

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 453**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2008 PCT/EP2008/058640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09004076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008 E 08774752 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2173367**

54 Título: **Suplemento de la dieta maternal**

30 Prioridad:

**05.07.2007 EP 07111871**

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

**14.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SALMINEN, SEPPO;  
ISOLAURI, ERIKA y  
LAITINEN, KIRSI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 605 453 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**

Suplemento de la dieta maternal

5 Descripción

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere al empleo de bacterias probióticas en la fabricación de un suplemento nutritivo o un alimento dietético especial para las mujeres embarazadas para reducir el riesgo de desarrollo de una diabetes gestacional.

Antecedentes de la invención

15 El embarazo está asociado con ajustes metabólicos, incluyendo la ganancia de peso y cambios en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Esta sintonía fina reguladora tiene lugar para soportar el crecimiento del feto y en consecuencia, un resultado exitoso del embarazo, pero a largo plazo puede tener efectos sobre la salud de la madre y del niño, como por ejemplo, trastornos en el metabolismo de la glucosa.

20 Un embarazo prematuro se caracteriza por una tolerancia normal a la glucosa y a la insulina. En el embarazo tardío, por el contrario, se observa un aumento en la concentración de la insulina en suero acompañado de un desarrollo a la resistencia a la insulina. Estas adaptaciones metabólicas soportan el crecimiento del feto mediante la derivación de combustibles metabólicos hacia el feto en lugar de la madre. Sin embargo, en algunas mujeres embarazadas, este proceso de adaptación es exagerado y conduce a una tolerancia dañina a la glucosa. Estos individuos tienen un  
 25 riesgo aumentado de desarrollar una diabetes mellitus gestacional y en consecuencia una diabetes mellitus adulta del tipo 2. Un metabolismo dañado de la glucosa en una mujer embarazada puede ser asociado con la macrosomía y el riesgo de una tolerancia dañina a la glucosa en su niño. Estas condiciones pueden desarrollar, incluso cuando la tolerancia materna a la glucosa está dentro de unos márgenes normales de referencia, es decir, no clasificados, una  
 30 diabetes mellitus gestacional. Esta patofisiología -niveles de glucosa mayores que los niveles óptimos- es más común de lo que podría predecirse y constituye una causa conducente a la mortalidad cardiovascular de este grupo.

Existe por lo tanto una necesidad de proporcionar nuevos métodos para reducir el riesgo de desarrollo de una diabetes gestacional y la tolerancia dañina a la glucosa en las mujeres embarazadas.

35 Resumen de la invención

Los inventores han efectuado un estudio investigando el efecto de un suplemento diario conteniendo bacterias probióticas sobre la concentración de la glucosa en plasma y de la sensibilidad a la insulina durante y después del  
 40 embarazo conjuntamente o no, con un asesoramiento dietético. Se investigaron además la eficacia de cepas bacterianas probióticas específicas, y combinaciones de cepas. Durante estos estudios se descubrió sorprendentemente que las concentraciones de glucosa en plasma fueron inferiores y la sensibilidad a la insulina mejoró en el grupo suplementado como probióticos, particularmente durante el tercer trimestre del embarazo. Se descubrió además que la composición corporal después del parto, del grupo suplementado con probióticos, difería de la de los otros grupos en que la grasa del cuerpo, como lo demostraba el grueso de los pliegues cutáneos, y la  
 45 circunferencia de la cintura, eran inferiores en el grupo suplementado con probióticos.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona el empleo de bacterias probióticas en la fabricación de una composición para la administración a una mujer en por lo menos el tercer trimestre del embarazo, para la prevención de la diabetes gestacional.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el empleo de bacterias probióticas en la fabricación de una composición para la administración a una mujer en por lo menos el tercer trimestre del embarazo y durante tres meses después del parto para la reducción del riesgo del desarrollo de un síndrome metabólico.

55 La invención se extiende al empleo para la prevención de la diabetes gestacional, proporcionando a una mujer en por lo menos el tercer trimestre del embarazo, en necesidad de la misma, de una composición que contiene una cantidad terapéutica de bacterias probióticas.

60 La invención se extiende también al empleo en la reducción del riesgo del desarrollo de un síndrome metabólico el cual comprende la administración a una mujer en por lo menos el tercer trimestre del embarazo, en necesidad de la misma, de una composición que contiene una cantidad terapéutica de bacterias probióticas y a continuación, la administración de dichas bacterias probióticas durante tres meses después del alumbramiento.

Sin el deseo de estar unidos por la teoría, los inventores creen que el impacto profundo de los probióticos del intestino sobre la fisiología, la inmunología, y el metabolismo del anfitrión ha empezado sólo recientemente a desvelarse. Las bacterias probióticas pueden procesar los polisacáridos de la dieta indigestibles por las enzimas humanas, añadiéndose ambos al conjunto de la glucosa intraluminal absorbible, y a los localmente efectivos ácidos grasos de cadena corta, los cuales son capaces de interactuar entre las bacterias y el anfitrión. La presencia de bacterias probióticas en el contenido microbiótico del intestino potencia la absorción de la glucosa como ha sido demostrado mediante ratones convencionalizados gnotobióticamente (asépticamente) en los que se ha producido un rápido desarrollo de micro vellosidades así como un almacenamiento de glucosa potenciado en el tejido adiposo mediante la supresión del gen de transcripción Fiaf (fasting induced adipocyte factor) ("factor adipocito inducido por el ayuno") conduciendo a una actividad aumentada de la lipoproteína lipasa. De esta manera, los ratones libres de gérmenes son sustancialmente más delgados que los ratones criados convencionalmente incluso con mayor consumo de energía. Es razonable creer que la mejor depuración de la glucosa y el mayor almacenamiento de tejido adiposo ha sido esencial durante los periodos de privación de alimentos, como ocurría frecuentemente con nuestros antepasados. Sin embargo, en el estado actual de abundancia de alimentos, por lo menos en el mundo desarrollado, las bacterias indígenas pueden efectivamente volverse una causa adicional de la obesidad, sugiriendo una manera atractiva de intervención por modificación del contenido microbiótico, y así el metabolismo de la glucosa, mediante los probióticos.

