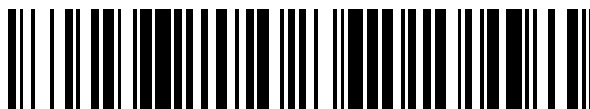


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 619**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2013** **PCT/EP2013/068656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14040962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2013** **E 13763020 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017** **EP 2895012**

54 Título: **Composición prebiótica de tilacoides**

30 Prioridad:

11.09.2012 SE 1251019

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

THYLABISCO AB (100.0%)
Per-Åke Albertsson Uardavägen 8F
224 71 Lund, SE

72 Inventor/es:

ALBERTSSON, PER-ÅKE y
ERLANSON ALBERTSSON, CHARLOTTE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 656 619 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

Composición prebiótica de tilacoides

5 Campo de invención

La presente invención se refiere al campo de los prebióticos, y especialmente a una composición que estimula el crecimiento y/o la actividad de bacterias probióticas, normalmente bacterias del ácido láctico, en el sistema digestivo de mamíferos.

10 Antecedentes

Las bacterias probióticas se conocen bien en la técnica, y sus beneficios para la salud están documentados. Con el fin de aumentar los beneficios de las bacterias probióticas, pueden complementarse mediante sustancias prebióticas que promueven a las bacterias. Los prebióticos son productos no bacterianos con un efecto beneficioso sobre la microbiota. Actúan como fertilizantes para la microbiota colónica, potenciando de ese modo el crecimiento de organismos comensales beneficiosos, tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Un prebiótico es normalmente un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos, tanto en la composición como/o la actividad en la microflora gastrointestinal, también conocida como microbiota del intestino o flora comensal, que confiere beneficios para la salud y el bienestar del huésped.

La promoción de bacterias probióticas, tales como normalmente bacterias del ácido láctico, por ejemplo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, puede ser beneficiosa en el tratamiento de enfermedades asociadas con microbiota del intestino alterada. Como ejemplo, diarrea asociada con antibióticos, diarrea del viajero, diarrea pediátrica y síndrome del intestino irritable son estados que se sabe que están asociados con microbiota del intestino alterada. Además, el uso de agentes prebióticos se ha asociado con un riesgo reducido de cáncer colorrectal. Además, pueden producirse alteraciones en la flora comensal debido a una variedad de otros factores incluyendo, pero sin limitarse a, radioterapia o exposición accidental, uso de antibióticos y otros agentes que influyen en el crecimiento bacteriano, enfermedades del intestino tales como intolerancia al gluten. Tales cambios no deseados pueden dar lugar a enfermedad y función inmunitaria alterada y se rectifican mediante el uso de prebióticos, de modo que puede lograrse la función y el crecimiento fisiológicos normales de tanto la flora comensal como el huésped.

Por tanto, los estados en los que una flora bacteriana del intestino beneficiosa se ve alterada pueden tratarse o prevenirse promoviendo bacterias probióticas.

Existe una gran variedad de posibles sustancias prebióticas. Como ejemplo, en el documento EP 1 056 358 B1, se describe que la ingesta oral de un monosacárido específico en un alimento prebiótico estimula el crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon humano. El documento US 2008/175899 A1 describe una composición administrada por vía oral para promover la salud de los senos nasales que comprende al menos un agente probiótico en combinación con N-acetilcisteína (NAC) y un bioflavonoide o derivado del mismo.

El documento WO 2012/113918 A1 describe una composición que comprende tilacoides, o partes de los mismos, para reducir el transporte de moléculas a través de la mucosa intestinal del tracto intestinal de un mamífero.

El documento CN 101278752 A describe una serie de prescripciones en polvo seco de bebidas de frutas-vegetales con carnitina instantáneas y una técnica de fabricación de las mismas.

Sin embargo, existe la necesidad de encontrar sustancias prebióticas nuevas y mejoradas con beneficios añadidos, que sean fáciles de producir y seguras de ingerir.

50 Sumario

Por consiguiente, la presente invención busca preferiblemente superar las deficiencias identificadas anteriormente en la técnica individualmente o en cualquier combinación y soluciona al menos los problemas mencionados anteriormente proporcionando una composición prebiótica nueva y mejorada con beneficios añadidos, que es fácil de producir y segura de ingerir.

Según un aspecto de la invención, se proporciona el uso no terapéutico de una composición que comprende tilacoides aislados, enriquecidos, o partes de los mismos, como agente prebiótico. Tal uso es normalmente para promover bacterias del ácido láctico, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en los intestinos, tal como el íleon y el ciego, por ejemplo el íleon, de un mamífero.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende tilacoides aislados, enriquecidos, o partes de los mismos, y bacterias probióticas, en la que el contenido en clorofila en la composición es de desde 1 mg hasta 75 mg de clorofila por g de composición.

En las reivindicaciones dependientes se definen características ventajosas adicionales de la invención. Además, se elaboran características ventajosas de la invención en las realizaciones dadas a conocer en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, características y ventajas de los que es capaz la invención resultarán evidentes y se dilucidarán a partir de la siguiente descripción de realizaciones de la presente invención, haciéndose referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:

- la figura 1 es un gráfico que muestra la concentración (pM) de insulina en plasma según una realización;
- las figuras 2 y 3 son gráficos que muestran el recuento de viables (UFC/g de tejido) de lactobacilos según realizaciones de la invención;
- la figura 4 es un gráfico que muestra el recuento de viables (UFC/g de tejido) de bacterias según una realización; y
- las figuras 5 y 6 son gráficos que muestran el análisis de componentes principales (PCA) de datos de T-RFLP según realizaciones de la invención.

Descripción detallada

Se describirán varias realizaciones de la presente invención en más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos con el fin de que los expertos en la técnica puedan llevar a cabo la invención. Sin embargo, la invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea concienzuda y completa, y transmitirán completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica. Las realizaciones no limitan la invención, sino que la invención está sólo limitada por las reivindicaciones de patente adjuntas. Además, la terminología usada en la descripción detallada de las realizaciones particulares ilustradas en los dibujos adjuntos no pretende ser limitativa de la invención.

Pueden extraerse tilacoides de la membrana del cloroplasto de hojas verdes y contienen proteínas, lípidos y pigmentos (por ejemplo, clorofila y carotenoides). En varios estudios se ha encontrado que aumentan la saciedad, disminuyen las señales de hambre y promueven la pérdida de peso, tanto en seres humanos como en sujetos animales (véanse los documentos WO 2006/132586 y WO 2010/008333 entre otros). Los efectos promotores de la saciedad se explican de dos modos: los tilacoides interactúan con triacilglicéridos de la dieta y el complejo de lipasa/colipasa y, como resultado, provocan un impedimento físico, prolongando de ese modo la digestión de la grasa de la dieta y también la captación de nutrientes a lo largo de la pared intestinal.

Los tilacoides los digiere el organismo, por lo que pueden usarse sin ningún efecto tóxico. Sin embargo, los tilacoides se digieren más lentamente que otros compartimentos celulares, tales como mitocondrias, lo que es beneficioso. Tal como reconoce el experto, un agente prebiótico es un ingrediente que permite cambios específicos, tanto en la composición como/o en la actividad en la microflora gastrointestinal que confiere beneficios para la salud y el bienestar del huésped.

Los inventores investigaron los efectos de los tilacoides sobre la microbiota del intestino y el resultado tras una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas. Encontraron sorprendentemente que los tilacoides regulan la microbiota del intestino (véanse las figuras 2 a 4), por tanto funcionan como agente prebiótico. Además, encontraron que los tilacoides aumentan la sensibilidad a la insulina (véase la figura 1).

