces añadirse y mezclarse agua, de una forma preferible, agua la cual se haya sometido a osmosis inversa, con objeto de formar una mezcla líquida. La temperatura del agua, de una forma conveniente, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aprox. 50 °C hasta los aprox. 80 °C, con objeto de ayudar en la dispersión de los ingredientes. Pueden utilizarse cualesquiera licuefactantes comercialmente disponibles en el mercado, con objeto de formar la mezcla líquida. Se procede, a continuación, a homogeneizar la mezcla líquida; tal como, por ejemplo, en dos etapas.

La mezcla líquida, puede tratarse térmicamente, a continuación, con objeto de reducir las cargas bacterianas, mediante un rápido calentamiento de la mezcla líquida, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 80 °C, hasta los 150 °C, durante un transcurso de tiempo de aprox. 5 minutos, por ejemplo. Esta acción, puede llevarse a cabo mediante inyección de vapor, en autoclave, o mediante un intercambiador de calor; tal como, por ejemplo, un intercambiador de calor, de placas.

A continuación, se procede a enfriar la mezcla, a una temperatura correspondiente un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aprox. 60 °C hasta los aprox. 85 °C; tal como, por ejemplo, mediante enfriamiento "flash" (de evaporación instantánea. La mezcla líquida, pueden entonces volverse a homogeneizar otra vez; tal como, por ejemplo, en dos etapas de aprox. a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 10 MPa hasta los aprox. 30 MPa, en la primera etapa, y a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 2 MPa hasta los aprox. 10 MPa, en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada, puede entonces enfriarse de una forma adicional, con objeto de añadir cualesquiera componentes sensibles al calor; tales como los consistentes en las vitaminas y en los minerales. El valor pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizado, se ajustan, de una conveniente, en este punto.

La mezcla homogeneizada, se transfiere a un aparato de secado el cual sea apropiado, tal como el consistente en un secador por proyección pulverizada (spray), o bien, el consistente en un secador por congelación, y convertirlo en una materia en polvo. La materia en polvo, debería tener un contenido de humedad, correspondiente a un porcentaje inferior a aprox. un 5 %, en peso.

5 El probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, puede cultivarse en concordancia con cualquier procedimiento el cual sea apropiado, y prepararse para la adición de la fórmula nutritiva o para niños pequeños lactantes o bebés, mediante, por ejemplo, secado por congelación (liofilización), o mediante secado por proyección pulverizada (spray). De una forma alternativa, la cepa del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, puede adquirirse en el mercado, de procedencia de la firma Valio Oy de Finlandia, bajo la marca comercial de LGG, la cual se encuentra ya preparada, en una forma apropiada, para la adición de productos alimenticios, tales como los consistentes en las fórmulas nutricionales y en las fórmulas para niños pequeños lactantes o bebés. El probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, puede añadirse, a la fórmula, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales se encuentran situados entre los 10e3 y los 10e12 ufc / g de materia en polvo, y de una forma más preferible, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales se encuentran situados entre los 10e7 y los 10e12 ufc / g de materia en polvo.

15 La invención, se ilustrará ahora, de una forma adicional, mediante la referencia a los ejemplos los cuales se facilitan abajo, a continuación:

Ejemplo 1

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoléico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (μ g)	8	50
Se (μ g)	2	13
Vitamina A (μ g RE)	105	700
Vitamina D (μ g)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (μ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,047
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (μ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (μ g)	0,3	2
Biotina (μ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (μ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,075	5
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	2,10 ⁷ ufc / g de materia en polvo, bacterias vivas	

