

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 162**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135	(2006.01)
A23L 33/21	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)
C12R 1/01	(2006.01)
A21D 13/02	(2006.01)
A21D 13/04	(2007.01)
A23L 7/117	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2014 PCT/SE2014/050650**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14196913**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2014 E 14808269 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3016527**

54 Título: **Tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal usando al menos una cepa bacteriana de Prevotella**

30 Prioridad:

03.06.2013 SE 1350675

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2018

73 Titular/es:

**PROPREV AB (100.0%)
Halalid 22
254 40 Helsingborg, SE**

72 Inventor/es:

**BJÖRCK, INGER;
NILSSON, ANNE;
BÄCKHED, FREDRICK y
KOVATCHEVA-DATCHARY, PETIA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 692 162 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

Tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal usando al menos una cepa bacteriana de *Prevotella*

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Un producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal que comprende al menos una cepa bacteriana aislada a partir de las especies *Prevotellaceae*, donde la cepa se selecciona de entre el grupo que consiste en *Prevotella copri* y *Prevotella ruminicola*. El producto puede ser un producto alimentario.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Muchas empresas de alimentos e ingredientes dentro del campo han incrementado sus actividades para identificar ingredientes así como productos alimentarios cuyo uso proporcionará efectos beneficiosos para la salud en el consumidor además de proporcionar nutrientes esenciales, denominados alimentos funcionales. Algunos ejemplos son microorganismos viables, denominados probióticos, que han mostrado beneficios concretos para la salud en la salud del aparato digestivo y que se incluyen entre los productos alimentarios como por ejemplo diferentes productos lácteos como leche fermentada, yogur, así como diferentes bebidas. Otros ejemplos de productos alimentarios con beneficios para la salud son alimentos que contienen fibra dietética (FD), hidratos de carbono prebióticos, estanol, ácidos grasos omega 3, vitaminas, polifenoles, alimentos con bajo impacto glucémico, etc.

20

Desde la perspectiva de la salud pública existe actualmente una necesidad especial de desarrollar nuevos productos alimentarios que puedan actuar para mejorar el metabolismo de la glucosa y reducir la obesidad y los trastornos relacionados. El deterioro del metabolismo de la glucosa se asocia también con un deterioro del funcionamiento cognitivo. La prevalencia de trastornos del estilo de vida relacionados tales como obesidad y diabetes tipo 2 (DT2) está creciendo globalmente, y se ha indicado que el número de personas que sufren DT2 en todo el mundo aumentará desde los actuales 366 millones hasta alcanzar 552 millones en el año 2030. Así pues la necesidad de estrategias preventivas es urgente. La prevención basada en la dieta se reconoce como la estrategia más eficiente en la lucha contra la enfermedad relacionada con el estilo de vida, y los estudios epidemiológicos respaldan que por ejemplo una ingesta elevada de cereales integrales y legumbres es beneficiosa para la prevención y abordaje de la diabetes, y para el control del peso.

25

30

La obesidad es un factor importante que contribuye a los trastornos cardiometabólicos, pero los mecanismos subyacentes no se conocen totalmente. Sin embargo, una característica clave parece ser la "inflamación metabólica" y la activación del sistema innato. Los patrones dietéticos como por ejemplo los alimentos ricos en IG y los alimentos densos en energía, se consideran cada vez más de valor predictivo del riesgo futuro de enfermedades cardiovasculares. En la actualidad, existe un cuerpo creciente de conocimientos que respalda la importancia de una microbiota sana del aparato digestivo en la lucha contra los trastornos cardiometabólicos y el ecosistema del aparato digestivo se está reconociendo como un modulador del metabolismo, el apetito y la regulación del peso del hospedador. Se ha sugerido que el "diálogo" metabólico entre la microbiota del aparato digestivo y los tejidos periféricos se regula a través de la fermentación en el aparato digestivo de los componentes indigeribles de la dieta, tales como hidratos de carbono indigeribles.

45

Buena parte de las evidencias relativas al papel de los sustratos fermentables en el aparato digestivo en el metabolismo del hospedador proceden de estudios con inulina que muestran los beneficios en el metabolismo de la glucosa y la regulación del peso en modelos experimentales animales.

50

Recientemente se ha documentado la importancia de la microbiota del aparato digestivo en estudios basados en trasplante fecal de donantes humanos magros a sujetos que sufren síndrome metabólico (SMet); representando el SMet una agrupación de factores de riesgo que identifican a sujetos en alto riesgo de desarrollar DT2 y enfermedades cardiovasculares. El trasplante fecal produjo un aumento en la sensibilidad a la insulina en los sujetos con DT2 6 semanas después de la infusión fecal. Estos nuevos hallazgos son estimulantes y se suman a los conocimientos sobre la importancia de una microbiota sana. Sin embargo, los trasplantes fecales pueden ser complicados y comportan riesgos.

55

Así, se necesitan estrategias para aumentar el número de bacterias beneficiosas, y promover un equilibrio saludable de la composición microbiana del aparato digestivo por otros medios. Hasta la fecha la mayoría de los estudios que muestran aumentos de las bacterias beneficiosas después de manipulación de la dieta son transversales y, por

60

tanto, no revelan causalidad. Esto puede conseguirse suministrando bacterias viables a través de enemas, o a través de productos alimentarios, que incluyen los llamados probióticos, o por el suministro en la dieta de cantidades suficientes de sustratos en el colon como, por ejemplo, sustratos prebióticos específicos en la dieta habitual, o combinando probióticos y prebióticos.

5

A pesar de los esfuerzos de la industria alimentaria por desarrollar nuevos productos alimentarios con propiedades saludables mejoradas o productos del tipo de alimentos funcionales la obesidad sigue constituyendo un problema de gran magnitud, al igual que el aumento de la población de sujetos con SMet o DT2. Estas dolencias se tratan normalmente con fármacos. Sin embargo, si a los sujetos sanos o a las personas en riesgo de enfermedad pudieran ofrecérseles productos alimentarios diseñados específicamente para contrarrestar los procesos patológicos tempranos, se prevendría el desarrollo de la obesidad y el SMet, incluido el deterioro del funcionamiento cognitivo. Por otra parte, dichos productos alimentarios también podrían facilitar el abordaje de la enfermedad en pacientes con enfermedad manifiesta relacionada con SMet.

10

15 HAYASHI H. Y COL.: "PREVOTELLA COPRI SP AND PREVOTELLA STERCOREA SP. NOV. ISOLATED FROM HUMAN FAECES", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 57, n.º 5, 2007, páginas 941-946, describe el aislamiento de una cepa de *P. copri* a partir de heces humanas.

El documento WO-2011/053653 describe preparaciones de *Prevotella histicola* para su uso como un medicamento oral o un suplemento dietético principalmente para tratar dolencias autoinmunitarias tales como artritis y esclerosis múltiple.

20

El documento WO-2013/182038 se refiere a composiciones y procedimientos para mejorar las poblaciones de microbiota del aparato digestivo, incluyendo ácidos grasos de cadena corta que producen bacterias.

25

El documento WO-2012/142605 describe composiciones que comprenden una combinación preseleccionada de microorganismos que son útiles en el tratamiento de un trastorno, dolencia o enfermedad intestinal tales como enfermedad inflamatoria intestinal.

El documento WO-2013/053836 describe una composición que comprende microbiota intestinal humana cultivada en condiciones anaerobias, que incluye bacterias de *Prevotella* para su uso en el tratamiento de enfermedades, que incluyen enfermedad inflamatoria intestinal, Alzheimer, obesidad y diabetes tipo II.

30

RESUMEN DE LA INVENCION

35

La invención se refiere al hallazgo singular de que las especies que pertenecen a *Prevotellaceae* tienen efectos beneficiosos en la salud del hospedador. Las especies pertenecientes a *Prevotellaceae* pueden usarse en cualquier clase de productos alimentarios, o como ingrediente en un producto alimentario, tal como un probiótico con o sin hidratos de carbono indigeribles añadidos, administrado confinado en una cápsula, en forma de enema o como un supositorio para mejorar la salud del consumidor.

40

En un primer aspecto la invención se refiere a un producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal que comprende al menos una cepa bacteriana aislada a partir de las especies *Prevotellaceae*, donde la cepa se selecciona de entre el grupo que consiste en *Prevotella copri* y *Prevotella ruminicola*.