En resumen, se dividieron ratas Sprague-Dawley en dos grupos y se alimentaron con o bien una dieta enriquecida en tilacoides o bien una dieta de control, de pienso para ratas normal, durante 10 días. Tras 10 días se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, dando como resultado una concentración inferior significativa de insulina en las ratas alimentadas con tilacoides en comparación con el control (véase la figura 1). El análisis de las bacterias mostró un aumento significativo de los lactobacilos en el íleon, inducido por la adición de tilacoides, demostrado tanto con cultivo bacteriano de muestras intestinales como mediante qPCR. Además, se observó una cantidad significativamente reducida de lactobacilos fecales mediante análisis de qPCR en el grupo de tilacoides, lo que sugiere que los lactobacilos podrían ser más adherentes a la mucosa del intestino tras la complementación de tilacoides durante 10 días.

El análisis de otras bacterias indicó que las bacterias Gram-positivas disminuyeron significativamente en el colon, el ciego y las heces para el grupo de tilacoides en comparación con el control. El análisis de la microbiota fecal a través del análisis de componentes principales de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) demostró poblaciones microbianas distintas cuando se compararon animales con tilacoides y de control. Conjuntamente, estos hallazgos indican que los tilacoides pueden regular la microbiota del intestino, por tanto funcionan como un agente prebiótico. Esto a su vez podría ser importante en la regulación del peso corporal y trastornos metabólicos.

Los presentes inventores han encontrado por tanto que la administración oral de una composición que comprende tilacoides, o partes de los mismos, a un mamífero potencia la flora probiótica intestinal y promueve bacterias del ácido láctico. Una composición que comprende tilacoides aislados, enriquecidos puede funcionar por tanto como un agente prebiótico. Además, se ha mostrado que diversas cepas probióticas, especialmente lactobacilos, son útiles en la prevención o el tratamiento de una función inmunitaria alterada, y diarrea asociada con antibióticos, diarrea del viajero, diarrea pediátrica y síndrome del intestino irritable.

Según una realización, una composición que comprende tilacoides aislados, enriquecidos, o partes de los mismos, se proporciona por tanto para promover bacterias del ácido láctico, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en los intestinos de un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. Normalmente, la composición se administra por vía oral con el fin de alcanzar los intestinos. Al promover bacterias del ácido láctico en los intestinos, y especialmente el íleon y el ciego, más preferiblemente el íleon, pueden prevenirse o tratarse estados asociados con microbiota del intestino alterada, incluyendo, pero sin limitarse a, función inmunitaria alterada, y diarrea asociada con antibióticos, diarrea del viajero, diarrea pediátrica y síndrome del intestino irritable.

Aunque pueden usarse tilacoides aislados, enriquecidos, o partes de los mismos para regular la microbiota del intestino, se incluyen bacterias probióticas, según una realización, en la composición. Al incluir bacterias probióticas, el efecto sobre la microbiota del intestino puede potenciarse y las bacterias probióticas existentes se complementan. Las bacterias probióticas que van a incluirse en la composición pueden ser *Bifidobacterium*, por ejemplo *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus plantarum*.

Los principios generales del aislamiento y enriquecimiento de tilacoides se conocen en la técnica (véanse los documentos PCT/SE2006/000676, WO/SE2009/000327 y Emek, SC, Szilagyi A, Akerlund H E, *et al.* (2010) A large scale method for preparation of plant thylakoids for use in body weight regulation *Prepar biochem & biotech* 40 (1), 13-27).

Normalmente, los tilacoides de la presente composición se enriquecen a partir de hojas verdes o algas verdes. Preferiblemente, los tilacoides se aíslan y enriquecen a partir de espinacas. Antes de añadir los tilacoides a la composición, pueden concentrarse de una manera tal que el contenido en clorofila de los tilacoides aislados, enriquecidos sea de desde aproximadamente 8 mg hasta 150 mg de clorofila por g. El contenido de tilacoides en la composición puede corresponder a un contenido en clorofila de 1 mg a 75 mg de clorofila por g de composición.

La composición usada para promover bacterias del ácido láctico, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en los intestinos, puede ser un producto alimenticio o un medicamento. Según una realización, la composición es una composición farmacéutica o nutracéutica oral que comprende una emulsión de aceite en agua fisiológicamente tolerable que comprende tilacoides. En una realización de este tipo, la cantidad de tilacoides es del 20 al 30% en peso, tal como aproximadamente el 25% en peso. Además, el contenido en aceite puede ser del 20 al 30% en peso, tal como aproximadamente el 25% en peso. El aceite usado pueden ser aceites vegetales de calidad alimentaria, tal como aceite de colza, aceite de oliva, aceite de girasol, etc.

Ya que la composición puede administrarse de diversas formas, la dosis diaria de tilacoides que va a administrarse puede variar. Como principio de orientación, la cantidad de la composición que va a administrarse puede seleccionarse de una manera tal que la dosificación se correlacione con una dosis diaria de 2,4 mg a 240 mg de tilacoides por kg de masa corporal del mamífero.

Según otra realización, la composición de tilacoides dada a conocer en el presente documento se proporciona para su uso no terapéutico como agente prebiótico. Ya que la composición de tilacoides dada a conocer en el presente documento puede cambiar tanto la composición como/o la actividad de la microflora gastrointestinal, puede conferir beneficios para la salud y el bienestar del huésped.

Las bacterias probióticas que residen normalmente en el tracto gastrointestinal humano, denominadas conjuntamente microbiota del intestino, tienen un papel importante en la adquisición de nutrientes y la regulación de la energía. En los últimos años, se ha propuesto que la microbiota es diferente entre personas de peso normal y personas con sobrepeso u obesas. Numerosos hallazgos a partir de estudios en seres humanos y animales han revelado que la cantidad de dos divisiones dominantes de bacterias del intestino, concretamente la Gram-positiva *Firmicutes* y la Gram-negativa *Bacteroidetes*, está estrechamente relacionada con la fisiopatología de la obesidad al alterar la eficacia de obtención de energía del huésped. Por consiguiente, en animales y pacientes obesos, se ha demostrado un aumento de *Firmicutes* y una reducción de *Bacteroidetes* en el intestino. Se produce un desplazamiento opuesto en la razón de estas bacterias específicas a medida que los pacientes obesos pierden peso con dietas bajas en calorías. Por otro lado, las evidencias sobre tales variaciones de la microbiota intestinal en seres humanos obesos eran contradictorias. Con respecto a *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, no se encontraron diferencias entre individuos obesos y no obesos y aun cuando en personas obesas en comparación con las de peso normal se ha documentado una abundancia significativa de *Bacteroidetes*. Estos hallazgos suscitan la posibilidad de que la microbiota del intestino desempeñe un papel importante en la regulación del peso corporal y pueden ser un factor en el desarrollo de la obesidad.

Ahora también está demostrándose que otras enfermedades metabólicas, como la diabetes, están asociadas con cambios en la composición de la microbiota. Se ha propuesto también que una barrera intestinal desregulada, un intestino con fugas, podría conducir a resistencia a la insulina y finalmente al desarrollo de diabetes. Reforzar la barrera intestinal sería por consiguiente un nuevo modo terapéutico para prevenir, y quizá también tratar, la diabetes y prevenir la obesidad.

La ingestión de alimentos con bajo índice glucémico, tales como fibras, que se denominan prebióticos, es un modo bien aceptado para potenciar la saciedad ralentizando la digestión intestinal de hidratos de carbono. Los prebióticos son un producto no bacteriano con un efecto beneficioso sobre la microbiota. Actúan como fertilizantes para la microbiota colónica, potenciando de ese modo el crecimiento de organismos comensales beneficiosos tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Sin embargo, las señales de saciedad a partir de la digestión prolongada de hidratos de carbono no son obviamente suficientes.