20

Ejemplo 2

25 En este ejemplo, se procede a comparar el efecto de la cepa del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, con un ingrediente oligosacárido, el cual incluye oligosacáridos N-acetilados, oligosacáridos neutros, y oligosacáridos sialilados (al cual se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento de solicitud de patente, como CMOS – GOS), en el establecimiento de un microbiota o microflora intestinal bifidogénica temprana, en un modelo de ratón gnotobiótico, de un parto por cesárea, con el efecto de la mezcla de probiótico y oligosacáridos, y con el control. Este modelo, es un modelo animal apropiado, para niños pequeños lactantes o bebés los cuales hayan nacido mediante un parto por cesárea, y que tienen una microbiota o microflora intestinal

subóptima, en términos de población de Bifidobacterias. De una forma adicional a la observación del tamaño de la población de Bifidobacterias, este modelo, es también apropiado, así mismo, para seguir el efecto beneficioso de las Bifidobacterias, como una barrera contra las bacterias potencialmente patogénicas, tales como las consistentes en la *Clostridium perfringens*.

5

Materiales y procedimientos

Se procedió a comprar ratones hembras y ratones machos, libres de gérmenes, CH3 (Germfree CH3), de procedencia de los laboratorios Charles River Laboratories France, y éstos se enviaron a centro de de investigaciones de Nestlé "Nestlé Research Centre", en aisladores de transporte. Los animales en cuestión, se transportaron a los aisladores de reproducción, después del control del estatus libre de gérmenes. Las crías hembras descendientes de esta población de reproducción, son las que se utilizaron para llevar a cabo este estudio. Los animales, se asignaron, de una forma aleatoria, a uno de entre 4 grupos de estudio: A, dieta de control y bebida de control; B, dieta de control, con una mezcla del 3 % de oligosacáridos, y bebida de control; C, dieta de control y bebida de probiótico *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724; D, dieta de control, con un 3 % de la mezcla de oligosacáridos, y bebida de probiótico *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724.

10

15

Los animales, se mantuvieron en dos diferentes aisladores, en jaulas de 5 animales cada una. Los grupos A y B, se mantuvieron en un aislador, y los grupos C y D, se mantuvieron en otro aislador, con objeto de evitar una contaminación cruzada con *L. rhamnosus*, más tarde, en el estudio. El estatus libres de gérmenes, se controló semanalmente, en heces recientemente recolectadas, a razón de un animal por jaula. Durante este período de tiempo, los animales, se alimentaron con la dieta basal AIN-93 b. A la edad de 7 a 8 años, se procedió a recontrolar 2 animales por jaula, en cuenta a lo referente a su estatus libre de gérmenes, y cada animal, recibió, después de ello, y mediante una sonda nasogástrica, una dosis individual de de 200 µl de un cóctel de microbiota o microflora humana de bebés (HBF – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a human baby flora] -), de la forma la cual se encuentra descrita en la Tabla 1. En el mismo día, se procedió a cambiar la dieta, a la mezcla de AIN (para los grupo A y C), ó AIN-CMOS-GOS (para los grupos B y D), y el agua potable, se cambió a agua potable salina, la cual contenía un porcentaje del 0,5 % (volumen / volumen) de MRS (para los grupos A y B), o bien, agua potable salina, la cual contenía un porcentaje del 0,5 % (volumen / volumen) de MRS, y una concentración final de 2×10^7 ufc / ml de *L. rhamnosus*. A este día, se le considera como siendo el día 1. Al siguiente día (al cual se le considera, aquí, como siendo el día 0), se procedió a recolectar las heces de cada animal, recién hechas, y éstas se sometieron, inmediatamente después, a un análisis de la microbiota o microflora intestinal, mediante recuento en placas.