45

Con dicho producto es posible por primera vez proporcionar nuevos ingredientes alimentarios saludables así como productos alimentarios, cápsulas, enemas o supositorios que podrían ser útiles en el tratamiento de una serie de enfermedades mencionadas anteriormente para mejorar el metabolismo de la glucosa y reducir los factores de riesgo en el síndrome metabólico. El producto puede proporcionarse conjuntamente con una o más fibras dietéticas y/o almidón resistente.

50

Se describirán en más detalle las ventajas y objetivos adicionales con la presente invención, entre otros con referencia a los dibujos adjuntos.

55

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Respuestas de glucosa en sangre e insulina sérica (cambios incrementales (Δ)) al desayuno estandarizado después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT), respectivamente. El consumo de PC produjo menores concentraciones máximas de glucosa e insulina posprandial

60

($P<0,01$, y $P<0,001$, respectivamente) y menores áreas bajo las curvas de glucosa e insulina (0-150 min: $P<0,01$ y $P<0,001$, respectivamente) en comparación con el PT de referencia (n=39).

5 **Figura 2.** Respuestas de glucosa en sangre e insulina sérica (cambios incrementales (Δ)) al desayuno estandarizado después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT), respectivamente. El consumo de PC produjo menores concentraciones máximas de glucosa e insulina posprandial ($P<0,05$ para las dos), y menores áreas bajo las curvas de glucosa e insulina (0-150 min: $P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente) en comparación con el PT de referencia (n=20).

10 **Figura 3.** Expulsión de H₂ exhalado en el desayuno estandarizado, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT), respectivamente. El consumo de PC produjo un aumento significativo de H₂ exhalado en comparación con el PT de comida de referencia (concentración media durante el día del experimento, $P<0,01$ (n=20).

15 **Figura 4.** Concentraciones de PYY en plasma en el desayuno estandarizado, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT), respectivamente. El consumo de PC produjo un aumento significativo de concentraciones plasmáticas de PYY (0-120 min), en comparación con tres días de ingesta de PT (efecto principal durante el día del experimento, $P<0,05$ (n=20).

20 **Figura 5.** Respuestas de glucosa en sangre en respondedores (n=10) y no respondedores (n=10) después del desayuno estandarizado, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) o pan de trigo (PT), respectivamente. En el grupo de respondedores, tres días de consumo de PC produjeron respuestas de glucosa significativamente menores, en comparación con tres días de ingesta de PT (área bajo la curva 0-150 min, $P<0,0001$). No se observaron mejoras en la tolerancia a la glucosa (área bajo la curva) del PC en el grupo de no
25 respondedores.

Figura 6. Respuestas de insulina sérica en respondedores (n=10) y no respondedores (n=10) después del desayuno estandarizado, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT), respectivamente. En el grupo de respondedores, tres días de consumo de PC produjeron respuestas de insulina
30 significativamente menores, en comparación con tres días de ingesta de PT (área bajo la curva 0-120 min, $P<0,01$). No se observaron mejoras del PC en el grupo de no respondedores.

Figura 7. Respuestas de glucosa en sangre en respondedores (n=7) y no respondedores (n=7) después del desayuno estandarizado, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT),
35 respectivamente. En el grupo de respondedores, tres días de consumo de PC produjeron respuestas de glucosa significativamente menores, en comparación con tres días de ingesta de PT (área bajo la curva 0-150 min, $P<0,0001$). No se observaron mejoras en la tolerancia a la glucosa (área bajo la curva) del PC en el grupo de no respondedores.

40 La **Figura 8** muestra la variación taxonómica de las principales especies microbianas del aparato digestivo a través de los diferentes grupos que intervienen en el estudio, los datos se han generado después de análisis de pirosecuenciación 454. Las seis barras representan los grupos participantes en el estudio: R-control (respondedores de control), R-PT (respondedores de pan de trigo), R-PC (respondedores de pan de grano de cebada). NR=no
45 respondedores. Control significa que las muestras han sido recodidas sin consumo de panes de prueba (PC o PT).

La **Figura 9** muestra que los ratones monocolonizados con *Prevotella copri* (n=6) durante dos semanas muestran una mejora en la tolerancia a la glucosa oral y menores niveles de insulina sérica en comparación con ratones monocolonizados con *Bacteroides thetaiotaomicron* (n=6) ($P=0,0076$). Los ratones bicolonizados con *P. copri* y *B. thetaiotaomicron* (n=7) también muestran mejor tolerancia a la glucosa oral en comparación con los ratones
50 monocolonizados con *B. thetaiotaomicron* ($P=0,0426$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

DEFINICIONES

55

En el contexto de la presente solicitud y la presente invención, se aplican las siguientes definiciones:

El término "síndrome metabólico" o SMet describe la agrupación de factores de riesgo tales como obesidad, hiperlipidemia, hipertensión e intolerancia a la glucosa, que identifica a sujetos en alto riesgo de desarrollar diabetes
60 tipo 2 (DT2) y enfermedades cardiovasculares. El término "probiótico" describe un microorganismo viable, tal como

bacterias que tras la colonización en el aparato digestivo confieren un beneficio para la salud del hospedador.

5 El término “fibra dietética” o “FD” describe hidratos de carbono que incluyen tres o más monómeros que resisten la digestión y la absorción en el intestino delgado, y son fermentados total o parcialmente en el colon por bacterias del aparato digestivo. En la presente solicitud el término FD se refiere a polisacáridos indigeribles no derivados del almidón tales como beta-glucanos, arabinosilanos, celulosa, oligosacáridos, fructanos, pectina, goma guar. En la definición de FD se incluyen también sustratos indigeribles que están asociados estrechamente con polisacáridos indigeribles en la planta (por ejemplo, fracciones de proteínas, compuestos fenólicos, lignina, ceras, fitatos, fitoesteres indigeribles).

10 El término “almidón resistente” (AR) describe productos de almidón y de degradación de almidón que escapan a la digestión en el intestino delgado de individuos sanos, es decir, FD derivadas de almidón. El AR puede suministrar algunos de los beneficios de las FD insolubles y algunos de los beneficios de la FD soluble. El AR puede proceder de almidón encapsulado botánicamente, almidón no gelatinizado o almidón retrogradado.

15 El término “almidón retrogradado” describe la recristalización de moléculas de almidón después de cocinar y enfriar, que produce estructuras resistentes a la digestión y la absorción en el intestino delgado.

20 El término “almidón encapsulado botánicamente” describe un almidón que está atrapado físicamente en la matriz del alimento, o en células botánicas que lo hacen inaccesible para las enzimas digestivas en el intestino delgado.

25 El término “almidón no gelatinizado” describe gránulos de almidón no procesado que aparecen en su forma natural, tales como almidón en patatas no cocinadas o cereales no cocinados, o gránulos de almidón que han resistido la gelatinización tras el procesamiento, para producir una estructura cristalina intacta indigerible retenida.

El término “prebiótico” describe componentes alimentarios indigeribles, preferentemente hidratos de carbono indigeribles tales como FD y AR, que estimulan el crecimiento y/o la actividad de bacterias en el sistema digestivo de formas asociadas con beneficios para la salud.

30 El término “simbióticos” describe una combinación de probiótico y prebiótico.

El término SCFA describe ácidos grasos de cadena corta producidos a partir de la fermentación microbiana en el aparato digestivo de hidratos de carbono indigeribles.

35 El término “encapsulado” describe que la cepa *Prevotella* puede encapsularse para protegerse del entorno (por ejemplo, oxígeno y acidez) y así permanecerá intacta y conservará las cualidades y actividades en el producto alimentario y durante el paso a través del aparato digestivo. Las técnicas usadas para encapsulación pueden basarse por ejemplo en películas comestibles basadas en alginato, goma guar, goma de xantano, goma garrofín, goma de carragenano u otras fibras dietéticas, caseína, prebióticos o almidón, emulsiones de Pickering, etc. Pueden aplicarse diferentes tecnologías de encapsulación, algunas de las cuales son descritas por R Vidhyalakshmi y col., 2009 [1].

45 El término “respondedores” describe a sujetos humanos que después de consumir el producto prebiótico con grano de cebada recibieron una mejora de la regulación de la glucosa.

El término “no respondedores” se refiere a sujetos humanos que después de consumir el producto prebiótico con grano de cebada no muestran evidencias de mejora de la regulación de la glucosa.

50 El término “enema” se usa para describir un procedimiento por el cual una solución que contiene la *Prevotella spp* se introduce con o sin sustrato de prebiótico en el aparato digestivo a través del recto para modular de forma beneficiosa la composición microbiana del aparato digestivo.