Hoy en día, más de mil millones de adultos tienen sobrepeso, que es tener un índice de masa corporal (IMC) entre 25-30 kg/m², y más de 300 millones son obesos, con IMC > 30 kg/m², en todo el mundo. Además, el sobrepeso y la obesidad están fuertemente asociados con hiperlipidemia, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular.

Actualmente se dispone de una disponibilidad aumentada de alimentos agradables (es decir, alimentos ricos en grasa y sacarosa) en la sociedad occidental. Esto puede contribuir al aumento global observado en el peso corporal a lo largo de las últimas décadas. Para ayudar a los individuos que padecen sobrepeso y obesidad, es por tanto crucial encontrar un modo de fortalecer las señales de saciedad y amortiguar las señales de hambre. Se ha encontrado que tras la complementación de la dieta con membranas de tilacoides de hojas verdes a alimentos, se ven afectadas varias hormonas del apetito, tales como grelina y colecistoquinina (CCK) (datos no publicados) así como insulina y leptina.

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica, usando la descripción anterior, puede utilizar la presente invención en su grado más completo. Las siguientes realizaciones específicas preferidas, por tanto, deben interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del resto de la divulgación de ningún modo.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a (a) realización/realizaciones específica(s), no se pretende que esté limitada a la forma específica expuesta en el presente documento. Más bien, la invención está limitada sólo por las reivindicaciones adjuntas y, son igualmente posibles realizaciones distintas de las específicas anteriormente dentro del alcance de estas reivindicaciones adjuntas, por ejemplo diferentes de las descritas anteriormente.

En las reivindicaciones, el término “comprende/que comprende” no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Adicionalmente, aunque pueden incluirse características individuales en diferentes reivindicaciones, éstas pueden posiblemente combinarse ventajosamente, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea viable y/o ventajosa.

Además, las referencias en singular no excluyen una pluralidad. Los términos “un”, “una”, “primero”, “segundo” etc. no descartan una pluralidad.

Parte experimental

El objetivo del trabajo experimental descrito a continuación era estudiar los efectos de los tilacoides sobre la microbiota del intestino en ratas sanas, y también sus efectos sobre la insulina en sangre. Se analizó la composición de la microbiota mediante técnicas tanto de cultivo como independientes de cultivo. Recuento de viables de bacterias específicas basándose en sus requisitos metabólicos como técnica de cultivo, y PCR cuantitativa (q-PCR), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) y secuenciación de ADNr 16S como técnicas independientes de cultivo.

Sin embargo, los siguientes ejemplos son meros ejemplos y no debe interpretarse de ningún modo que limitan el alcance de la invención. Más bien, la invención está limitada sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Animales y procedimientos experimentales

Se realizó el estudio en ratas (*Rattus norvegicus*) de la variedad Sprague-Dawley (Mol: SPRD Han; Taconic M & B A/S, Ry, Dinamarca), criadas en condición libre de patógenos específicos con un entorno controlado (20°C ± 1°C, humedad relativa del 50% ± 10%, ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas) y usando un sistema de jaula abierta. Tras 7 días de aclimatización, se mantuvieron individualmente 16 ratas en total y se alimentaron o bien con una dieta de control (8 ratas) o bien con una dieta enriquecida en tilacoides (8 ratas) durante 10 días.

Se extrajeron y purificaron las membranas de tilacoides a partir de brotes de espinacas tal como se describió anteriormente (Emek, SC, Szilagyi A, Akerlund H E, *et al.* (2010) A large scale method for preparation of plant

thylakoids for use in body weight regulation *Prepar biochem & biotech* 40 (1), 13-27; Montelius C, Gustafsson K, Westrom B, *et al.* (2011) Thylakoids reduce glucose uptake and decrease intestinal macromolecular permeability. *Br J Nutr* 106 (6), 836-44).

- 5 Se enriqueció pienso para ratas convencional (R 36, Lantmännen, Estocolmo, Suecia) con o bien sólo aceite de colza (dieta de control), o bien una suspensión de tilacoides-aceite (dieta de tilacoides). Se preparó la dieta de tilacoides mezclando 4 g de polvo de tilacoides (correspondientes a 132 mg de clorofila), 5 g de aceite de colza y 10 g de agua usando una mezcladora Ultraturax. Se calculó la cantidad de tilacoides complementada mediante la adición de 6 mg de clorofila por gramo de ingesta de alimento normal (22 g de alimento/rata/día). Ambas dietas eran isocalóricas, y tenían la distribución de energía (E) del 25% de E de hidratos de carbono, el 60% de E de grasa y el 15% de E de proteínas.

- 15 Se registró el peso corporal cada día durante el tiempo experimental de 10 días. Por la mañana, se proporcionaron 25 g del pienso para ratas normal a cada rata para que comieran libremente durante el día. La tarde siguiente se retiró el pienso para ratas restante y se midió la cantidad que se comió. Entonces se le proporcionaron a cada rata 15 g de la dieta experimental. El 11º día se recogieron muestras fecales en condiciones libres de patógenos específicos por la mañana, antes de realizarse una prueba de tolerancia a la glucosa.

- 20 Se administró una disolución de glucosa al 15% con un volumen del 10% de su peso corporal como una dosis en bolo. Se midió la concentración de glucosa en plasma mediante un pinchazo en la cola en los puntos de tiempo de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min, mientras que se midió la insulina sólo tras 120 minutos. Entonces se anestesió la rata con isoflourano (Schering-Plough a/s, Ballerup, Dinamarca) antes de realizarse una laparotomía. Se recogieron muestras de la mucosa intestinal del íleon, ciego y colon y se colocaron inmediatamente en tubos estériles que contenían 3 ml de medio de congelación. El estudio lo aprobó el Comité ético de revisión de la Universidad de Lund para experimentos con animales y se realizó según las regulaciones de la Comunidad Europea referentes a la protección de animales experimentales.

Análisis de recuentos bacterianos

- 30 Se usaron procedimientos de dilución convencionales para el recuento de viables de lactobacilos, bifidobacterias y *Enterobacteriaceae* en las muestras de mucosa intestinal del íleon, ciego y colon, así como de las muestras fecales. Se sembraron en placa muestras a partir de diluciones apropiadas en agar Rogosa, agar de Wilkins-Chalgren (MW) modificado y agar de bilis y rojo violeta con glucosa (todos de Oxoid, Malmö, Suecia), y se incubaron a 37°C durante 72 h de manera anaerobia y 24 h de manera aerobia antes de que se calcularan las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido o heces.

Secuenciación de ADNr 16S

- 40 Se recogieron aleatoriamente 169 aislados en total (4-6 de cada rata) de muestras de colon e íleon para la secuenciación de ADNr 16S (placas de agar MW: 52 aislados de colon, placas de Rogosa: 53 aislados de colon, placas de Rogosa: 64 aislados de íleon). Como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se usaron extractos celulares en bruto. Se amplificaron los genes de ARNr 16S usando el cebador directo ENV1 y el cebador inverso ENV2 (tabla 1), (Applied Biosystems, Estocolmo, Suecia). La mezcla de reacción PCR de 25 µl en total contenía cebador ENV1 0,4 µM, cebador ENV2 0,2 µM, 2,5 µl de tampón de reacción PCR 10 x (Tris-HCl 500 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, MgCl₂ 20 mM, pH 8,3), trifosfato de desoxirribonucleótido 0,2 µM, 2,5 U de Taq ADN polimerasa FastStart (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y 2 µl de ADN de molde. Se realizó la PCR en un ciclador Eppendorf Master (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) usando el siguiente programa: 95°C durante 3 min, 94°C durante 3 min, 30 ciclos de 94°C de 1 min, 50°C durante 45 s y 72°C durante 2 min, seguido por una extensión adicional de 72°C durante 7 min. Se ejecutaron PCR que contenían sólo reactivos sin ADN de muestra en paralelo como controles de PCR negativos. Se verificaron los productos de PCR (2 µl) en gel de agarosa al 1,5%. Se enviaron los productos de amplificación en placas de 96 pocillos para su secuenciación en MWG-Biotech (Ebersberg, Alemania). Se compararon las secuencias generadas con la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD, EE.UU.).