20

25

30

Se procedió a preparar una muestra de leche de vaca, enriquecida con oligosacáridos (CMOS), a partir de un permeato de suero lácteo desproteinado y desmineralizado, industrial (de procedencia de la firma Lactosérum France, Francia). En resumen, se procedió a desmineralizar un permeato de suero lácteo de la leche vaca, obtenido mediante ultrafiltración, en una línea industrial de desmineralización, equipada con módulos de electrodiálisis, e intercambiadores aniónicos y catiónicos (de procedencia de la firma Lactosérum France, Francia). El permeato de suero lácteo desmineralizado, se sometió, a continuación, a 2 ciclos secuenciales, industriales, de cristalización de la lactosa, y a continuación, éstos se secaron por proyección pulverizada (spray)(Lactosérum France, Francia). El licor madre modificado resultante, en forma de una materia en polvo, se disolvió en agua, a un porcentaje del 30 % (peso / volumen), y éste se clarificó haciendo pasar a través de un lecho de carbón activo, seguido de una filtración en un filtro de 0,22 µm) (de procedencia de la firma Millipore). El filtrado resultante, se cargó en una columna preparativa de Bio-Gel P2 (de procedencia de la firma BioRad) (50 x 850 mm), ejecutada con bicarbonato amónico 20 mM (NH_4HCO_3), a un caudal de flujo de 2 ml / minuto. Las fracciones las cuales contenían los oligosacáridos, y procediendo a la elución previa para la lactosa, se recogieron, se agruparon y se liofilizaron.

35

40

45

Los oligosacáridos liofilizados, se mezclaron, con galactosil-oligosacáridos comerciales (Vivinal GOS, de la firma DOMO Friesland Foods), para obtener un mezcla final, la cual contenía un porcentaje de aprox. un 9 %, en peso, de oligosacáridos N-acetilados, un porcentaje de aprox. un 85 %, en peso, de oligosacáridos neutros, y un aprox. un 6 %, en peso, de oligosacáridos sialilados. Ese ingrediente de CMOS-GOS, se incorpora en una dieta semisintética para roedores de AIN-93, para proporcionar un contenido final de oligosacáridos del 3 %, en peso. La dieta de AIN-93 de control, se suplementó con lactosa y glucosa, para controlar la glucosa y lactosa final, las cuales se incorporan en la dieta de CMOS-GOS, mediante las materias utilizadas.

50

55

Se procedió a preparar la cepa de *L. rhamnosus*, de procedencia de la colección Nestle Culture Collection. En resumen, se procedió a reactivar y a cultivar la cepa NCC4007, en medio MRS (Man Rogosa Sharpe), a un valor de aprox. $4 - 5 \times 10^8$ ufc / ml. A continuación de ello, la cepa de *L. rhamnosus*, se concentró mediante proceso de centrifugación, en su medio MRS utilizado, y se diluyó a un valor de 4×10^9 ufc / ml, con medio MRS fresco. Se procedió, a continuación, a dividir la cepa de *L. rhamnosus*, en alícuotos de ml, los cuales se congelaron, a una temperatura de - 80 °C, hasta su uso. En cada día 1, se procedió a introducir 1 ml de alícuoto de *L. rhamnosus* recientemente descongelado, en MRS, o bien, se procedió a introducir 1 ml de MRS (para los grupos sin *L. rhamnosus*), en los aisladores, y se disolvieron en 200 ml de solución (suero) salina, y se dividió de una forma igual, entre cuatro botellas para bebida (bebederos). Con un consumo medio de 5 ml / día y ratón, cada animal en los grupos con probiótico, recibieron aproximadamente 10^8 ufc de *L. rhamnosus*, por día.

60

65

Se procedió a recolectar las muestras fecales, y éstas se analizaron, en el día 14, mediante recuento en placas. En resumen, para cada ratón, se procedió a homogeneizar un gránulo fecal, en 0,5 ml de solución de Ringer (de la firma Oxoid, Reino Unido), suplementada con un porcentaje del 0,05 % (peso / volumen), de L-Cisteína (HCl), y se procedió a colocar en placas, una dilución diferente de la solución bacteriana, en medio selectivo y semiselectivo, para la enumeración de los microorganismos específicos: Bifidobacterias en medio Eugom Tomato, Lactobacilos en medio MRS, suplementado con antibióticos (fosfomicina, sulfametoxazol y trimetoprima), *C. perfringens* en medio NN-agar, medium, Enterobacteriáceas en medio Drigalski, y Bacteroides en medio Shaedler Neo Vanco. Las placas, se incubaron a una temperatura de 37 °C, bajo condiciones aeróbicas, durante un transcurso de tiempo de 24 horas, para el cuento de Eenterobacteriáceas, y bajo condiciones anaeróbicas, durante un transcurso de tiempo de 48 horas, para las Bifidobacterias, Lactobacilos, Bacteroides y *C. perfringens*.