55 El término inflamación metabólica se usa para describir: inflamación crónica de grado bajo orquestada por células metabólicas en respuesta a un exceso de nutrientes y energía asociado con resistencia a la insulina y disfunción metabólica.

LA INVENCION

60 Se ha encontrado que la FD y el AR intrínsecos en productos de grano de cebada poseen efectos beneficiosos con respecto a los marcadores de riesgo cardiometabólico y la regulación del apetito, lo que probablemente sucede

también para otros grupos de fibras. Por ello, la tolerancia a la glucosa y el ahorro de insulina mejoraron en una perspectiva temporal de 11-14 h después de la ingesta de productos de grano de cebada, que supone una perspectiva de toda la noche desde una cena con grano de cebada hasta el posterior desayuno estandarizado en sujetos sanos.

5

Otro hallazgo importante fue un aumento en las concentraciones plasmáticas de GLP-1 y otras hormonas reguladoras del apetito, y una disminución de la ingesta de energía voluntaria, mientras simultáneamente se reducía el hambre percibida. Además, los hidratos de carbono indigeribles de cebada redujeron los marcadores de inflamación metabólica. Un estado de aumento de la inflamación metabólica es un factor de riesgo cardiometabólico reconocido, lo que convierte a los conceptos alimentarios que reducen la inflamación metabólica en prometedores para la prevención del SMet y la DT2. Se observó un aumento en la producción de hidrógeno exhalado (marcador de fermentación en el aparato digestivo) y SCFA, indicativo del aumento de la actividad de fermentación en el aparato digestivo después de la ingesta de hidratos de carbono indigeribles de cebada. Se encontraron asociaciones significativas entre los marcadores de fermentación en el aparato digestivo y la mejora de la regulación de la glucosa, lo que demuestra efectos mediados por prebióticos de los productos a base de grano de cebada en los marcadores de riesgo metabólico, es decir, los efectos beneficiosos observados están relacionados con mecanismos derivados de fermentación bacteriana en el aparato digestivo de hidratos de carbono indigeribles. Los SCFA producidos durante la fermentación de la microbiota en el aparato digestivo proporcionan energía a los enterocitos en el colon, y además los SCFA actúan también como moléculas de señalización.

20

Por consiguiente, se ha demostrado que los SCFA producidos por fermentación bacteriana pueden desencadenar cascadas de señalización a través de su acción en receptores de SCFA en células L, lo que produce un aumento de la liberación en el aparato digestivo de pépticos tales como GLP-1 y PYY (modelo *in vitro*). Los resultados obtenidos demuestran claramente un potencial prebiótico de FD y AR en productos de cereales tales como los productos de grano de cebada

25

Sorprendentemente, en sujetos sanos se ha descubierto que los beneficios observados después de consumir productos de grano de cebada (pan) en relación con los marcadores de riesgo cardiometabólico y la regulación del apetito podrían asociarse con una alteración específica de la microbiota del aparato digestivo, y los autores de la invención han identificado un aumento en las especies *Prevotella*. Además, la transferencia de una cepa de *Prevotella* específica (*Prevotella copri*) a ratones sin gérmenes mejoró la tolerancia a la glucosa en los animales. Los resultados ponen de relieve un efecto probiótico de la cepa bacteriana identificada con beneficios en el metabolismo de la glucosa. Uno de los criterios para selección de cepas de *Prevotella* fue la aparición de glucósido hidrolasas, necesarias para la degradación de azúcares complejos. Todas las cepas seleccionadas tienen glucósido hidrolasas, y son capaces de degradar un rango importante de azúcares complejos. Un criterio adicional fue que las cepas seleccionadas produjeran succinato como productos principales de la degradación de los azúcares complejos. Los ejemplos de las cepas fueron *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*, *Prevotella histicola*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella Bryantii 25A* y *Prevotella distasonis*. También son posibles mezclas de una o más de las diferentes cepas, tales como 2, 3, 4, 5 o 6 cepas diferentes. La cepa puede estar presente en una cantidad de 10^7 o más tal como 10^7 , 10^8 , 10^9 o incluso en cantidades superiores.

40

Además, los resultados revelan por primera vez que los sustratos prebióticos investigados, es decir, FD y AR presentes en productos de grano de cebada, en combinación con la cepa de *Prevotella* spp. podrían ser especialmente valiosos en un enfoque de simbióticos ya que estos sustratos del aparato digestivo favorecían un aumento de *Prevotella*. Los resultados se obtuvieron en sujetos sanos de edad mediana/avanzada en ayunas y después de un desayuno estandarizado después de 3 días ingestión de un producto a base de grano de cebada (basado en 100 g de hidratos de carbono disponibles/día). El producto de grano de cebada se comparó con un producto de referencia de pan de trigo usando un diseño cruzado. Al influir en la composición de la microbiota del aparato digestivo y aumentar la proporción de *Prevotella* spp, el producto a base de grano de cebada produjo un aumento de la actividad de fermentación en el aparato digestivo (hidrógeno (H_2) exhalado como marcador de prueba) ($P < 0,001$), un aumento de las concentraciones de SCFA ($P < 0,05$), una mejora de la regulación de la glucosa (concentraciones de glucosa e insulina reducidas ($P < 0,05$), un aumento de las concentraciones de PYY (una hormona de la saciedad liberada en el aparato digestivo) ($P < 0,05$), un aumento en las concentraciones en ayunas de GLP-1 (una hormona digestiva anti-obesidad y antidiabética), un aumento en la saciedad percibida en ayunas y una reducción de las sensaciones de hambre en ayunas. Al alterar la composición de la microbiota del aparato digestivo y aumentar la *Prevotella* spp, la ingesta de alimentos a base de grano de cebada ricos en FD y AR de cebada aumentó la fermentación del metabolito succinato en el aparato digestivo en seres humanos y en ratones.

55

Los resultados revelaron además que algunos individuos (aproximadamente el 15 %) entre los sujetos de prueba no consiguieron una mejora de la regulación de la glucosa después de la ingesta del producto de prueba a base de

60

grano de cebada (determinado por la respuesta de glucosa y/o insulina a una comida estandarizada después de 3 días de intervención con cebada). De forma interesante, ninguno de estos “no respondedores” adquirió un aumento en el aparato digestivo de las concentraciones de *Prevotella* después de la ingestión del producto de grano de cebada. Esto resalta la relación causal entre la mejora de la regulación glucémica y el aumento de la abundancia de

- 5 *Prevotella* spp que es de conocimiento totalmente nuevo en el dominio público. Además, estos resultados indican por primera vez que algunos individuos no modifican tan fácilmente la composición de la microbiota de su aparato digestivo microbiota, y pueden beneficiarse especialmente de la ingestión oral de la combinación propuesta de prebióticos de cebada (FD+AR) y *Prevotella* spp; o por ingestión solo de *Prevotella* spp.
- 10 Por ejemplo, mediante el uso de un producto alimentario de grano de cebada rico en FD y AR o FD o AR se han establecido beneficios en el control de glucosa en sangre, los marcadores de inflamación metabólica y la regulación del apetito. Los beneficios metabólicos se asociaron con marcadores de fermentación en el aparato digestivo, es decir, hidrógeno exhalado, SCFA en plasma que indica un mecanismo prebiótico.
- 15 La cartografía microbiana del aparato digestivo de muestras fecales de seres humanos sanos que infieren el producto de grano de cebada mencionado anteriormente revelaron que los beneficios en los marcadores de riesgo metabólico y la regulación del apetito estaban relacionados con una alteración específica de la composición de microorganismos presentes en el aparato digestivo. Los sujetos que ingirieron el producto alimentario de grano de cebada mencionado anteriormente mostraron un aumento de especies *Prevotella* en la microbiota del aparato
- 20 digestivo y una mejora de los marcadores de riesgo cardiometabólico en comparación con los sujetos que no ingirieron el producto alimentario de grano de cebada (véanse los Ejemplos más adelante).

Además, se demostró que la monocolonización de ratones sin gérmenes con una cepa de *Prevotella* spp. mejoró el metabolismo de la glucosa en los animales. Así, la conclusión a partir de los resultados anteriores es que resulta

25 apropiado usar especies relacionadas con *Prevotella* como un probiótico por ejemplo con propiedades antidiabéticas y potencial de regulación del peso. La estrecha relación entre el deterioro de metabolismo de la glucosa y el deterioro de la función cognitiva hace también relevante el uso de especies de *Prevotella* para prevenir el declive cognitivo asociado con SMet. Anteriormente se mencionan otras enfermedades o trastornos.