Las sociedades occidentales se han enfrentado con un substancial aumento de la carga de enfermedades cardiovasculares. El síndrome metabólico que puede ser definido como una combinación de obesidad, gran circunferencia de la cintura, metabolismo de la glucosa y resistencia a la insulina alterados, y niveles anormales de lípidos en sangre, precede a menudo al desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Además, como la glucemia materna está también asociada con la macrosomía y un riesgo de intolerancia a la glucosa en el niño, lo cual puede desarrollar incluso cuando la tolerancia maternal a la glucosa está dentro de los márgenes de referencia normales, es decir no clasificada como diabetes mellitus gestacional, este tratamiento puede también tener efectos beneficiosos para el niño.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la evolución con el tiempo de las concentraciones de glucosa en plasma de los tres grupos de estudio, desde el primer trimestre del embarazo hasta el final del seguimiento a los 12 meses después del parto.

Descripción detallada de la invención

En la especificación, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"niño" significa un niño de edad inferior a los 12 meses

"probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbiana con un efectos beneficioso sobre la salud o bienestar del anfitrión (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. y otros. "Probióticos: cómo deberían ser definidos" Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107- 10).

Todas las referencias de tantos por ciento son tantos por ciento en peso, a no ser que se especifique otra cosa.

Las bacterias probióticas se administran de preferencia a la mujer embarazada durante por lo menos el tercer trimestre del embarazo. Sin embargo de preferencia, se administran también durante el segundo trimestre e incluso con mayor preferencia durante toda la duración del embarazo.

Las bacterias probióticas son el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y el *Bifidobacterium lactis* CNCM I- 3446, los cuales pueden adquirirse entre otros, en la empresa Christian Hansen de Dinamarca con el nombre comercial de Bb12.

Una mezcla particularmente preferida es la de cantidades iguales de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y el *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446.

Una dosis diaria adecuada de las bacterias probióticas es desde 10e5 a 10e12 unidades formadoras de colonias (cfu), con mayor preferencia desde 10e7 hasta 10e11 cfu.

Las bacterias probióticas pueden ser administradas tanto a las mujeres embarazadas antes del parto como a las madres después del parto, como un suplemento en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas, goma de mascar o un líquido, por ejemplo. El suplemento puede contener además hidrocoloides protectores (como por ejemplo, gomas, proteínas o almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales para la encapsulación, materiales de pared/concha, compuestos para una matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes

de superficie activa, agentes solubilizantes (aceites, grasas, lecitinas, etc.), adsorbentes, soportes, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, auxiliares de proceso (disolventes), agentes fluidificantes, agentes enmascarantes del sabor, agentes para dar peso, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos. El suplemento puede contener también aditivos farmacéuticos convencionales y adyuvantes, excipientes y diluyentes, incluyendo, pero sin limitar a agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, ligninsulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas, y similares. En todos los casos dichos componentes adicionales pueden ser seleccionados teniendo en cuenta su idoneidad para el receptor en cuestión.

Alternativamente, las bacterias probióticas pueden ser administradas a las mujeres embarazadas en forma de una composición nutritiva terapéutica. La composición puede ser una fórmula nutritiva completa.

Una fórmula completa nutritiva para la administración a las madres embarazadas, de acuerdo con la invención, puede comprender una fuente de proteínas. Puede emplearse cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo, las proteínas animales (como por ejemplo las proteínas de la leche, las proteínas de la carne y las proteínas del huevo); proteínas vegetales (como por ejemplo la proteína de soja, la proteína de trigo, la proteína de arroz y la proteína de guisantes); mezclas de aminoácidos libres o combinaciones de los mismos. Las proteínas de la leche, por ejemplo la caseína y la proteína de suero de leche, y las proteínas de soja son particularmente preferidas. La composición puede contener también una fuente de hidratos de carbono y una fuente de grasas.

Si la fórmula incluye una fuente de grasas adicional al DHA, la fuente de grasas contiene de preferencia desde un 5% hasta un 40% de la energía de la fórmula; por ejemplo desde un 20% hasta un 30% de la energía. Un perfil de grasa adecuado puede obtenerse empleando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico.