Tabla 1 – Composición de la microbiota

	Fenotipo de las colonias en las placas	Concentración administrada log (ufc / ml)
<i>Bifidobacterium breve</i> NCC452 (viv4)	Blancas, grandes	< 2
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC572 (viv5)	Grises, pequeñas	< 2
<i>Staphylococcus aureus</i> FSM124 (viv3)	Blancas, grandes	7,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FSM115 (viv2)	Grises, pequeñas	7,0
<i>Escherichia coli</i> FSM325 (viv1)		8,08
<i>Bacteroides distasonis</i> FSM24 (viv20)		5,0
<i>Clostridium perfringens</i> FSMC14 (viv19)		< 5,0

15 Resultados

La figura 1, muestra los recuentos de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, en las heces, dos semanas después del alimentación por sonda nasogástrica, con HBF (microbiota o microflora humana de bebés), para los grupos A, B, C y D. Puede verse el hecho de que, a pasar de que los recuentos de *St. Aureus*, eran reducidos, en ambos grupos, en el grupo B y en el grupo D, los recuentos *C. perfringens*, eran reducidos, en ambos grupos, el grupo C y el grupo D, era únicamente en el grupo D, en donde se encontró a una significativa reducción del recuento de ambos patógenos.

La figura 2, muestra los recuentos de *Bifidobacterium breve* y de *Bifidobacterium longum*, en las heces, dos semanas después del alimentación por sonda nasogástrica, con HBF (microbiota o microflora humana de bebés), para los grupos A, B, C y D. Puede verse el hecho de que, ambas especies (las cuales, de una forma típica, dominan la microbiota o microflora intestinal de un bebé nacido mediante un parto vaginal, y alimentado de leche materna, mediante amamantamiento), constituye una proporción mucho mayor de la microbiota o microflora intestinal, en el grupo D, que en los otros grupos. En resumen, estos resultados, muestran el efecto sinérgico de la mezcla del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y la mezcla de oligosacáridos, en la estimulación de la colonización con Bifidobacterias, y evitando el establecimiento de poblaciones significativas de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso de un cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje del 5 - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20 - 90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, y un porcentaje del 5 - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado, seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, en la fabricación de un medicamento o de una composición nutritiva terapéutica, para reducir el riesgo del un desarrollo subsiguiente de alergia, en niños pequeños lactantes o bebés, los cuales hayan nacido mediante una operación de cesárea.
- 2.- El uso de un cepa probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* y una mezcla de oligosacáridos, la cual comprende un porcentaje del 5 - 70 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo consistente en los GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc y Gal β 1, 6GalNAc α 1, 3Gal β 1, 4Glc, un porcentaje del 20-90 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido neutro, seleccionado de entre el grupo consistente en los Gal β 1, 6Gal, Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 3Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 6Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, Gal β 1, 3Gal β 1, 6Gal β 1, 4Glc, y Gal β 1, 3Gal β 1, 3Gal β 1, 4Glc, y un porcentaje del 5 - 50 %, en peso, de por lo menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo consistente en los NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc y NeuAc α 2, 6Gal β 1, 4Glc, en la fabricación de un medicamento o de una composición nutritiva terapéutica, para prevenir o evitar la diarrea, en niños pequeños lactantes o bebés, los cuales hayan nacido mediante una operación de cesárea.
- 3.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde, el probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, es *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 ó *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724.
- 4.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la mezcla de oligosacáridos, comprende un porcentaje del 10 - 70 %, en peso, de los oligosacáridos N-acetilados, un porcentaje del 20 - 80 %, en peso, de los oligosacáridos neutros, y un porcentaje del 10 - 50 %, en peso, de los oligosacáridos sialilados.
- 5.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la mezcla de oligosacáridos, comprende un porcentaje del 15 - 40 %, en peso, de los oligosacáridos N-acetilados, un porcentaje del 40 - 60 %, en peso, de los oligosacáridos neutros, y un porcentaje del 15 - 30 %, en peso, de los oligosacáridos sialilados.
- 6.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, la mezcla de oligosacáridos, comprende un porcentaje del 5 - 20 %, en peso, de los oligosacáridos N-acetilados, un porcentaje del 60 - 90 %, en peso, de los oligosacáridos neutros, y un porcentaje del 5 - 30 %, en peso, de los oligosacáridos sialilados.
- 7.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, el medicamento o composición nutritiva terapéutica, se administra, al niño pequeño lactante o bebé, inmediatamente después del parto, y después, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 2 meses.
- 8.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, el medicamento o composición nutritiva terapéutica, se administra, al niño pequeño lactante o bebé, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 6 meses, después del parto.
- 9.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la composición nutritiva terapéutica, es una fórmula para niños pequeños lactantes o bebés.
- 10.- El uso de la reivindicación 9, en donde, la fórmula para niños pequeños lactantes o bebés, comprende entre 10e3 y 10e12 ufc del probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, por gramo de composición (peso seco), y de 0,2 a 5 g, por litro, de fórmula reconstituida de la mezcla de oligosacáridos.