- 30 A partir de los experimentos y la conclusión anteriores se identificó que la invención estaba relacionada con un producto, tal como un producto alimentario o un ingrediente o formulación alimentarios que se usarán en forma de enema, lo que comprende al menos una cepa bacteriana aislada humana de *Prevotellaceae*. Las bacterias pueden modificarse genéticamente, por ejemplo modificarse para producir succinato. Los ejemplos son *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*, *Prevotella histicola*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella Bryantii* 25A y *Prevotella distasonis*.
- 35

- El producto alimentario probiótico puede usarse en solitario, o en combinación con otros componentes, tales como al menos un tipo de fibras dietéticas, tales como FD y AR o FD o AR y en algunos ejemplos también ácido succínico para regular el metabolismo de la glucosa y reducir los factores de riesgo en el síndrome metabólico en un mamífero tal como en seres humanos. Los ejemplos de enfermedades o trastornos que se tratarían incluyen tratamiento de
- 40 obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal, tales como obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2.

- El producto alimentario probiótico puede comprender también al menos una FD y/o un AR, naturales o sintéticos, purificados, mezclas o variantes de los mismos. Los ejemplos de FD y AR son FD y AR de cereales o legumbres
- 45 tales como FD viscosas o no viscosas de cebada, centeno, trigo, avena, semillas de legumbres, beta-glucanos, goma guar, lignina, lignanos y oligosacáridos tales como galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, AR encapsulados botánicamente, AR retrogradados, almidón modificado químicamente o AR no gelatinizado. El producto puede comprender al menos un tipo de almidón resistente (AR), natural, sintético, purificado, mezclas o variantes del mismo. Los ejemplos de AR son almidón vegetal tal como almidón retrogradado, almidón encapsulado
- 50 botánicamente, almidón no gelatinizado y ciclodextrinas, o almidón modificado químicamente. La fibra puede proceder por ejemplo de granos de cebada. La proporción AR/FD podría ser por ejemplo de 10,8 (AR)/13,04 (FD). La FD podría ser fibra dietética de cebada, trigo, centeno, avena o beta-glucanos extraídos, goma guar, lignina, lignanos y oligosacáridos tales como galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, AR encapsulados botánicamente, AR retrogradado, almidón modificado químicamente o AR no gelatinizado. El producto puede comprender al menos
- 55 un tipo de almidón resistente (AR), natural, sintético, purificado, mezclas o variantes del mismo. Los ejemplos de AR son almidón vegetal tal como almidón retrogradado, almidón encapsulado botánicamente, almidón no gelatinizado y ciclodextrinas, o almidón modificado químicamente. La fibra puede ser por ejemplo de granos de cebada.

- El producto puede contener por ejemplo una o más cepas bacterianas junto con AR y/o DS para conseguir los
- 60 resultados esperados.

En otra realización, el producto de la invención comprende una cepa bacteriana adicional, donde dicha cepa puede producir succinato. Los ejemplos de dichas cepas incluyen cualquier cepa bacteriana que sea beneficiosa e incluyen por ejemplo *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*,
 5 *Lactobacillus plantarum*, *Roseburia* y *Bifidobacteria*, tales como *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium bifidum*. La cepa bacteriana adicional puede modificarse también genéticamente, por ejemplo para producir succinato.

El producto puede contener también succinato en forma libre o con adición de una cepa bacteriana que produce
 10 succinato. Una cepa que produce succinato naturalmente o una cepa que ha sido modificada genéticamente para producir succinato.

Por consiguiente, el producto puede estar encapsulado o liofilizado como conocen bien los expertos en la materia.

15 En otra realización la cepa bacteriana de *Prevotellaceae* está encapsulada en cualquier forma para proteger la cepa del oxígeno. Los ejemplos de técnicas de encapsulación incluyen películas comestibles, emulsiones de Pickering estables que emplean gránulos de almidón como material de barrera, encapsulación basada en polisacáridos como beta-glucanos, goma guar, goma de xantano, goma garrofín, goma de carragenano, prebióticos, alginato, proteína de la leche, etc. Otras técnicas incluyen formación de complejos entre polímeros en dióxido de carbono supercrítico.
 20 Pueden aplicarse diferentes técnicas de encapsulación, algunas de las cuales han sido descritas por R Vidhyalakshmi y col., 2009.

En otra realización la cepa/cepas bacterianas de *Prevotellaceae* pueden proporcionarse a través de enema en solitario o en una composición con sustratos prebióticos tales como FD y/o AR.
 25

El producto puede ser, por ejemplo, cualquier producto alimentario adecuado e incluye cualquier producto alimentario que no esté tratado por calor o lo esté ligeramente, o donde la *Prevotella* pueda introducirse después de tratamiento por calor, tal como bebidas, preparados líquidos (por ejemplo, a base de frutas o lácteos), batidos de frutas, refrescos, zumos, agua de mesa, sopas frías/preparados para sopas, productos de aceites, pasta para untar,
 30 aliños, salsa fría/preparados para salsas, salsa, productos lácteos, helados y bebidas a base de cereales, que contienen o están suplementadas con la *Prevotella* o con la *Prevotella* y el prebiótico combinados. La *Prevotella* puede encapsularse también e incluirse en los alimentos descritos anteriormente, aumentando así la resistencia al entorno y a las condiciones de procesamiento.

35 El producto alimentario también puede ser alimentos tratados por calor tales como pan blando, galletas crujientes de centeno, pan sin levadura, tortillas, gachas de avena, cereales de desayuno, barras de cereales u otros aperitivos, patata en polvo u otros productos alimentarios instantáneos, comidas preparadas para comer, que contienen el prebiótico por ejemplo de cebada, para su consumo con o sin suplementos con la *Prevotella*. Cápsulas que contienen la *Prevotella* spp. que se ingerirán con los productos enumerados anteriormente, o que se consumirán
 40 para el suministro de la *Prevotella*. Las cápsulas pueden prepararse adicionalmente a partir de hidratos de carbono prebióticos, por ejemplo de cebada. La *Prevotella* puede encapsularse también por ejemplo mediante técnicas de emulsión estable e incluirse en los alimentos.

La *Prevotella* spp. también puede proporcionarse en forma de un polvo en seco y empaquetada en recipientes
 45 desechables para añadirse a las comidas, por ejemplo a los cereales de desayuno. El producto alimentario también puede ser por ejemplo una bebida, sopa, yogur, budín de cereales frío o una bebida líquida proporcionada en un envase con dos cámaras, con *Prevotella* con o sin prebiótico en una de las cámaras y el producto alimentario como anteriormente en la otra, que se mezclarán para el consumo. La cámara con *Prevotella* también puede consistir en una paja, que se incluye con el paquete, o distribuirse por separado. A continuación, la *Prevotella* se consumirá
 50 bebiendo a través de la paja.

El producto puede ser una emulsión estable, donde la *Prevotella* con o sin prebióticos se encapsula en gotas de emulsión. Estos productos pueden administrarse, por ejemplo, en forma de bebida líquida.

55 En el caso en que la *Prevotella* se incluya en cápsulas, las cápsulas deben adoptar preferentemente una forma de cápsulas enteras. La *Prevotella* puede incluirse también en comprimidos enteros, comprimidos de tipo depot, cápsulas de tipo depot (liberación prolongada) o gránulos de liberación prolongada.

El producto puede ser también un ingrediente alimentario que se añadirá a un producto alimentario.

60

La invención define también un producto que podría usarse en el tratamiento de una serie de enfermedades o trastornos que incluyen los mencionados a continuación. Podría usarse para el tratamiento de la obesidad, y trastornos asociados relacionados con deterioro de la regulación de glucosa en sangre tales como diabetes tipo 2 así como protección frente a inflamación subclínica y enfermedades asociadas tales como enfermedades cardiovasculares. Además, los conceptos protegidos contrarrestan las características de la patogenia de la demencia. También, la desregulación de la glucosa en sangre se asocia con inflamación y daño endotelial, y proporciona así un vínculo entre el concepto protegido por la presente memoria y la prevención de enfermedades cardiovasculares.