- 55 Extracción de ADN de heces y biopsias intestinales

- 60 Se descongelaron segmentos fecales e intestinales de íleon y colon y se colocaron en un baño de ultrasonidos (Millipore, Sundbyberg, Suecia) durante 5 min y se agitaron con vórtex durante 2 min antes de centrifugarse (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania) a 12851 g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 190 µl de tampón G2 y 15 µl de proteinasa K (kit tisular de ADN; Qiagen, Hilden, Alemania) a las muestras intestinales. Se añadió tampón PBS (500 µl/50 mg) a las muestras fecales antes de que todas las muestras se incubaran a 56°C durante la noche en un baño de agua con agitación. Tras la centrifugación (Eppendorf 5804R) a 12851 g durante 8 min, se transfirió la disolución a un tubo de muestras de Qiagen. Se extrajo el ADN total y se eluyó en 200 µl de tampón usando el aparato Biorobot EZ1 (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

65

Análisis de PCR cuantitativa (qPCR)

Se estimaron los grupos bacterianos usando ensayos de PCR cuantitativa diferenciados. Cada reacción de ensayo contenía 10 µl de mezcla maestra de PCR QuantiTect® SYBR Green (Qiagen), 0,5 µM de cada cebador (tabla 1), 2 µl de ADN de molde y agua libre de ARNasa hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Se ejecutaron las muestras, los patrones y los controles distintos del molde por duplicado. Se llevó a cabo el ciclado térmico en el aparato Rotor-Gene Q (Qiagen) con un programa de 95°C durante 15 min, seguido por 40 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 15 s, apareamiento a 56°C a 60°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 30 s. Se detectaron los productos fluorescentes en la última etapa de cada ciclo. Se realizó el análisis de la curva de fusión para garantizar una amplificación específica. Se calculó la abundancia absoluta de genes de ARNr 16S basándose en curvas patrón usando la serie Rotor-Gene Q (software 1.7, Qiagen). El límite de detección era de 10² copias/reacción para todos los ensayos. Para construir curvas patrón, se usaron productos clonados a partir de *Lactobacillus plantarum* DSM9843, *Bifidobacterium infantis* DSM15159, *Escherichia coli* CCUG29300 y *Bacteroides prevotella*. Se transfirió la cantidad de un asa de siembra de la suspensión celular (productos clonados) a 10 ml de medio de caldo lisogénico (LB) con ampicilina y se incubó durante la noche a 37°C. Se realizó la extracción de ADN usando QIAprep® (kit de minipreparación, Qiagen). Se midió finalmente la concentración de ADN (ng/µl) con el aparato Nanodrop ND-1000 (Saveen Werner AB, Malmö, Suecia), y se usó para el cálculo del número de copias. Se realizaron series de dilución de diez veces de los productos de ADN en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Se expresaron los números de bacterias como números de copias de amplicón/g de peso en húmedo de heces o tejido.

Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP)

Se amplificaron los genes de ARNr 16S tal como se describió anteriormente con la excepción de que el cebador directo ENV1 se marcó fluorescentemente con un colorante fluorescente (FAM) en el extremo 5'. Se llevaron a cabo reacciones por triplicado para cada muestra y se incluyó un control negativo en todas las ejecuciones de PCR. Se verificaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5%. Se agruparon los productos de PCR de cada muestra y se purificaron adicionalmente usando el kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen). Se eluyó finalmente el ADN en 15 µl de tampón PE y se midió la concentración de ADN mediante el aparato Nanodrop ND-1000 (Saveen Werner AB).

Análisis de T-RFLP

Se digirieron alícuotas (200 ng) de productos de PCR purificados a 37°C (Mastercycler® 5333, Eppendorf) con o bien la enzima endonucleasa de restricción *MspI* durante 5 horas o bien la enzima endonucleasa de restricción *AluI* durante 2 horas (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Se realizó la inactivación calentando a 65°C durante 20 minutos. Tras la digestión, se diluyeron alícuotas de los productos 4 veces con agua estéril en una placa de 96 pocillos. Entonces se enviaron las muestras al laboratorio de ADN (Skåne University Hospital, Malmö, Suecia) para el análisis de T-RFLP en un sistema de electroforesis capilar. Se analizaron los datos de las electroforesis con GeneMapper® (versión 4.0, Applied Biosystems, Foster city, CA, EE.UU.) y se estimaron los tamaños de los fragmentos y las áreas de los picos usando el método Southern (GeneMapper®). El intervalo de tamaño se estableció desde 30 pares de bases (pb) hasta 600 pb. El umbral de amplitud de pico se estableció a 50 unidades de fluorescencia relativa (rfu) para las muestras y 10 rfu para el patrón interno. Se calculó el área de pico total para cada muestra integrando el área de todos los picos en una muestra. Se expresó el área de pico individual como porcentaje del área total.

Cálculos

Se calculó el índice de Shannon-Wiener (H) usando el área de pico relativa expresada como porcentaje del área total para una muestra usando la ecuación:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

en donde p_i es el área relativa expresada como porcentaje y $\ln$ es el logaritmo natural. Se realizó análisis de datos multivariante con análisis de componentes principales (PCA) en SIMCA-P+ (12.0.1, Umetrics, Umeå, Suecia) para revelar las posibles diferencias en la población microbiana entre los grupos.

Estadística

Los valores se presentan como mediana ± EEM o como los percentiles 10, 25, 75 y 90. Las diferencias entre los dos grupos experimentales se evaluaron mediante una prueba de suma de rangos de Mann-Whitney y/o prueba de la t usando Sigma-Stat 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y GraphPad 4.0, (Graphpad Inc, La Jolla, CA, EE.UU.). Se evaluó la incidencia de las bacterias mediante la prueba exacta de Fisher (Quick-Stat versión 2.6, Sapio HB, Suecia). $P < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

Peso corporal, glucosa e insulina en plasma

- 5 Todas las ratas terminaron sus dietas experimentales durante cada noche del estudio. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tilacoides y de control con respecto al peso corporal o la ingesta de pienso para ratas normal durante el experimento de 10 días (datos no mostrados). Sin embargo, la concentración de insulina en plasma a los 120 minutos tras la dosis en bolo era significativamente inferior para el grupo de tilacoides en comparación con el control, tal como se observa en la figura 1. En este caso, se muestra la concentración (pM) de insulina en plasma 120 minutos tras administrarse una dosis en bolo de glucosa a las ratas. Los niveles de insulina eran significativamente inferiores en el grupo de tilacoides en comparación con el grupo de control ($p=0,0082$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos para las concentraciones de glucosa en plasma.