Puede añadirse a la fórmula una fuente de hidratos de carbono. Esto proporciona de preferencia desde un 40% hasta un 80% de la energía de la fórmula. Puede emplearse cualquier hidrato de carbono adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, y mezclas de los mismos. Puede también añadirse fibra dietética si se desea. La fibra dietética pasa a través del intestino delgado sin ser ingerida por las enzimas y funciona como un agente natural de hinchamiento y laxante. La fibra dietética debe ser soluble o insoluble y en general se prefiere una mezcla de los dos tipos. Fuentes adecuadas de fibra dietética incluyen la soja, el guisante, la avena, la pectina, la goma guar, la goma arábiga, los fructo-oligosacáridos, los galacto-oligosacáridos, la sialil-lactosa y los oligosacáridos derivados de leches animales. Una mezcla de fibras preferida es una mezcla de galacto-oligosacáridos con fructo-oligosacáridos de cadena corta. De preferencia, si la fibra está presente, el contenido en fibra está entre 2 y 40 g/litro de la fórmula según se consume, con mayor preferencia entre 4 y 10 g/litro.

La fórmula puede contener también minerales y micronutrientes como por ejemplo trazas de elementos y vitaminas de acuerdo con las recomendaciones de los cuerpos gubernamentales como por ejemplo el USRDA. Por ejemplo, la fórmula puede contener por dosis diaria uno o más de los siguientes micronutrientes en los márgenes dados: de 300 a 500 mg de calcio, de 50 a 100 mg de magnesio, de 150 a 250 mg de fósforo, de 5 a 20 mg de hierro, de 1 a 7 mg de zinc, de 0,1 a 0,3 mg de cobre, de 50 a 200 µg de yodo, de 5 a 15 µg de selenio, de 1000 a 3000 µg de beta caroteno, de 10 a 80 mg de vitamina C, de 1 a 2 mg de vitamina B1, de 0,5 a 1,5 mg de vitamina B6, de 0,5 a 2 mg de vitamina B2, de 5 a 18 mg de niacina, de 0,5 a 2,0 µg de vitamina B12, de 100 a 800 µg de ácido fólico, de 30 a 70 µg de biotina, de 1 a 5 µg de vitamina D, y de 3 a 10 IU de vitamina E.

Si se desea, pueden incorporarse a la fórmula uno o más emulsionantes de grado alimenticio; por ejemplo, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos, lecitina y mono- y diglicéridos. De forma similar pueden ser incluidos sales y estabilizadores adecuados.

La fórmula es, de preferencia, para administración entérica, por ejemplo, en forma de un polvo para la reconstitución con leche o agua.

La fórmula nutritiva descrita más arriba puede ser preparada de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, puede prepararse mezclando juntamente la proteína, la fuente de hidratos de carbono y la fuente de grasas en proporciones adecuadas. Cuando se emplean, los emulsionantes pueden incluirse en este momento. Las vitaminas y minerales pueden ser añadidos en este momento pero habitualmente son añadidas más tarde para evitar la degradación térmica. Pueden ser disueltas en la fuente de grasas cualesquiera vitaminas lipofílicas, emulsionantes y similares antes de la mezcla. El agua, de preferencia agua que ha sido sometida a ósmosis inversa, puede a continuación mezclarse en forma de una mezcla líquida. La temperatura del agua es convenientemente alrededor de 50°C hasta alrededor de 80°C para ayudar a dispersar los ingredientes. Pueden emplearse licuadores comercialmente disponibles, para formar la mezcla líquida. La mezcla líquida se homogeneiza a continuación; por ejemplo, en dos etapas.

## ES 2 605 453 T3

La mezcla líquida puede, a continuación, tratarse térmicamente para reducir la carga bacteriana, mediante un rápido calentamiento de la mezcla líquida a una temperatura en el margen de aproximadamente 80 °C hasta aproximadamente 150 °C durante aproximadamente 5 segundos hasta aproximadamente 5 minutos, por ejemplo. Esto puede efectuarse mediante inyección de vapor, en autoclave, o mediante un intercambiador de calor; por ejemplo, un intercambiador de calor de placa.

A continuación, la mezcla líquida puede enfriarse desde aproximadamente 60 °C hasta aproximadamente 85 °C; por ejemplo, mediante enfriamiento flash. La mezcla líquida puede a continuación homogenizarse de nuevo; por ejemplo en dos etapas desde aproximadamente 10 MPa hasta aproximadamente 30 MPa en la primera etapa y aproximadamente desde 2 MPa hasta aproximadamente 10 MPa en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada puede a continuación ser enfriada de nuevo para añadir cualesquiera componentes sensibles al calor; como por ejemplo vitaminas y minerales. El pH y el contenido en sólidos de la mezcla homogeneizada se ajustan convenientemente en este punto.

La mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado adecuado, como por ejemplo un secador por pulverización o un secador por congelación, y se convierte en polvo. Este polvo debe tener un contenido en humedad inferior a aproximadamente un 5% en peso.

Las bacterias probióticas pueden ser cultivadas de acuerdo con cualquier método adecuado, y preparadas para la adición a la fórmula nutricional o para niños, mediante secado por congelación o secado por pulverización, por ejemplo. Alternativamente, pueden emplearse preparaciones bacterianas de suministradores especializados como por ejemplo Christian Hansen y Valio ya preparadas en una forma adecuada para la adición a productos alimenticios como por ejemplo fórmulas nutritivas y fórmulas para niños. Las bacterias probióticas pueden ser añadidas a la fórmula en una cantidad entre 10e3 y 10e12 cfu/g de polvo, con mayor preferencia entre 10e7 y 10e12 cfu/g de polvo.

Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente a título ilustrativo, y no dentro del ámbito de la presente descripción:

### Ejemplo 1

Un ejemplo de un suplemento nutritivo estable a largo plazo, para ser empleado de acuerdo con la presente invención, es como sigue:

	Por 100 kcal.	Por 100 g listos para beber	Por servicio (190 ml)
Energía (kcal)	100	65	130
Grasa (g)	0,92	0,60	1,20
Proteína (g)	3,54	2,30	4,60
Hidratos de carbono (g)	19,4	12,60	25,20
Fibra dietética (g)	3,62	2,35	4,70
Minerales			
Sodio (mg)	51	33	66
Potasio (mg)	238	155	310
Cloruro (mg)	123	80	160
Calcio (mg)	308	200	400
Fósforo (mg)	162	105	210
Magnesio (mg)	58,0	38	76
Selenio	7,7	5,0	10,0
Vitaminas			
Beta caroteno (µg)	1600	1050	2100
Vitamina D (µg)	3,8	2,50	5,0
Vitamina E (IU)	4,6	3,0	6,0
Vitamina C (mg)	38	25	50
Vitamina B1 (mg)	1,2	0,75	1,5
Vitamina B2 (mg)	1,3	0,85	1,7
Niacina (mg)	12	8	16
Vitamina B6 (mg)	1,1	0,7	1,4
Acido fólico (µg)	310	200	400
Vitamina B12 (µg)	1,2	0,75	1,5
Biotina (µg)	54	35	70
Elementos en trazas			
Hierro (mg)	12	7,5	15
Yodo (µg)	150	100	200

Cobre (mg)	0,20	0,13	0,26
Zinc (mg)	3,8	2,5	5,0
Bacterias probióticas			
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103			10e10
<i>B. lactis</i> Bb12			10e10

Ejemplo 2

5 Este ejemplo compara el efecto sobre la concentración de la glucosa en plasma y la sensibilidad a la insulina por la administración de bacterias probióticas a mujeres embarazadas, con el efecto de la administración del placebo a un grupo comparable de mujeres embarazadas.

10 Se reclutaron 256 mujeres embarazadas para participar en un estudio al azar prospectivo combinado de asesoramiento dietético e intervención de probióticos (NCT 00 16 77 00, <http://www.clinicaltrials.gov>). Los individuos se reclutaron durante el primer trimestre del embarazo en su primera visita a las clínicas de bienestar maternas en la ciudad de Turku y las áreas vecinas del sudoeste de Finlandia. Los individuos incluidos no tenían ninguna enfermedad metabólica. Se obtuvieron los consentimientos por escrito de las mujeres y el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital del Distrito del Sudoeste de Finlandia.

15 Diseño y conducta del estudio

Las visitas de estudio tuvieron lugar cada trimestre del embarazo, y al 1, 6 y 12 meses después del parto. En la línea base los individuos fueron asignados al azar en tres grupos de estudio, dos con 85 miembros y uno con 86 miembros. El grupo 1 (n= 85) recibió cápsulas de probióticos con asesoramiento dietético (dieta / probióticos). El grupo 2 (n= 86) recibió un placebo con asesoramiento dietético (dieta / placebo ), y el grupo 3 (n= 86) recibió un placebo sin ningún asesoramiento dietético (control /placebo).

25 La randomización para recibir probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG, ATCC 53103. Valio Ltd., Helsinki, Finlandia y *Bifidobacterium lactis* Bb12, Chr. Hansen, Hoershom, Dinamarca, 10e10 cfu/día cada uno) o placebo (celulosa anhidra microcristalina y dextrosa, Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca) en los grupos de asesoramiento dietético tuvo lugar mediante el sistema doble ciego, mientras que el grupo de control recibió el placebo mediante el sistema de simple ciego. La administración de los probióticos dio comienzo en la primera visita del estudio y duró hasta el final del exclusivo amamantamiento.

30 La actividad de los probióticos se confirmó mediante un análisis regular del contenido microbiano y la conformidad en el consumo de las cápsulas fue asesorada mediante entrevistas. La conformidad en el consumo de las cápsulas del estudio fue asesorada mediante entrevistas. Se consumieron en total un 97,8% de las cápsulas diariamente. A la iniciación de un consumo de las cápsulas del 6,3% por las mujeres, se informó de unos síntomas asociados al intestino incluyendo la flatulencia, heces sueltas o estreñimiento, pero también se relacionó una función intestinal más regular con el consumo de las cápsulas en todos los tres grupos por un igual. Después de esto la prevalencia de los síntomas informados se redujo a un 1,3% y un 0,4% en las visitas de estudio subsiguientes.

40 El asesoramiento dietético de los grupos 1 y 2 fue facilitado por un dietético en cada visita del estudio con la intención de modificar la ingesta dietética para ajustarla con la ingesta normalmente recomendada, tomando especial atención a la calidad de la grasa dietética. La consecución de la dieta recomendada fue apoyada proveyendo a los participantes con productos alimenticios fácilmente disponibles con una composición grasa adecuada (por ejemplo, pastas y aderezos para ensaladas a base de aceite de colza) para ser consumidos en casa. La ingesta dietética fue asesorada cada trimestre empleando un calendario de alimentos cada 3 meses. La ingesta de energía y nutrientes se calculó con un programa computerizado Micro-Nutrica® (versión 2.5, Research Centre of the Socials Insurance Institution, ("Centro de Investigación del Instituto de Seguridad Social") Turku, Finlandia).