Muestra de heces

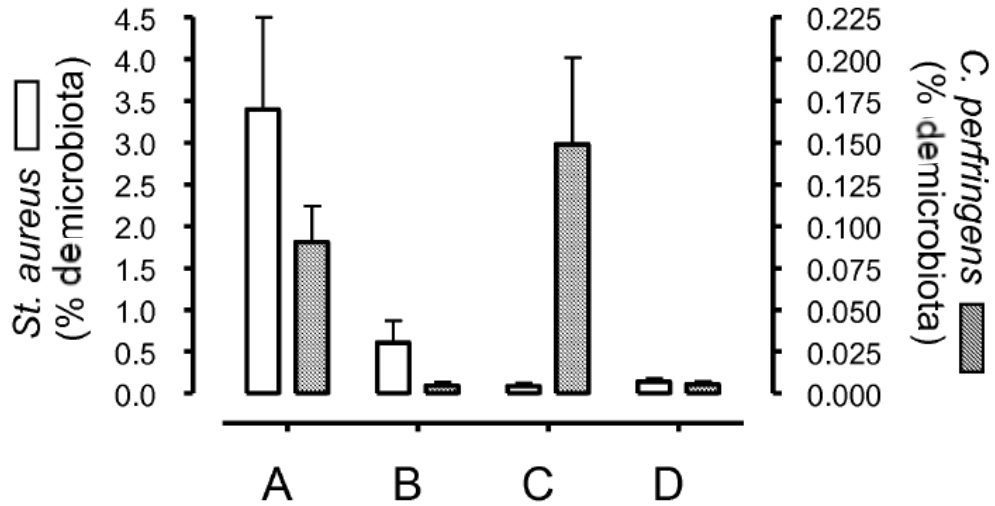


Figura 1. Recuentos de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, expresados como % de los recuentos de la microbiota total, en la heces, después de un transcurso de tiempo 2 semanas de establecimiento de la microbiota humana de bebés, en ratones libres de gérmenes, alimentados con una dieta de control, (A), con un ingrediente de oligosacárido (B), con un probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (C), o con ambos, un ingrediente oligosacárido y un probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (D).

Los datos, representan los valores medios del % de microbiota total con error estándar de la media (N = 9 – 10)