Cuantificación e identificación de bacterias

- 15 Tanto el recuento de viables, tal como se observa en la figura 2, como el análisis de qPCR, tal como se observa en la figura 3, para lactobacilos aumentaron significativamente en la mucosa del íleon en el grupo de tilacoides en comparación con el control. La figura 2 muestra el recuento de viables (UFC/g de tejido) de lactobacilos en la mucosa del íleon, ciego, colon y en heces. La cantidad de lactobacilos en el grupo de tilacoides aumentó significativamente en el íleon en comparación con el grupo de control ($p=0,007$), mientras que no se observaron diferencias con respecto al ciego, el colon y las heces; y la figura 3 muestra los análisis de qPCR del contenido de lactobacilos en la mucosa del íleon, colon y en heces. Los lactobacilos aumentaron significativamente en la mucosa del íleon ($p=0,032$) y disminuyeron significativamente en las heces ($p=0,007$) para el grupo de tilacoides en comparación con el grupo de control. No se observaron diferencias en la mucosa colónica. No se observaron diferencias en las muestras de mucosa de colon o ciego para ambos métodos. Sin embargo, la qPCR, pero no el recuento de viables, mostró una disminución significativa de lactobacilos en las muestras fecales para el grupo de tilacoides, tal como se observa en la figura 3. El análisis de la curva de fusión de la qPCR demostró que los lactobacilos fecales y de la mucosa eran diferentes (datos no mostrados). La secuenciación del ADNr 16S para aislados recogidos aleatoriamente de placas de Rogosa mostró una incidencia significativamente superior de *Lactobacillus reuteri* en el íleon para el grupo de tilacoides en comparación con el control. También se observó una tendencia de aumento de la incidencia de *Lactobacillus reuteri* con tilacoides en el colon, así como una incidencia significativamente inferior de *Lactobacillus johnsonii* en el íleon y el colon (tabla 2).

- Los análisis de bifidobacterias mediante qPCR mostraron un contenido similar para ambos grupos en la mucosa del íleon, el colon y también en las heces (datos no mostrados). Para el recuento de viables se encontró una disminución significativa de bacterias hechas crecer sobre los medios selectivos para bifidobacterias para el grupo de tilacoides. Sin embargo, la identificación con ADNr 16S mostró que otras bacterias Gram-positivas, y no bifidobacterias, aparecían más en las placas de agar (las bifidobacterias representan menos del 25%). Por tanto, las bacterias Gram-positivas, como grupo, disminuyeron significativamente en el grupo de tilacoides en comparación con el control en tanto la mucosa del ciego, el colon como en las heces, tal como se observa en la figura 4. En este caso, se muestra el recuento de viables (UFC/g de tejido) de bacterias hechas crecer sobre los medios selectivos para bifidobacterias en la mucosa del íleon, ciego y colon, y en heces. La cantidad de bacterias disminuyó significativamente en el grupo de tilacoides en ciego ($p=0,0104$), colon ($p=0,0207$) y heces ($P=0,0006$), en comparación con el grupo de control. Se identificaron estas bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus spp*, *Kocuria* y *Bacillus Simplex* (datos no mostrados).

- El análisis de T-RFLP de muestras de mucosa de íleon y colon, con la endonucleasa de restricción *MspI*, dio como resultado una ausencia de diferencia en los grupos bacterianos entre los grupos, tal como se observa con el análisis de componentes principales (PCA). Sin embargo, en las muestras de heces, se separaron completamente entre sí grupos bacterianos específicos para el grupo de tilacoides en comparación con el control, tal como se observa en la figura 5. En este caso, se muestra el análisis de componentes principales (PCA) de los datos de T-RFLP de la digestión con *MspI* de mucosa de colon e íleon mucosa y heces en los grupos de control y de tilacoides. En las muestras fecales (□ = heces del grupo de control, ■ = heces del grupo de tilacoides) puede observarse una diferencia en grupos bacterianos específicos, que están completamente separados entre sí. Además, mediante la endonucleasa de restricción *AluI*, mostrada mediante PCA también, se encontraron comunidades bacterianas separadas en las muestras fecales de los grupos de tilacoides y de control respectivamente, tal como se observa en la figura 6. En este caso, se observa un análisis de componentes principales (PCA) de los datos de T-RFLP de la digestión con *AluI* de muestras fecales en los grupos de control y de tilacoides. Puede observarse una diferencia entre las muestras fecales de los grupos de control (□) y de tilacoides (■), ya que están separados entre sí.

- No se observaron diferencias significativas entre los grupos de tilacoides y de control en los análisis de *Enterobacteriaceae* y *Bacteroides* mediante tanto recuento de viables como qPCR (datos no mostrados), ni para la diversidad bacteriana tras los cálculos mediante el índice de diversidad de Shannon-Wiener (datos no mostrados).

65 Discusión

Este estudio dio como resultados dos hallazgos principales. En primer lugar, las complementaciones con tilacoides de la dieta durante diez días afectan a la sensibilidad a la insulina en ratas. Se encontró una concentración inferior de insulina para las ratas alimentadas con tilacoides en la sangre 120 minutos tras una dosis en bolo de glucosa, aun cuando no se observaron diferencias de las concentraciones de glucosa en plasma entre las dietas. Al usar cámaras de difusión, un modelo *in vitro* para la captación y permeabilidad de la pared intestinal, se ha mostrado que los tilacoides prolongan la captación de metil-glucosa de un modo dependiente de la dosis, así como provocan un impedimento estérico de tilacoides que cubren el lado de la mucosa del intestino. Una prolongación de la captación de glucosa *in vivo* daría como resultado hipotéticamente una concentración inferior de insulina secretada. Sin embargo, no se observaron diferencias en la glucosa en este estudio, pero todavía la concentración de insulina tras 120 min era significativamente inferior para el grupo de tilacoides. En los últimos años se ha propuesto que un "intestino con fugas", es decir un aumento de la permeabilidad del intestino, puede conducir a resistencia a la insulina y finalmente al desarrollo de diabetes. Una explicación a las concentraciones disminuidas de insulina podría ser por tanto el impedimento estérico provocado por los tilacoides, que provoca que la pared intestinal se refuerce. Es necesario investigar este fenómeno adicionalmente, ya que podría abrir nuevas vías terapéuticas para prevenir, y quizá también tratar, la diabetes mellitus.

En segundo lugar, los tilacoides modulan la microbiota de varios modos. Las concentraciones de lactobacilos en el íleon aumentaron, y al mismo tiempo los lactobacilos disminuyeron en las heces, lo que sugiere que los tilacoides provocan un aumento de la colonización del íleon por lactobacilos. Se sabe que cepas de lactobacilos tienen la capacidad de colonizar la mucosa en altas concentraciones, apoyando el hallazgo. Una subespecie común de lactobacilos en la rata es *Lactobacillus reuteri*, que aumentó específicamente en el grupo de tilacoides en comparación con el control. Además, se observó una colonización desviada de bacterias Gram-positivas en colon y heces para grupo de tilacoides, sin embargo las concentraciones de bifidobacterias no diferían entre los grupos. También se observó modulación por los tilacoides de la microbiota mediante el análisis de T-RFLP ya que se encontraron grupos distintos de poblaciones bacterianas en el grupo de tilacoides pero no en el control.

Estudios previos han notificado que algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden ser importantes para la regulación del peso corporal, actuando como factor contra la obesidad. Además, se ha propuesto que los sujetos con sobrepeso tienen un crecimiento aumentado de algunas bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, en comparación con sujetos delgados. La eliminación de bacterias Gram-positivas perjudiciales, y la composición global de la flora bacteriana, parece por tanto ser importante para el equilibrio de energía. Además, se ha mostrado que *Lactobacillus reuteri* tiene efectos promotores de la salud restringiendo el crecimiento de bacterias perjudiciales, y ha encontrado que otras especies de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus gasseri*, reducen la adiposidad e inflamación asociadas con la obesidad. La disminución observada de bacterias potencialmente perjudiciales como especies de *Staphylococcus*, *Kocuria* y *Bacillus simplex* puede ser o bien un efecto directo de los tilacoides, o bien un efecto secundario del aumento de la colonización de *Lactobacillus reuteri*.