50 En la línea de base, se recogió información de los antecedentes que conciernen a la educación y a la paridad, mediante entrevistas. Se midieron los pesos y las alturas, y se autoinformó el peso antes del embarazo y se empleó para calcular el índice de masa corporal antes del embarazo (BMI) como peso (kg) dividido por el cuadrado de la altura (m). El aumento de peso gestacional se calculó restando el peso autoregistrado antes del embarazo, del peso registrado en la visita prenatal o en el hospital dentro de una semana antes del parto. La información respecto a los pesos y altura de nacimiento de los niños y el curso del embarazo fueron obtenidos de los registros del hospital. En la mañana de cada visita, se extrajeron muestras de sangre de ayuno de 10 horas durante la noche de una vena antecubital.

55 Se midió el grosor del pliegue de piel del bíceps en la primera visita y en las visitas postparto a los 1, 6 y 12 meses, y se midió la circunferencia de la cintura en las visitas a los 6 y 12 meses postparto.

## Métodos analíticos

La concentración de glucosa en plasma se midió con un método enzimático empleando la hexoquinasa en el analizador automático modular P800 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La hemoglobina glicosilada A1C en sangre, se midió mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (HPLC) mediante el programa Bio-Rad Variant TMII hemoglobina A1C (Bio-Rad laboratorios, Marnes-la-Coquette, Francia). La concentración de insulina en suero se midió con un ensayo inmunoelectroluminométrico (ECLIA) mediante el analizador automático modular E 170 (Roche Diagnostics GmbH). Para evaluar la sensibilidad de la insulina se calculó el índice de ensayo (QUICKI) de la sensibilidad cuantitativa de la insulina, como se describe por Katz et al. 14. Se calculó el asesoramiento del modelo de homeostasis (HOMA) empleando la fórmula de Matthews et al. 15. Se efectuaron ensayos de detección de glucosa en clínicas de mujeres bien, de acuerdo con procedimientos estándar para mujeres que cumplían los criterios para riesgo de embarazo (BMI pre embarazo, por encima de los 25, edad por encima de los 40 años, diabetes mellitus gestacional durante el previo embarazo, previo nacimiento del niño que pesó más de 4500 g, detección de la glucosa en orina o sospecha de feto macrosómico en el presente embarazo), de las 28 a las 40 semanas de gestación.

Las concentraciones de glucosa en plasma por encima de los 4,8 mmoles/litro durante el embarazo y 5,6 mmoles/litro en estado de no embarazo, un porcentaje de hemoglobina glicosilada frente a la hemoglobina total por encima de 6,5% y una concentración de insulina en suero por encima de 26 mU/litro se consideran elevadas (Laboratorios de la Universidad Central de Turku). Se evaluó la sensibilidad aumentada de la insulina mediante valores más altos de QUICKI y más bajos de HOMA. Los resultados de los ensayos de determinación de la glucosa fueron considerados un valor de la glucosa en ayunas patológicamente aumentado ( $> 4,8$  mmoles/litro), y se combinaron con por lo menos una medida postprandial anormal (glucosa postprandial en sangre  $> 10,0$  mmoles/litro en una hora, ó  $> 8,7$  mmoles/litro en dos horas).

## Análisis estadísticos

La medida de resultados primaria fue el metabolismo materno de la glucosa, caracterizado por la concentración de glucosa en plasma, la hemoglobina glicosilada en sangre A1C, la insulina en suero, y los índices HOMA y QUICKI. Las mediciones se realizaron en el primer trimestre (línea de base) y el tercer trimestre de embarazo, y a los 1, 6 y 12 meses después del parto. Los valores que faltan (como máximo uno durante el embarazo y uno durante el periodo del postparto) fueron computados empleando la media del grupo o la media geométrica, puesto que los métodos de extrapolación lineal o interpolación no fueron apropiados debido a la substancial fluctuación inherente no-lineal del sujeto. La comparación del metabolismo de la glucosa en el tercer trimestre del embarazo o a los 12 meses después del parto entre los tres grupos de estudio se hizo por análisis de la covarianza (ANCOVA) y el período después del parto (1, 6 y 12 meses) fue analizado empleando el método ANCOVA para repetidas mediciones. En ambos análisis, la línea de base fue incluida como un covariato continuo. La insulina en suero y el HOMA estaban sesgados hacia la derecha y fueron logarítmicamente transformados antes del análisis. Los resultados vienen dados como medias ajustadas a la línea de base o medias geométricas con el 95% de intervalos de confianza (CI). Se efectuaron comparaciones de grupos emparejados según Bonferroni. Las proporciones de los sujetos con concentraciones elevadas de glucosa ( $\geq 4,8$  mmoles/litro durante el embarazo,  $\geq 5,6$  mmoles/litro postparto) se compararon entre grupos de estudio empleando el ensayo chi al cuadrado. Los resultados de las comparaciones del grupo vienen dados como ratios posibles (OR) con el 95% de CI.

Además, los nutrientes dietéticos de rendimiento energético evaluados de los alimentos diarios, se analizaron para explicar cambios en el metabolismo de la glucosa. Los grupos de estudio se compararon en el tercer trimestre durante el periodo de postparto y a los 12 meses después del parto, empleando los mismos métodos que se han descrito para el resultado primario.

Las variables de la línea de base se analizaron empleando el ensayo de chi al cuadrado, ANOVA, el ensayo de Kruskal-Wallis (5' Apgar) o el ANCOVA para medidas repetidas (peso y BMI).