10 Por consiguiente, incluso un deterioro leve de la regulación de la glucosa en el rango normal está relacionado con un rendimiento significativamente menor en las pruebas cognitivas y el concepto descrito en la presente memoria mejora la glucorregulación lo que sugiere beneficios auxiliares en la demencia. Además el concepto protegido descrito en la presente memoria estimula las hormonas de incretina tales como GLP-1. GLP-1 ejerce efectos neuroprotectores y antiapoptóticos, reduce la acumulación de placa beta-amiloide (A β), modula la potenciación y la plasticidad sináptica a largo plazo y promueve la diferenciación de células progenitoras neuronales, con lo que previene la demencia y la enfermedad de Alzheimer. Efectos neuroprotectores de GLP-1: posibles tratamientos para déficits cognitivos en individuos con trastornos del estado de ánimo. Además la estimulación de GLP-2 observada con el concepto protegido protege frente a la enfermedad inflamatoria intestinal, y se sabe que el GLP-2 exógeno puede proteger la mucosa de mucositis inducida por quimioterapia en ratas.

20 La invención se refiere también al producto identificado, tal como un producto alimentario o ingrediente alimentario y al uso de ese producto para mejorar el metabolismo de la glucosa, reducir la inflamación metabólica y facilitar la regulación del apetito así como reducir los factores de riesgo en el síndrome metabólico. Esto podría ser útil en la prevención y regulación de trastornos relacionados con el SMet, tales como obesidad, intolerancia a la glucosa, diabetes o enfermedades cardiovasculares así como en sujetos que sufren deterioro del funcionamiento cognitivo relacionado con SMet. El probiótico de la presente invención puede usarse también en formulaciones de enema o supositorios con o sin sustratos prebióticos.

30 La invención se refiere también al uso del producto tal como se define anteriormente para reducir los factores de riesgo en el síndrome metabólico, mejorar el metabolismo de la glucosa, facilitar la regulación del peso y reducir el riesgo de declive cognitivo relacionado con el SMet.

Finalmente, la invención se refiere al uso de succinato o una cepa bacteriana que produce succinato para mejorar el metabolismo de la glucosa, facilitar la regulación del peso y reducir los factores de riesgo en el síndrome metabólico.

35 El producto puede usarse en seres humanos, caballos, así como en perros y gatos.

Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención en cualquier modo, manera o forma, ya sea de forma explícita o implícita.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1

45 *LOS HIDRATOS DE CARBONO PREBIÓTICOS EN PRODUCTOS A BASE DE GRANO DE CEBADA AFECTAN DE FORMA BENEFICIOSA A LOS MARCADORES DE RIESGO METABÓLICO, LAS HORMONAS REGULADORAS DEL APETITO Y LA SACIEDAD PERCIBIDA EN SUJETOS SANOS*

INTENCIÓN DEL ESTUDIO Y RESUMEN DEL DISEÑO DEL ESTUDIO

50 El objetivo del estudio era evaluar los efectos de hidratos de carbono, FD y AR indigeribles intrínsecos presentes en productos a base de grano de cebada sobre marcadores de riesgo relacionados con el SMet. A 39 sujetos sanos de mediana edad, de $64,5 \pm 5,6$ años, con índices de masa corporal normales (media \pm DT= $23,6 \pm 2,3$ kg/m²) se les proporcionó un pan de grano de cebada o un pan de trigo (PT, producto de referencia) durante tres días consecutivos en un diseño cruzado. Al día siguiente (día cuatro) se sirvió un desayuno estandarizado y se determinaron marcadores de prueba fisiológicos en ayunas y repetidamente en el periodo posprandial (0-180 min). El estudio se dividió en tres sub-estudios (**ESTUDIOS A-C**). Los marcadores de prueba fisiológicos en el ESTUDIO A incluyeron determinaciones de glucosa en sangre, insulina sérica, expulsión de hidrógeno (H₂) exhalado (marcador de fermentación en el colon) y registro de sensaciones subjetivas de apetito. Se recogió sangre venosa repetidamente para evaluaciones posteriores en un subgrupo de la cohorte (véase más adelante). Además, se

recogieron muestras fecales antes de iniciar el estudio y después de cada periodo de intervención para caracterización de la microbiota del aparato digestivo (**ESTUDIO A**).

A partir de la cohorte descrita anteriormente, se determinaron marcadores de prueba fisiológicos adicionales de 20 sujetos, escogidos aleatoriamente ($64,1 \pm 5,9$ años, $23,5 \pm 2,2$ kg/m²) (**ESTUDIO B**). Además de la glucosa en la sangre, insulina sérica y el H₂ exhalado, se midieron también las hormonas reguladoras del apetito (PYY, GLP-1) y los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en plasma.

En el **ESTUDIO C**, se eligió a 20 sujetos de la cohorte del ESTUDIO A basándose en el grado de mejoras en la regulación de la glucosa en un desayuno estandarizado en una perspectiva de toda la noche después de la ingestión de un producto a base de grano de cebada (PC) la noche anterior. Se incluyó a los 10 sujetos con efectos más pronunciados y a los 10 sujetos con efectos menos pronunciados de PC en la regulación de la glucosa. El ESTUDIO C se comunica más adelante por separado.

15 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

SUJETOS DEL ENSAYO

Los criterios de inclusión fueron edad entre 50-70 años, IMC normal o con ligero sobrepeso (IMC 18-28 kg/m²), valor plasmático de glucosa en ayunas $\leq 6,1$ mmol/L, no fumador, buena salud general y ausencia de trastornos metabólicos o alergias alimentarias conocidos. Se aceptaron medicaciones antihipertensivas y analgésicos sin receta sin acción antiinflamatoria. Los estudios fueron aprobados por el Comité Regional de Revisión Ética de Lund, Suecia (Referencia 2010/457).

ESTUDIO A: En el estudio participaron voluntarios sanos, 6 hombres y 33 mujeres de $64,5 \pm 5,6$ años de edad, y con índices de masa corporal normales (media \pm DT = $23,6 \pm 2,3$ kg/m²).

ESTUDIO B: Se eligieron aleatoriamente 20 voluntarios sanos, 3 hombres y 17 mujeres, de $64,1 \pm 5,9$ años de edad y con índices de masa corporal normales (media \pm DT = $23,5 \pm 2,2$ kg/m²), a partir de la cohorte del ESTUDIO A.

COMIDAS DE PRUEBA

Las comidas de prueba fueron pan de grano de cebada (PC) y pan de trigo (PT; comida de referencia). Cada producto de prueba se consumió durante tres días consecutivos, separados por dos semanas. Se calculó la cantidad de los productos de prueba y de referencia, respectivamente, para proporcionar 100 g de almidón disponible potencialmente al día, y se analizó de acuerdo con Holm y col. [2] (**Tabla 1**). Durante los dos primeros días la ingesta diaria se dividió en tres tamaños iguales de raciones para su consumo a aproximadamente 0800, 1400 y 2100. En el tercer día, la mitad de la ingesta diaria (50 g de almidón disponible) se dividieron por igual entre las comidas de las 0800 y las 1400, y la otra mitad se consumió a las 2100.

Tabla 1. Composición del pan de grano de cebada (PC) y la referencia del pan de trigo (PT) en los ESTUDIOS A-C.

Productos	Almidón total	AR	Almidón disponible ¹	FD insoluble	FD soluble	FD total ²	AR+FD
<i>% de materia seca</i>							
PT	77,4	1,92	75,5	3,55	1,38	4,93	6,85
PC	74,3	10,8	63,5	8,83	4,21	13,04	23,84
<i>g/día</i>							
PT	103	2,54	100	4,71	1,83	6,54	9,08
PC	117	17,0	100	13,97	6,64	20,61	37,61

¹ Calculado por diferencia; Almidón total menos AR (3-5).

² La FD mencionada en la presente solicitud no incluye almidón indigerible o físicamente inaccesible, es decir, AR.

45 DESAYUNO ESTANDARIZADO

Se consumió un desayuno estandarizado después de 3 días de intervención con PC o PT, respectivamente, y consistió en 122,9 g de PT correspondiente a 50 g de hidratos de carbono disponibles, y 2,5 dl de agua del grifo.

50 RECETAS Y PREPARACIÓN DE PRODUCTOS DE PRUEBA.

Pan de trigo (PT, comida de referencia y desayuno estandarizado): Se horneó un PT de acuerdo con un

procedimiento estandarizado en una máquina de horno casera (modelo de pan casero Tefal n° 573102; elección del Menú, programa 2 [pan blanco, 1 000 g, rápido (tiempo 2:32)]). El pan se preparó a partir de 540 g de harina de trigo blanca (Kungsörnen Ab, Järna, Suecia), 360 g de agua, 4,8 de levadura seca, 4,8 g NaCl (sin yodo). Después de enfriar, se cortó el pan en rebanadas y se envolvió en papel de aluminio en tamaños de porciones, se introdujo en 5 bolsas de plástico y se guardó en un congelador (-20 °C). El día antes del consumo se indicó a las personas de la prueba que descongelaran el pan a temperatura ambiente, todavía envuelto en papel de aluminio y en la bolsa de plástico.