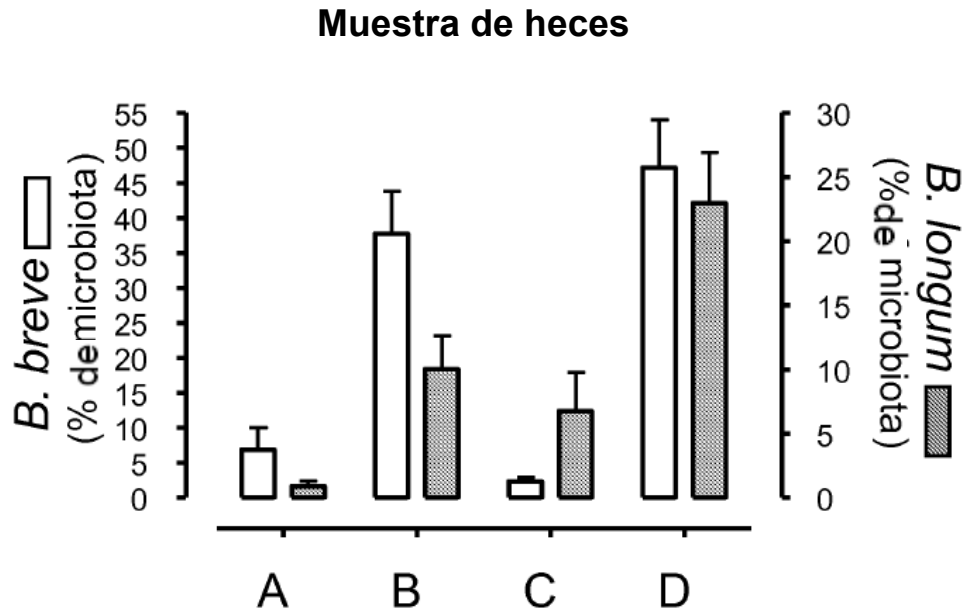


Figura 2. Recuentos de *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*, expresados como % de los recuentos de la microbiota total, en la heces, después de un transcurso de tiempo 2 semanas de establecimiento de la microbiota humana de bebés, en ratones libres de gérmenes, alimentados con una dieta de control, (A), con un ingrediente de oligosacárido (B), con un probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (C), o con ambos, un ingrediente oligosacárido y un probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (D).

Los datos, representan los valores medios del % de microbiota total con error estándar de la media (N = 9 – 10).

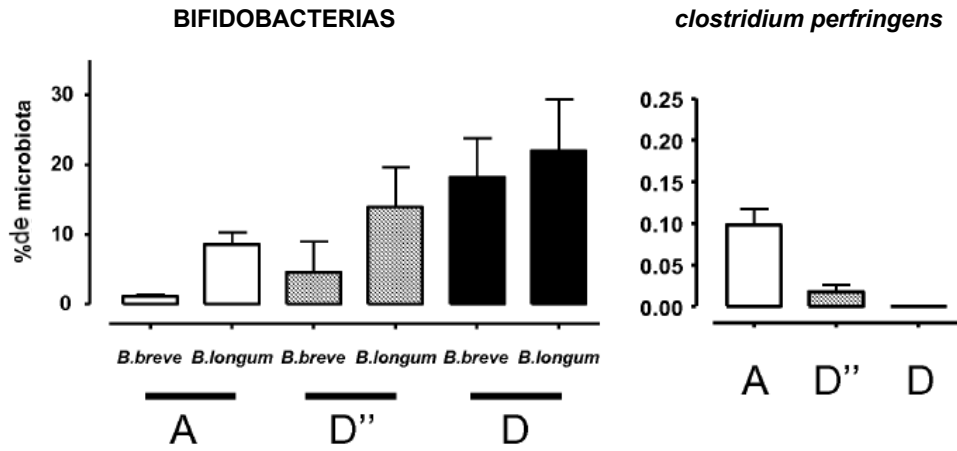


Figura 3. Recuentos de *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*, y *C. perfringens*, expresados como % de los recuentos de la microbiota total, en la heces, después de un transcurso de tiempo 2 semanas de establecimiento de la microbiota humana de bebés, en ratones que hospedan a una microbiota humana de bebés. Los grupos de tratamiento, son ningún pre- o probiótico (A), con un prebiótico conjuntamente con un probiótico *Lactobacillus paracasei* (D''), o con un prebiótico, conjuntamente con un probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (D).

Los datos, representan los valores medios del % de microbiota total con error estándar de la media (N = 9 – 10).