Los datos fueron escogidos al azar y analizados con el programa SPSS (versión 14,0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) por un experto estadístico (TP), independientemente de las evaluaciones clínicas.

## Resultados

El 81% de las mujeres reclutadas (208 / 256) fueron sometidas a un seguimiento hasta 12 meses después del parto. Las razones para la discontinuidad fueron descriptivas de una normal población de mujeres embarazadas. De las 208 mujeres que completaron el seguimiento, 23 estaban embarazadas de nuevo hacia el final del seguimiento. En cada momento de la evaluación, para completar las series analíticas longitudinales para las variables bioquímicas, se estimaron de 3 a 7 valores resultando un número final de 66 individuos en el grupo 1, 70 en el grupo 2, y 65 en el grupo 3.

Las mujeres participantes fueron caucásicas, la mayoría habían recibido una alta educación (79% en el grupo 1, 69% en el grupo 2, y 71% en el grupo 3) y estaban esperando su primer hijo (65% en el grupo 1, 1,51% en el grupo 2 y 57% en el grupo 3). Los niños nacieron a término y sus alturas y pesos medios estuvieron dentro de los márgenes de referencia de la población. De acuerdo con el índice medio de masa corporal (BMI), antes del embarazo, las mujeres fueron de peso normal. No hubo ninguna diferencia entre los grupos en términos de ganancia de peso en el embarazo y se ajustaron los pesos de la línea base durante el embarazo o después del parto BMI. La duración media de la exclusiva alimentación por lactancia, y así, la duración de la intervención probiótico/placebo no difirió entre los grupos del estudio.

10 Las características de las mujeres y sus niños están mostradas en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1 características de las mujeres y sus niños<sup>1</sup>

	Control/placebo (n=85)		Dieta/placebo (n= 86)		Dieta/probióticos (n= 85)		Valor de P 2
Mujeres							
Edad(años)	30,2	(5,0)	30,1	(5,2)	29,7	(4,1)	0,813
Peso(kg)							
1er trim. de embarazo (línea de base)	68,9	(11,8)	71,0	(13,1)	64,9	(9,7)	0,003
3er trim. Ganancia Embarazo	78,4	(12,2)	79,5	(11,0)	74,8	(10,1)	0,790
BMI(kg/m <sup>2</sup> ) antes del embarazo	14,8	(5,1)	14,8	(5,1)	15,0	(4,3)	0,946
1er trim del embarazo (línea de base)	23,7	(3,5)	24,3	(4,4)	22,9	(3,2)	0,037
Postparto 1mo	24,7	(3,6)	25,4	(4,7)	23,7	(3,2)	0,017
6 mo	25,7	(3,6)	25,9	(4,2)	24,6	(3,1)	
12 mo	25,2	(3,9)	25,6	(5,0)	23,8	(3,4)	
Duración (meses) de la exclusiva alimentación con leche materna	24,8	(3,9)	25,1	(5,3)	23,4	(3,3)	0,9754
Total alimentación con leche materna							
	40,1	(1,3)	39,9	(1,8)	39,9	(1,3)	0,672
	3600	(515)	3602	(439)	3489	(431)	0,209
Niños <sup>5</sup>	51	(2)	51	(2)	51	(2)	0,197
Nacimiento a las semanas de la gestación	35,1	(1,4)	35,1	(1,3)	34,8	(1,3)	0,257
Peso al nacimiento (g)	9	(4-10)	9	(3-10)	9	(6- 10)	0,280 <sup>6</sup>
Altura al nacimiento (cm)							
Circunferencia de la cabeza (cm)							
Apgar a 5 minutos							

<sup>1</sup> los resultados están dados como la media (SD) o la mediana (intervalo). <sup>2</sup> ANOVA o ANCOVA cuando la línea base se incluyó como una covariación cuando fue adecuado (peso y BMI). <sup>3</sup> las madres embarazadas fueron excluidas del análisis. <sup>4</sup> ANOVA para mediciones repetidas (1,6 y 12 mo). <sup>5</sup> n = 76-78 en el control/placebo, n=76-79 en dieta/placebo y n= 75-81 en dieta/probióticos. <sup>6</sup> ensayo de Kruskal-Wallis

15 Impacto de la intervención, sobre el metabolismo de la glucosa

En todos los grupos de estudio las concentraciones de glucosa en plasma disminuyeron desde el primer trimestre hasta el tercer trimestre y aumentó durante los 12 meses del periodo de postparto (figura 1). La diferencia entre los grupos de estudio fue significativa durante el embarazo, cuando la línea base ajustada fue de 4,56, 4,60 y 4,45 m/ moles/litro en el grupo 3 grupo 2 y grupo 1, respectivamente (p= 0,025), casi significativa a los 12 meses después del parto (valores medios ajustados 5,06, 5,22 y 4,93 mmol/litro; p= 0,060), y significativa después del período postparto hasta 12 meses después del parto (medias ajustadas 5,02, 5,01 y 4,87 mmol/litro; p = 0,025). El grupo 1 se diferenció del grupo 2 en el tercer trimestre de embarazo (p = 0,026), a los 12 meses después del parto (p = 0,054) y durante todo el periodo postparto (p = 0,066) y además del grupo 3 durante el periodo postparto (p = 0,048).