Todos los hallazgos anteriores muestran que la adición de tilacoides a la dieta durante diez días en ratas afecta a la microbiota de varios modos. Puesto que se ha sugerido que la composición de la microbiota está implicada en la gestión del peso corporal, y se ha mostrado anteriormente que los tilacoides reducen el peso corporal, puede plantearse la hipótesis de que algunos efectos de la pérdida de peso observada en estudios anteriores pueden deberse a desviaciones de la microbiota.

Para concluir, se propone que los presentes hallazgos indican que los tilacoides regulan la microbiota del intestino, conduciendo a un aumento de la colonización de *Lactobacillus*, y una disminución del crecimiento de bacterias Gram-positivas potencialmente perjudiciales. Por tanto, los tilacoides son un agente prebiótico. Los tilacoides también aumentan la sensibilidad a la insulina, posiblemente reforzando la función de la barrera intestinal.

Tabla 1 - Cebadores usados en una realización

Grupo diana	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>Lactobacillus</i>	Lact-16S-F: GGAATCTTCCACAATGGACG (SEQ ID 1) Lact-16S-R: CGCTTTACGCCCAATAAATCCGG (SEQ ID 2)	216
<i>Bifidobacterium</i>	Bifido-F: TCGCGTCYGGTGTGAAAG (SEQ ID 2) Bifido-R: CCACATCCAGCRTCCAC (SEQ ID 4)	243
<i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457-F: CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC (SEQ ID 5) Eco1652-R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC (SEQ ID 6)	195

<i>Bacteroides prevotella</i>	qBacPre-F: TTTATTGGGTTTAAAGGGAGGGTA (SEQ ID 7) qBacPre-R: CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA (SEQ ID 8)	166
Genes de ARNr 16S (ENV1, ENV2)	E-coli 8-27-F: AGAGTTTGATITGGCTCAG (SEQ ID 9) E-coli 1511-1492R: CGGITACCTTGTTACGACTT (SEQ ID 10)	

Tabla 2. Incidencia de diferentes especies de *Lactobacillus* encontradas mediante secuenciación de ADNr 16S de aislados recogidos aleatoriamente de placas de Rogosa de muestras de mucosa colónica y del íleon. $P < 0,05$ se consideró un aumento significativo en el grupo de tilacoides en comparación con el control

	Grupo de control		Grupo de tilacoides		
	Recuentos	%	Recuentos	%	Valor de p
ÍLEON					
<i>Lactobacillus reuteri</i>	11/29	37,9	28/31	90	0,03
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	17/29	58,6	3/31	10	0,003
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1/29	3,4	0/31	0	ns
<i>Lactobacillus ruminis</i>	0/29	0	0/31	0	ns
COLON					
<i>Lactobacillus reuteri</i>	10/25	40	21/25	84	0,09
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	13/25	52	2/25	8	0,01
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0/25	0	1/25	4	ns
<i>Lactobacillus ruminis</i>	2/25	8	1/25	4	ns

5 ns = no significativo

Lista de secuencias

<110> Thylabisco AB

<120> COMPOSICIÓN PREBIÓTICA DE TILACOIDES

<130> W87940003

<150> Documento SE1251019-4

<151> 11-09-2012

<160> 10

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> *Lactobacillus*

<220>

<221> fuente

<222> 1..20

<223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="*Lactobacillus*"

<400> 1

ggaatcttc acaatggacg 20

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> *Lactobacillus*

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Lactobacillus"
 5
 <400> 2
 cgctttacgc ccaataaatc cgg 23
 <210> 3
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Bifidobacterium
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Bifidobacterium"
 <400> 3
 20 tcgcgctcygg tgtgaaag 18
 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Bifidobacterium
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..17
 30 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Bifidobacterium"
 <400> 4
 ccacatccag crtccac 17
 35 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Enterobacteriaceae
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Enterobacteriaceae"
 45 <400> 5
 cattgacgtt acccgagaa gaagc 25
 <210> 6
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Enterobacteriaceae
 <220>
 <221> fuente
 55 <222> 1..21
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Enterobacteriaceae"
 <400> 6
 60 ctctacgaga ctcaagcttg c 21
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Bacteroides <género>
 65 <220>

```

<221> fuente
<222> 1..24
<223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Bacteroides <género>"

5  <400> 7
   ttattgggt ttaaaggag ggta      24

   <210> 8
   <211> 25
10  <212> ADN
   <213> Bacteroides <género>

   <220>
   <221> fuente
15  <222> 1..25
   <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Bacteroides <género>"

   <400> 8
20  caatcggagt tctcgtgat atcta    25

   <210> 9
   <211> 20
   <212> ADN
   <213> Escherichia coli

25  <220>
   <221> fuente
   <222> 1..20
   <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Escherichia coli"

30  <400> 9
   agagttgat nntggctcag      20

   <210> 10
35  <211> 20
   <212> ADN
   <213> Escherichia coli

   <220>
40  <221> fuente
   <222> 1..20
   <223> /tipo_mol="ADN no asignado"/organismo="Escherichia coli"

   <400> 10
45  cggntacctt gttacgactt      20

```

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de una composición que comprende tilacoides aislados, enriquecidos, o partes de los mismos, como agente prebiótico.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho uso es para promover bacterias del ácido láctico en los intestinos, tales como el íleon, de un mamífero.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que dichas bacterias que van a promoverse son *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición comprende además bacterias probióticas, tales como *Bifidobacterium*, por ejemplo *Bifidobacterium infantis*, o *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus plantarum*.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los tilacoides, o partes de los mismos, se enriquecen a partir de hojas verdes o algas verdes.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que dichos tilacoides, o partes de los mismos, son tilacoides, o partes de los mismos, enriquecidos a partir de espinacas.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido en clorofila en la composición es de desde 1 mg hasta 75 mg de clorofila por g de composición.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho uso es para promover bacterias del ácido láctico en los intestinos de un mamífero; y en el que la dosis diaria de tilacoides que va a administrarse es de 2,4 mg a 240 mg de tilacoides por kg de masa corporal del mamífero.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición es parte de un producto alimenticio.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición es una composición nutracéutica oral que comprende una emulsión de aceite en agua fisiológicamente tolerable que comprende los tilacoides, o partes de los mismos.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que la composición comprende del 20 al 30% en peso de tilacoides y del 20 al 30% en peso de aceite.
12. Composición que comprende tilacoides aislados, enriquecidos, o partes de los mismos, y bacterias probióticas, en la que el contenido en clorofila en la composición es de desde 1 mg hasta 75 mg de clorofila por g de composición.
13. Composición según la reivindicación 12, en la que las bacterias probióticas son *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus plantarum*, o *Bifidobacterium*, por ejemplo *Bifidobacterium infantis*.
14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en la que los tilacoides se enriquecen a partir de hojas verdes o algas verdes; preferiblemente a partir de espinacas.
15. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que la composición es una composición farmacéutica o nutracéutica oral que comprende una emulsión de aceite en agua fisiológicamente tolerable que comprende tilacoides; preferiblemente la composición comprende del 20 al 30% en peso de tilacoides y del 20 al 30% en peso de aceite.