Pan de grano de cebada (PC): Se hirvió un total de 595 g granos de cebada en 520 g de agua durante para 12 min y, a 10 continuación, se enfrió durante 30 min a temperatura ambiente. Durante la cocción se absorbió toda el agua en los granos. A los granos se le añadieron 105 g de harina de trigo, 6 de levadura seca, 5 g de sal y 300 g de agua. Se amasó la masa durante 4 min (Electrolux AKM 3000, N23 N25) y se fermentó durante 30 min en un cuenco, seguido por otra fermentación (35 min) en un molde para horno. El molde para horno se cubrió con papel de aluminio y se horneó en un horno casero a 225 °C retirando un recipiente con agua para elevar al máximo el vapor presente, 15 hasta que la temperatura interna del pan alcanzó 96 °C. Después de hornear se enfrió el pan sin el molde para horno en paños húmedos a temperatura ambiente. Después de enfriar se puso el pan en una bolsa de plástico y se dejó a temperatura ambiente durante la noche. El día después de trocear los panes y envolverlos en papel de aluminio en tamaños de porción, se introdujeron en bolsas de plástico y se guardaron en un congelador (-20 °C).

20 ANÁLISIS DE ALMIDÓN TOTAL, AR Y FD EN LOS PRODUCTOS DE PRUEBA

Los productos de prueba se analizaron con respecto a almidón total [3], AR [4] y FD [5]. Antes del análisis de almidón total y FD, se secaron los panes al aire y se trituraron. Se analizó el AR en los productos de prueba en los 25 productos cuando se comieron. Se calculó el almidón disponible restando AR del almidón total (Tabla 1).

25 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El estudio fue un estudio cruzado aleatorizado (orden de los productos de prueba), lo que significa que cada sujeto participó en dos intervenciones de tres días, consumiendo PC o PT, respectivamente, separado por 30 aproximadamente 2 semanas. Se animó a los sujetos a estandarizar su dieta habitual y sus pautas de comidas y a no consumir alcohol, no hacer ejercicio físico excesivo ni comer alimentos ricos en FD durante los días de consumo de la prueba o los productos de referencia. Además, no debían haber consumido antibióticos ni probióticos durante las 2 semanas anteriores ni durante el estudio. Después de la última cena de la prueba con pan de grano de cebada o PT, respectivamente, se hizo ayunar a los sujetos hasta que se sirvió un desayuno estandarizado a la mañana 35 siguiente. Los sujetos llegaron al departamento experimental a las 0730, y se les introdujo una cánula intravenosa (BD Venflon, Becton Dickinson) en una vena antecubital para su uso para extraer sangre. Se recogieron las muestras de sangre en ayunas, y se registró la saciedad y el H₂ exhalado antes de consumir el desayuno. El desayuno se consumió a las ~0800 y en 13 min. Además, se obtuvieron medidas del apetito antes y después del desayuno usando una escala analógica visual (VAS) de 100 mm. Durante 2,5 h de extracciones de sangre 40 repetidas, se dijo a los sujetos que mantuvieran un grado constante y bajo de actividad física.

MUESTREO Y ANÁLISIS DE VARIABLES FISIOLÓGICAS E HIDRÓGENO EXHALADO EN EL AIRE EXPULSADO.

Se tomaron muestras de sangre capilar con pinchazo en el dedo para determinar la glucosa en sangre 45 (HemoCue®B-glucose, HemoCue AB, Ängelholm, Suecia). Se recogieron muestras de sangre venosa para determinar los marcadores de prueba fisiológicos en suero (s) (s-insulina) y plasma (p) (p-SCFA, p-GLP-1 y p-PYY). Se separaron el suero y el plasma por centrifugado y se guardaron inmediatamente en un congelador (-40 °C) hasta su análisis. Los tubos para recogida de sangre para análisis de GLP-1 en plasma y PYY se prepararon con un cóctel de inhibición que consistía en DPP-IV (10 µl/ml de sangre) (Millipore, St Charles, EE.UU.) y Trasylol® 10 000 KIE/ml 50 de aprotinina (50 µl/ml de sangre) (Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemania) antes de la extracción de sangre. Los tubos que contenían el cóctel de inhibición se mantuvieron en hielo hasta su uso, aunque con un máximo de 6 días. Se usaron kits comerciales basados en ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas para determinar la S-insulina (Mercodia, Uppsala, Suecia), PYY (3-36 y 1-36) y GLP-1 (7-36 activo) (Alpco Diagnostics, Salem, EE.UU.). Se determinaron los SCFA (acetato, propionato, butirato) usando un procedimiento GC [6]. Se midió el hidrógeno 55 (H₂) exhalado en el aire expulsado como un indicador de fermentación en la actividad del colon usando un Gastro+ (Bedfont EC60 Gastrolyzer, Rochester, Inglaterra). Se recogieron muestras fecales antes de la intervención en la dieta y en el día cuatro, es decir, después de tres días de consumo de producto de prueba y de referencia, respectivamente. Se indicó a los sujetos que recogieran las heces de la primera defecación que se produjo en el día cuatro e inmediatamente se congeló la muestra y se envió al departamento experimental en un plazo de 24 h para 60 un almacenamiento continuado a -80 °C hasta su análisis. En la **Tabla 2** se presenta un cronograma para la

determinación de los parámetros fisiológicos.

Tabla 2. Cronograma para la determinación de los marcadores de prueba.

Tiempo (minutos después del inicio del desayuno)	0	15	30	45	60	90	120	150
P-PYY	x				x		x	
SCFA	x				x		x	
P-GLP2	x		x		x	x		x
H ₂	x	x	x	x	x	x	x	x
Glucosa	x	x	x	x	x	x	x	x
P-GLP1	x		x	x	x	x		x
S-insulina	x		x	x	x	x	x	x
Sensaciones de apetito	x	x	x	x	x	x	x	x

5 CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS.

Se usó GraphPad Prism (versión 5, GraphPad Software, San Diego, Calif., EE.UU.) para representación gráfica. Se calcularon las áreas bajo la curva incrementales de glucosa en sangre e insulina sérica (iAUC, (concentraciones en función del tiempo) para cada sujeto y comida de prueba, usando el modelo trapezoidal. Se determinaron las concentraciones pico incrementales (iPico) para glucosa e insulina como el máximo aumento posprandial individual desde el valor basal. Las diferencias significativas en las variables de prueba después de las diferentes comidas de prueba se evaluaron con ANOVA (modelo lineal general), en MINITAB Statistical Software (versión 16; Minitab, Minitab Inc, State College, PA). En los casos de residuos con distribución no uniforme (probados con Anderson-Darling y considerados distribuidos de manera no uniforme cuando $P < 0,05$), se realizó transformación de Box Cox en los datos antes de ANOVA. Las correlaciones entre parámetros se realizaron usando correlación de Pearson en MINITAB Statistical Software (versión 14; Minitab, Minitab Inc, State College, PA). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos. Los datos se expresan como media \pm EEM, valores que se consideran significativos a $P < 0,05$. Ejemplo 1: ESTUDIO A: n=39, ESTUDIO B: n=20, ESTUDIO C: n=20.

20 RESULTADOS

ESTUDIO A (N=39)

GLUCOSA EN SANGRE E INSULINA SÉRICA

25

Tres días de consumo de PC mejoraron significativamente la respuesta de glucosa en sangre al desayuno estandarizado en términos de concentraciones pico posprandiales (iPico, $P < 0,01$) e iAUC 0-150 min ($P < 0,01$) en comparación con el PT de referencia (Tabla 3). Además, el PC produjo una iAUC de insulina significativamente reducida (0-150 min, $P < 0,001$) e iPico de insulina ($P < 0,001$, Figura 1, Tabla 3).

30

Tabla 3. Respuestas de glucosa en sangre e insulina sérica al desayuno estandarizado después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) o pan de trigo (PT), respectivamente.