Aunque las concentraciones medias de glucosa en plasma estuvieron dentro de los márgenes de referencia normales en todos los grupos de estudio, el riesgo de una elevada concentración de glucosa se redujo en el grupo 1 durante el período de estudio (figura 1, insertada). Durante el tercer trimestre, la intervención del grupo 1 tuvo la capacidad de reducir el riesgo de altas concentraciones de glucosa en plasma ( $> 4,8$  moles/litro) (OR 0,31, 95% CI 0,12 a 0,78;  $p= 0,013$ ) comparado con el grupo 3. Sin embargo, la intervención del grupo 2 no tuvo esta capacidad comparada con el grupo 3 (OR 1,26, 95%CI 0,59 a 2,69;  $p= 0,553$ ). Aunque no estadísticamente significativa, el riesgo de altas concentraciones de glucosa en plasma ( $>5,6$  mmoles/litro) persistió menos en el grupo 1 durante el período de postparto (OR 0,46, 95% CI 0,14 a 1,50;  $p=0,197$ ), pero no en el grupo 2 (OR 1,55, 95% CI 0,61 a 3,95;  $p=0,360$ ) comparado con el grupo 3.

Un 45% de individuos padecieron un test de desafío de glucosa durante el embarazo. Aunque la prevalencia de resultados del test patológico fue el más bajo en el grupo 1 (37% de individuos) comparado con el grupo 2 (58%) y el grupo 3 (57%), el riesgo relativo no disminuyó de forma significativa.

La hemoglobina glicosada A1C permaneció dentro de unos márgenes normales durante el estudio en todos los individuos, pero particularmente en uno de ellos, en el grupo 2, a los 12 meses después del parto. Mientras la hemoglobina glicosilada media A1C fue comparable entre los grupos de estudio en el tercer trimestre de embarazo y 12 meses después del parto, hubo una tendencia a disminuir la hemoglobina glicosada A1C en el grupo 1 en comparación con el grupo 2 durante el período después del parto (tabla 2).

Impacto de la intervención sobre la composición del cuerpo maternal después del parto

Como se ha descrito más arriba, no hubo ninguna diferencia en la ganancia de peso entre los grupos durante el embarazo. Sin embargo la composición del cuerpo después del parto como se evidenció mediante el grueso del pliegue de la piel del bíceps, el cual es una medida de la grasa corporal, difería entre los grupos como se muestra en la tabla 2 de más abajo con los valores más pequeños siendo registrados por el grupo 1, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,03$ ) cuando las mediciones tomadas en la primera visita se tomaron como covariantes.

Tabla 2

Grueso del pliegue de la piel del bíceps (cm)	1 mes	6 meses	12 meses
Grupo 1	0,83 ( 0,33)	0,89 (0,44)	0,81 (0,4)
Grupo 2	0,97 (0,52)	1,05 (0,6)	0,89 (0,5)
Grupo 3	1,03 (0,54)	1,13 (0,62)	1,08 (0,65)
Desviación estándar entre paréntesis			

Además, la circunferencia de la cintura, la cual es otra medida de la grasa corporal, así como también es uno de los factores implicados en el síndrome metabólico el cual es también menor para el grupo 1, siendo la diferencia entre los grupos estadísticamente significativa en el tiempo ( $p=0,005$ ), las mediciones están mostradas en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Circunferencia de la cintura (cm)	6 meses	12 meses
Grupo 1	76,31 (7,90)	74,90 (6,85)
Grupo 2	81,28 (10,89)	80,08 (11,23)
Grupo 3	80,54 (9,17)	78,75 (10,15)
Desviación estándar entre paréntesis		

Impacto de la intervención sobre la insulina en suero y los índices de sensibilidad de la insulina

La concentración de insulina así como la resistencia a la insulina evaluada mediante el índice HOMA aumentó y la sensibilidad de la insulina evaluada mediante el índice QUICKI se redujo hacia el tercer trimestre del embarazo en todos los grupos. Comparativamente, después del parto la concentración de insulina y el índice HOMA se redujo, y el índice QUICKI aumentó. Las medias de las concentraciones de insulina en suero, la resistencia a la insulina y la sensibilidad de la insulina fueron distintas entre los grupos durante el período de estudio (tabla 3). La diferencia, en el tercer trimestre del embarazo y durante el período después del parto, se explicó por el efecto disminuidor de la intervención del grupo 1, el cual fue especialmente pronunciado cuando se le comparó con el grupo 3 en las visitas combinadas después del parto. El índice HOMA fue el más bajo y el índice QUICKI el más alto, sugiriendo una mayor sensibilidad a la insulina en el grupo 1. La intervención del grupo 1 probó ser especialmente beneficiosa comparada con el grupo 2 durante el tercer trimestre del embarazo y con el grupo 3 durante el período después del parto.

Este estudio proporciona la primera evidencia de un diálogo activo entre el anfitrión y el contenido microbiótico intestinal en el metabolismo de la glucosa; el asesoramiento dietético combinado y la intervención probiótica pueden moderar la concentración de glucosa en plasma y permitir el control glucémico en hembras jóvenes saludables.