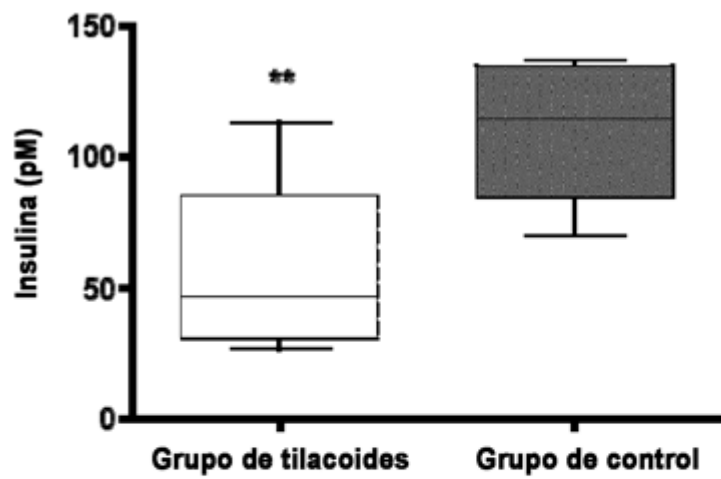


Fig. 1

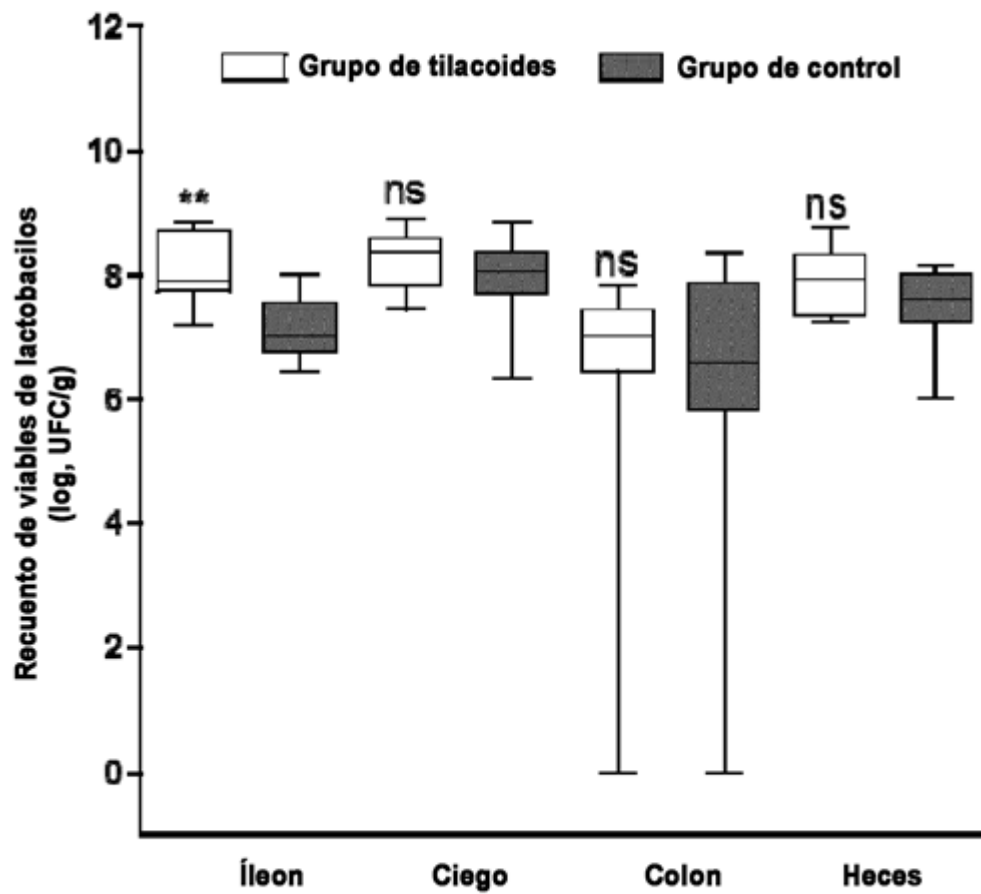


Fig. 2

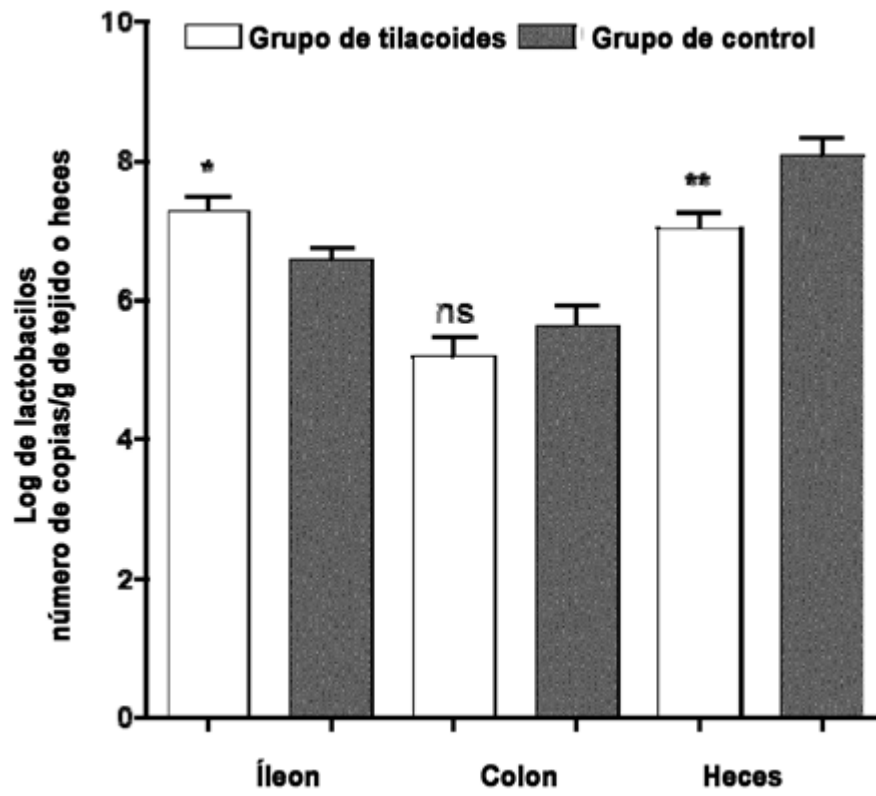