	Glucosa (n = 39)		Insulina (n = 39)	
	iPico <i>mmol/L</i>	iAUC 0-150 min <i>mmol min/L</i>	iPico <i>nmol/L</i>	iAUC 0-150 min <i>nmol · min/L</i>
PT	3,45 \pm 0,14	215 \pm 13,6	0,266 \pm 0,019	16,2 \pm 1,28
PC	2,99 \pm 0,14**	181 \pm 11,7**	0,230 \pm 0,020***	13,7 \pm 1,13***
% cambio	-13,4	-15,8	-13,6	-15,5

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (diferencias entre PT y PC).

35 EXPULSIÓN DE H₂ EXHALADO

El consumo del PC redujo significativamente el H₂ exhalado en comparación con el PT de referencia, un indicio de aumento de la actividad de fermentación en el aparato digestivo después del PC ($P < 0,001$, Tabla 4).

40 **Tabla 4.** Expulsión de H₂ exhalado y sensaciones de apetito en ayunas y después del desayuno estandarizado, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) o pan de trigo (PT), respectivamente.

	H ₂		Saciedad	Hambre
	Valor en ayunas N = 38	Media 0-150 min N = 39	Valor en ayunas N = 39	Valor en ayunas N = 39

	Ppm		mm	
PT	11,39 ± 2,23	7,54 ± 1,04	31,44 ± 4,33	53,77 ± 3,51
PC	26,32 ± 3,42***	33,17 ± 4,26***	39,74 ± 4,26*	43,67 ± 4,52*
% cambio	131	339,92	26,4	-18,78

* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (diferencias entre PT y PC)

SENSACIONES DE APETITO

5 Tres días de consumo de PC produjeron un aumento de la saciedad y una reducción hambre en ayunas al día siguiente, en comparación con tres días de consumo de PT ($P < 0,05$, Tabla 4).

ESTUDIO A: RESUMEN Y CONCLUSIONES: La ingesta de un producto a base de grano de cebada produjo una mejora en la regulación de la glucosa posprandial 11-14 horas después de la ingestión de la última porción. Además, el producto a base de grano de cebada aumentó la saciedad y redujo la sensación de hambre en la misma perspectiva de tiempo. En paralelo, la expulsión de hidrógeno exhalado aumentó, como un indicio de un aumento en la fermentación en la actividad del colon. Los resultados sugieren que los efectos beneficiosos obtenidos después del producto a base de grano de cebada están mediados por el aumento de la fermentación en el aparato digestivo, y la activación de la microbiota específica, de la FD y el AR intrínsecos, presentes en productos a base de grano de cebada.

ESTUDIO B (marcadores de prueba adicionales en $n=20$, elegidos aleatoriamente a partir de la cohorte del ESTUDIO A)

20 RESPUESTA DE GLUCOSA EN SANGRE E INSULINA SÉRICA

Tres días de consumo de PC influyeron beneficiosamente en la respuesta de glucosa en sangre en el siguiente desayuno estandarizado en términos de menores iPico ($P < 0,05$) y iAUC 0-150 min ($P < 0,05$), en comparación con tres días de consumo de PT. Además, la iAUC de s-insulina (0-150 min) y el iPico de insulina se redujeron significativamente ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente) (Figura 2).

MARCADORES DE FERMENTACIÓN EN EL APARATO DIGESTIVO: H₂ EXHALADO Y SCFA

Tres días de consumo de PC produjeron un aumento significativo de H₂ exhalado en comparación con el PT de la comida de referencia ($P < 0,01$, Figura 3, Tabla 5). Además, la ingesta de PC incrementó significativamente las concentraciones de s-acetato y la concentración de total SCFA ($P < 0,05$, Tabla 5). Se observó un aumento no significativo del s-butorato circulante después de PC en comparación con después de PT (PC 16,1 ± 0,7; PT 14,2 ± 0,9; $P = 0,11$). Los resultados indican un aumento de la actividad de fermentación en el aparato digestivo después del PC.

35

Tabla 5. Concentraciones de SCFA en plasma en ayunas, después de 3 días de consumo de pan de grano de cebada (PC) o pan de trigo (PT), respectivamente.

	Acetato	Propionato	Butirato	SCFA total
	Valor en ayunas	Valor en ayunas	Valor en ayunas	Valor en ayunas
	N = 19	N = 19	N = 18	N = 19
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$
PT	145,3 ± 11,5	9,84 ± 0,902	14,23 ± 0,864	170,2 ± 12,6
PC	171,5 ± 10,2*	10,45 ± 0,793	16,01 ± 0,706 ¹	197,8 ± 10,3*
% cambio	18	6	13	16

* $P < 0,05$, ¹ $P = 0,11$

40 HORMONAS RELACIONADAS CON EL APARATO DIGESTIVO

GLP-1

GLP-1: es una hormona que es producida por las células L en el aparato digestivo y que aumenta la secreción de insulina desde el páncreas y aumenta la sensibilidad a la insulina en las células alfa y las células beta de una forma dependiente de la glucosa. GLP-1 también aumenta la masa de células beta, inhibe la secreción de ácido y el vaciado gástrico en el estómago y disminuye la ingesta de alimento al aumentar la saciedad en el encéfalo.

45

El consumo de comidas de prueba de PC produjo un aumento significativo de las concentraciones de p-GLP-1 en ayunas en el día cuatro después de PC ($1,6 \pm 0,5$ pmol/L) en comparación con después de PT ($1,0 \pm 0,4$ pmol/L) ($P < 0,01$).

5 GLP-2

Las concentraciones de p-GLP-2 aumentaron significativamente durante el día del experimento después de tres días de consumo de PC (media 0-150 min: $3,5 \pm 0,5$ ng/ml) en comparación con después de PT (media 0-150 min: $3,1 \pm 0,4$ ng/ml, $P < 0,05$).

10

PYY

PYY: también es producida por células L e inhibe la motilidad gástrica y se ha demostrado que reduce el apetito.

15 Se observó un efecto principal significativo de las comidas de prueba que reveló un aumento en las concentraciones plasmáticas de PYY (0-120 min) después de tres días de consumo de PC, en comparación con tres días de ingesta de PT ($P < 0,05$, **Figura 4**).

RELACIONES ENTRE HORMONAS RELACIONADAS CON EL APARATO DIGESTIVO Y SCFA

20

Después de tres días de consumo de PT o PC, las concentraciones plasmáticas de PYY mantuvieron una correlación con las concentraciones plasmáticas de SCFA total ($r = 0,51$, $P < 0,05$ y $r = 0,57$, $P = 0,01$) respectivamente.

25 ESTUDIO B: RESUMEN Y CONCLUSIONES: Las investigaciones extendidas muestran que, además de los resultados presentados en el ESTUDIO A, el producto a base de grano de cebada aumentó las concentraciones plasmáticas de las hormonas digestivas importantes para la regulación del apetito de la glucosa en una perspectiva temporal de 11-14 horas después del consumo. Se determinó un aumento de la actividad de fermentación en el aparato digestivo con aumento de la expulsión de hidrógeno exhalado y aumento de las concentraciones plasmáticas de SCFA. Además, el producto de grano de cebada aumentó las concentraciones plasmáticas de GLP-
30 2, una hormona digestiva importante para las funciones de barrera del aparato digestivo al reducir la permeabilidad de la pared intestinal, por ejemplo, a las endotoxinas.

El estudio indica que la fermentación en el aparato digestivo de hidratos de carbono indigeribles intrínsecos presentes en productos a base de grano de cebada puede constituir un mecanismo para un enfoque prometedor
35 dirigido a prevenir y/o tratar la obesidad y los trastornos metabólicos asociados

ESTUDIO C (n=20, elegido entre la cohorte del estudio A basándose en el grado de mejoras en la regulación de la glucosa individual en el desayuno estandarizado).