Aunque estudios previos han mostrado la evidencia de un metabolismo aumentado de la glucosa durante el embarazo mediante medios dietéticos, particularmente en aquellas mujeres con un diagnóstico de diabetes gestacional, este estudio es el primero en mostrar los beneficios a largo plazo sobre el metabolismo de la glucosa y de la insulina, de los probióticos combinados con un asesoramiento dietético. Los probióticos parecieron traer un efecto disminuidor más profundo de la glucosa que el asesoramiento dietético solo, sugiriendo que los probióticos pueden ser de particular importancia.

A partir del mismo estudio descrito más arriba, el suero de los respectivos niños de las madres del grupo de control, el grupo 1 y el grupo 2, han sido analizados para encontrar las concentraciones de "Split 32-33 Proinsulin" (división 32-33 proinsulina). La medición se efectuó de acuerdo con un método estándar descrito en particular en la revista The Lancet 2003; volumen 361: 1089-97 (publicado en marzo 29 del 2003). Se tomaron muestras cuando los niños tuvieron 6 meses de edad, las muestras de sangre se recogieron mediante punción en las venas antes del mediodía, el suero fue inmediatamente separado y guardado inicialmente a -20 °C y a continuación a -80 °C hasta que el análisis para el split 32-33 proinsulina fue resuelto en el tiempo mediante un ensayo fluorométrico (The Lancet 2003). El split 32-33 proinsulina está parcialmente procesado a partir de la proinsulina, una mayor concentración de la cual indica una mayor resistencia a la insulina. Una mayor resistencia a la insulina está ella misma asociada con los tres factores de riesgo bien conocidos para los trastornos metabólicos (obesidad, diabetes, hipertensión). Los resultados están mostrados en la tabla 4. La prevalencia de un alto split 32-33 proinsulina en el grupo 2 (intervención-placebo) es un 46% del de los controles. En el grupo 1 (grupo intervención-probiótico) la prevalencia de un alto split 32-33 proinsulina es un 37 % del que se encuentra en los controles.

Los resultados indican que la intervención dietética con probióticos está asociada con una prevalencia más pequeña de un alto split 32-33 proinsulina en los niños. Como tal, se cree que la intervención puede ser beneficiosa para los niños y puede reducir el riesgo del síndrome metabólico como el sobrepeso, la diabetes y la hipertensión más tarde en la vida.

Tabla 4. Alta proinsulina (> 85% porcentual en proinsulina o en el split 32-33 proinsulina) en los grupos de estudio

Comparación entre grupos no ajustados y grupos ajustados <sup>1</sup> , empleando un análisis de regresión logística							
	No ajustados			Ajustados <sup>1</sup>			
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	
Grupo de estudio	<b>0,066</b>			<b>0,0053</b>			
Grupo 1	0,46	0,19 a 1,10	0,079	0,43	0,17 a 1,12	0,085	
Grupo 2	0,37	0,15 a 0,94	0,037	0,30	0,11 a 0,86	0,026	
Duración de la alimentación materna (≥ 6 meses)				0,22	0,09 a 0,50	< 0,001	
Glucosa en madres > media				2,13	0,89 a 5,12	0,091	

<sup>1</sup> Las siguientes variables fueron dadas para el modelo de regresión logística paso a paso: glucosa de las madres a 6 meses, diabetes durante el embarazo, fumar antes del embarazo, y duración de la alimentación con leche materna, 6 meses. El grupo de control es el grupo de referencia.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El empleo de bacterias probióticas en la manufactura de una composición para la administración a una mujer embarazada en por lo menos el tercer trimestre del embarazo para la prevención de la diabetes gestacional, en la que se emplea una mezcla de bacterias probióticas del ácido láctico y Bifidobacterias, y en donde las bacterias probióticas del ácido láctico son el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y la Bifidobacteria probiótica es el *Bifidobacterium lactis* CNCMI- 3446.
- 10 2. El empleo de bacterias probióticas en la manufactura de una composición para la administración a una mujer embarazada en por lo menos el tercer trimestre del embarazo y durante tres meses después del parto para la reducción del riesgo de desarrollo del síndrome metabólico, en donde se emplea una mezcla de bacterias probióticas de ácido láctico y Bifidobacterias, y en donde la bacteria probiótica de ácido láctico es el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y la Bifidobacteria probiótica es el *Bifidobacterium lactis* CNCMI-3446.
- 15 3. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde las bacterias probióticas deben administrarse en una dosis diaria entre  $10e5$  y  $10e12$  unidades formadoras de colonias.
- 20 4. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde las bacterias probióticas deben administrarse a la mujer durante el segundo y tercer trimestre del embarazo o durante toda la duración del embarazo.
- 25 5. Una mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1. 3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCMI-3446 para emplear en la prevención de la diabetes gestacional, en donde dicha mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1. 3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCMI-3446 se emplea para la administración a una mujer embarazada en por lo menos el tercer trimestre del embarazo.
- 30 6. Una mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1. 3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCMI-3446 para emplear en la reducción del riesgo del desarrollo de un síndrome metabólico, en donde dicha mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1. 3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCMI-3446 se emplea para la administración a una mujer embarazada en por lo menos el tercer trimestre del embarazo y durante tres meses después del parto.
- 35 7. Las bacterias probióticas para el empleo de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en donde las bacterias probióticas deben ser administradas en una dosis diaria entre  $10e5$  y  $10e12$  unidades formadoras de colonias.
8. Las bacterias probióticas para emplear de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde las bacterias probióticas deben ser administradas a la mujer durante el segundo y tercer trimestre del embarazo o durante la duración completa del embarazo.

**Figura 1**