Fig. 3

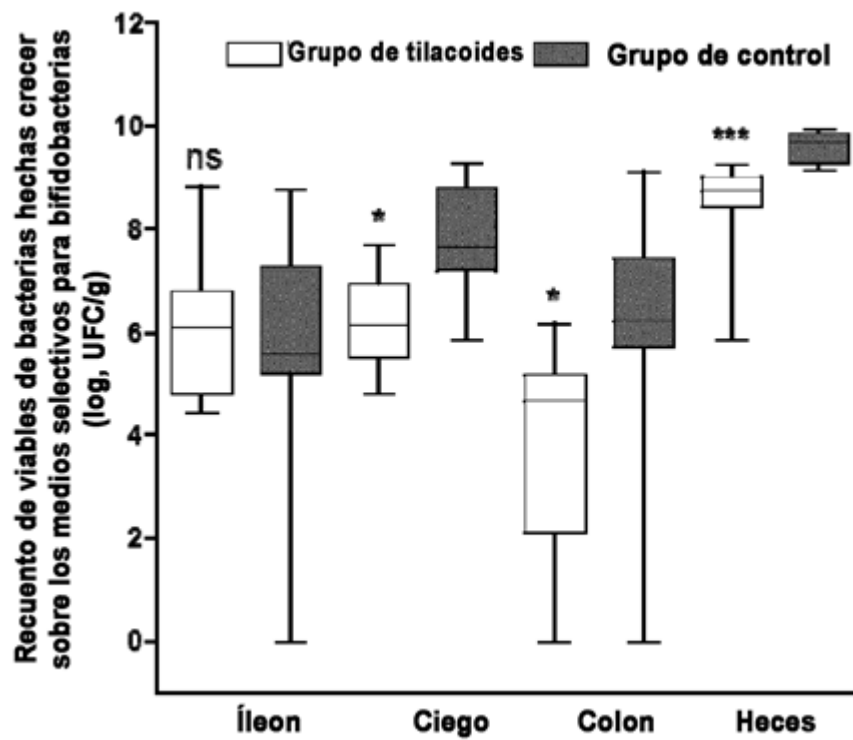
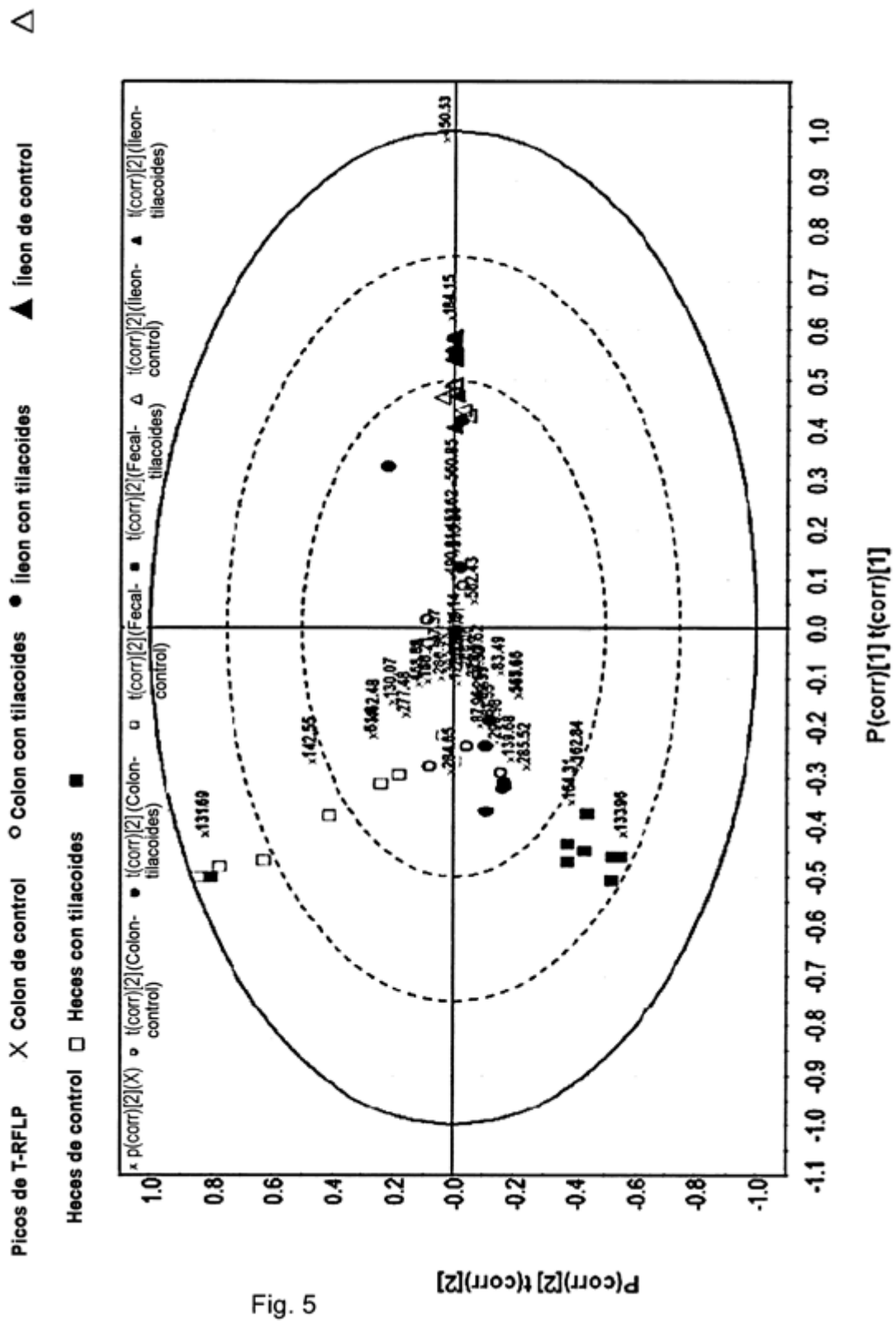


Fig. 4



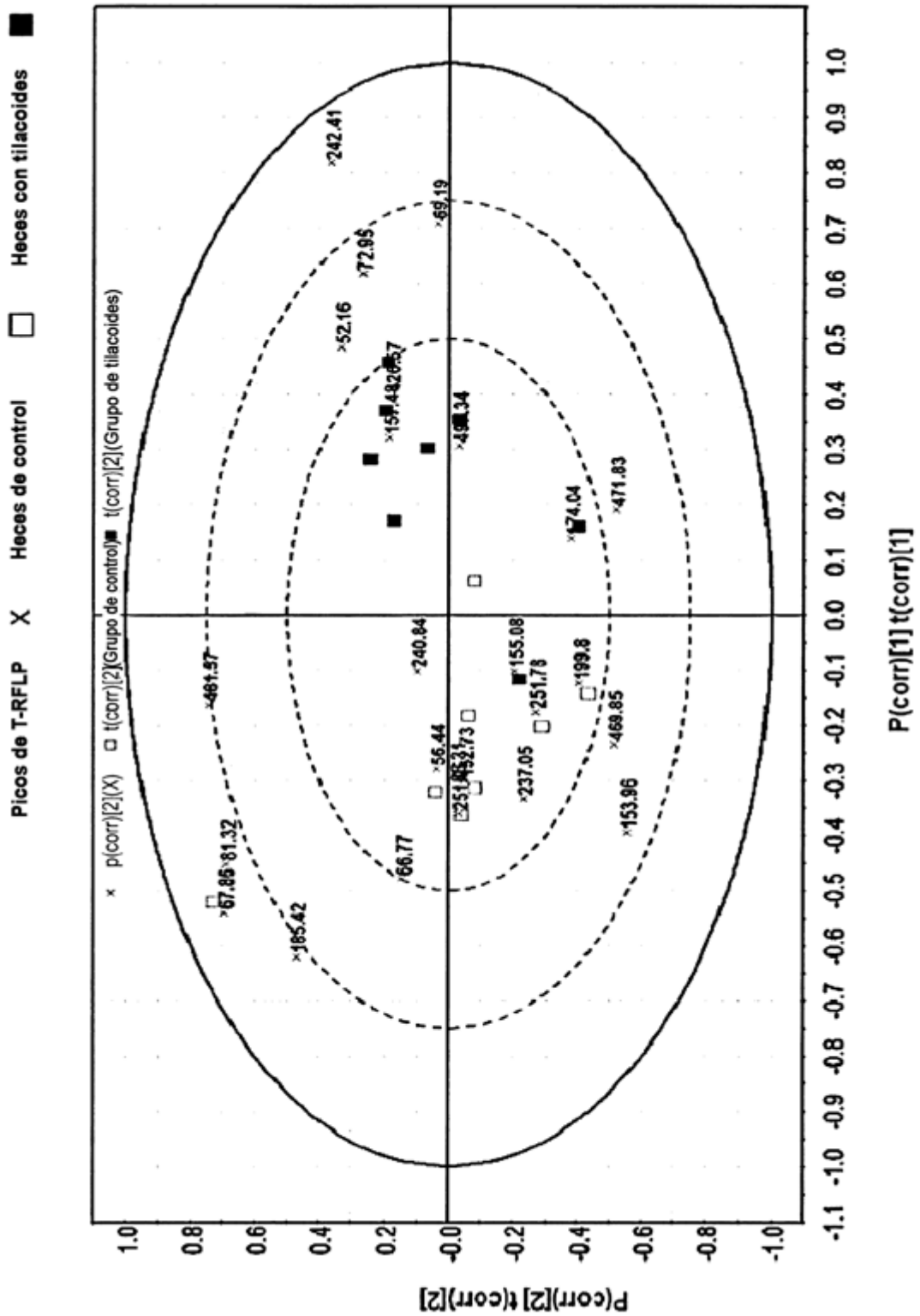


Fig. 6