40 A partir de la cohorte del ESTUDIO A (n=39, Ejemplo 1), se incluyó a 20 sujetos (18 mujeres y 2 hombres), de edad (media \pm DT) $64,9 \pm 5,1$ años y con índices de masa corporal (media \pm DT) de $23,2 \pm 2,4$ kg/m², en investigaciones adicionales. Se eligió a los sujetos en relación con la eficiencia del producto de grano de cebada para mejorar la regulación de la glucosa individual, en comparación con el PT. Se incluyó a los 10 sujetos (8 mujeres y 2 hombres, $64,0 \pm 4,6$ años, IMC $23,9 \pm 2,7$ kg/m²) del ESTUDIO A con efectos más pronunciados de PC con respecto a los
45 beneficios en la regulación de la glucosa y se denotaron como "respondedores", y se incluyó a los 10 sujetos (10 mujeres, $65,7 \pm 5,3$ años, IMC $22,5 \pm 1,7$ kg/m²) con mejoras mínimas en la regulación de la glucosa de PC y se denotaron como "no respondedores". A continuación, se describen los criterios usados para definir a los respondedores y los no respondedores. En el grupo de respondedores, tres días de consumo de PC produjeron una tolerancia a la glucosa significativamente mejorada (iAUC 0-150 min: 156 ± 20 y 251 ± 26 mmol*min/L después de
50 PC y PT, respectivamente, $P < 0,0001$, **Figura 5**) y una respuesta a la insulina reducida después del desayuno estandarizado (iAUC 0-120 min: $10,3 \pm 1,5$ y $15,3 \pm 2,1$ nmol*min/L después de PC y PT, respectivamente $P < 0,01$, **Figura 6**). En cambio, no se observaron mejoras significativas en la tolerancia a la glucosa (iAUC 0-150 min: 173 ± 23 y 191 ± 24 mmol*min/L después de PC y PT, respectivamente, $P = 0,11$) o en las respuestas de insulina (iAUC 0-120 min: $15,8 \pm 1,8$ y $16,3 \pm 1,5$ nmol*min/L después de PC y PT, respectivamente, $P = 0,51$) en el grupo de no
55 respondedores.

Las muestras fecales recogidas antes del estudio, y después de consumir PC y PT, respectivamente, se caracterizaron con respecto a la microbiota del aparato digestivo (véanse los Ejemplos 2).

60 DEFINICIÓN DE "RESPONDEDORES" Y "NO RESPONDEDORES"

- Los respondedores se definieron como los 10 sujetos de la cohorte del ESTUDIO A (n=39) que consiguieron el efecto beneficioso más pronunciado del producto de grano de cebada en la regulación de la glucosa. En los respondedores el producto de grano de cebada produjo una disminución del área incremental de la glucosa en sangre (iAUC, 0-90 min) después del desayuno estandarizado en el 25 % como mínimo (entre -25-(-67)%, media=-39 %), una reducción en la AUC total en el mismo periodo de tiempo y una disminución de la iAUC de la insulina después del desayuno estandarizado en al menos el 15 % (-15-(-69)%, media=-33 %). Varios de los 29 sujetos restantes tenían una menor respuesta a la glucosa o una menor respuesta a la insulina. Sin embargo, los 10 sujetos con las menores mejoras en las respuestas a la glucosa y/o la insulina se denotaron como "no respondedor".
- 10 En el grupo de no respondedores (n=10), cuatro sujetos consiguieron no reducir las respuestas a la glucosa y la insulina después de cebada, tres sujetos tuvieron respuestas a la glucosa ligeramente reducidas, pero sin mejoras en las respuestas a la insulina, y tres sujetos consiguieron una respuesta a la insulina ligeramente reducida después de PC, pero sin mejoras en las respuestas a la glucosa.
- 15 ESTUDIO C: RESUMEN Y CONCLUSIONES: Los resultados muestran diferencias individuales relativas a la eficiencia beneficiosa de los granos de cebada en la regulación de la glucosa en una perspectiva de 11-14 horas. Se ha sugerido que la razón de las discrepancias individuales está relacionada con diferencias en la composición de la microflora del aparato digestivo.
- 20 Se llevó a cabo UN SEGUIMIENTO AL ESTUDIO C. El objetivo era confirmar los resultados obtenidos previamente en la regulación de la glucosa y de la microflora del aparato digestivo después del consumo del PC con respecto al PT. El diseño del estudio fue similar al diseño descrito anteriormente. Se preguntó a todos los sujetos del estudio C (10 respondedores y 10 no respondedores) si estaban dispuestos a repetir el estudio. Siete respondedores (6 mujeres y 1 hombre, 65,6 ± 4,3 años, imc 23,5 ± 3,2 kg/m²) y siete no respondedores (7 mujeres, 64,7 ± 6,1 años, imc 21,7 ± 1,2 kg/m²) aceptaron los resultados.

Los resultados del estudio de seguimiento fueron coherentes con los resultados obtenidos previamente. Por tanto, en el grupo de respondedores (n=7), el PC mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa para el desayuno estandarizado (iAUC 0-150 min: 239 ± 32 y 295 ± 28 mmol*min/L después de PC y PT, respectivamente, $P < 0,0001$, **Figura 7**), mientras que no se observaron mejoras del PC en la tolerancia a la glucosa en el grupo de no respondedores (iAUC 0-150 min: 277 ± 20 y 287 ± 36 mmol*min/L después de PC y PT, respectivamente, $P = 0,81$).

RESUMEN Y CONCLUSIONES, ESTUDIO DE SEGUIMIENTO: Los resultados obtenidos en el estudio de seguimiento verifican así los resultados obtenidos en los estudios previos descritos anteriormente (estudios A-C) en relación con los efectos beneficiosos en la regulación de la glucosa de FD y AR en PC, e indican un componente individual de la respuesta metabólica.

Ejemplo 2

40 *CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DEL APARATO DIGESTIVO HUMANO DESPUÉS DE INGESTIÓN DE PRODUCTOS DE PT O PC EN SERES HUMANOS; Y EXPERIMENTOS DE INOCULACIÓN EN RATONES PARA VALIDACIÓN DE RELACIONES CAUSALES*

EXTRACCIÓN DE ADN FECAL, AMPLIFICACIÓN, PIROSECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.

45 Se aisló ADN genómico a partir de 100-150 mg de heces por individuo usando el procedimiento de batido de microesferas repetido (RBB) descrito anteriormente por Salonen y col. [7]. El ADN fecal se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies) y la calidad del ADN genómico se valoró mediante electroforesis en gel usando gel de agarosa-GelRed al 1 %. Se diluyó una parte alícuota del ADN genómico a 10 ng
50 en 1 µl antes de su uso para PCR.

La amplificación de la región variable V1-V2 del gen 16 ARNr se realizó usando los cebadores 27F y 338R fusionados con adaptadores de secuenciación 454 Titanium para valorar la diversidad de la microbiota fecal. Los cebadores 338R contenían códigos de barras de 12 bases de corrección de errores únicos que permiten analizar
55 múltiples muestras en una sola tanda de secuenciación. Cada muestra se amplificó por triplicado en un volumen de reacción de 25 µL que contenía 1,5 U de FastStart Taq ADN Polimerasa (Roche), 0,2 µM de cada cebador y 1 µl (~10 ng) del ADN genómico extraído. La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 3 min a 95 °C, seguido por 25 ciclos de desnaturalización durante 20 s a 95 °C, hibridación durante 30 s a 52 °C y elongación durante 60 s a 72 °C, y una etapa de elongación final durante 10 min a 72 °C. Después de la
60 PCR se combinaron los triplicados y se verificó el producto resultante en cuanto a tamaño y pureza en gel de

agarosa-GelRed al 0,8 %. A continuación se purificaron las muestras con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Alemania) y se cuantificó usando el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se diluyeron los productos de PCR purificados a una concentración de 20 ng en 1 µl y se guardaron en reserva en cantidades iguales. A continuación se purificaron las muestras en reserva con las microesferas de purificación magnética Ampure (Agencourt, Danvers, MA) para eliminar los fragmentos de amplificación más cortos. Los productos en reserva se secuenciaron usando la química de titanio 454 GS FLX en la National Genomics Infrastructure (Estocolmo).

Se procedió a filtrado de calidad de los datos en bruto para eliminar las secuencias que tuvieran menos de 200 nucleótidos, más de 1000 nucleótidos, que contuvieran errores de correspondencia, bases ambiguas, códigos de barra incorregibles o tandas de homopolímeros de más de seis bases. Las lecturas con filtro de calidad se recortaron a partir de sus adaptadores 454 y secuencias de códigos de barras y se analizaron con el paquete de software Quantitative Insights In Microbial Ecology (QIIME) (versión 1.5.0). El número de lecturas que valoraron el filtro de calidad sumaron 755.963 (media 125.99 secuencias/muestra). Se eliminó el ruido de los datos de secuenciación con una envoltura `denoise_wrapper.py` disponible en QIIME.

Se asignaron las secuencias a unidades taxonómicas operativas (OTU) usando UCLUST con un umbral del 97 % de identidad de pares. Se tomó la secuencia más abundante como representativa para cada OTU y se asignó taxonómicamente usando el clasificador Ribosomal Database Project (RDP). Las OTU representativas se alinearon usando Pynast y se usaron para construir un árbol filogenético con FastTree, que se usó para estimar la diversidad de muestras β (UniFrac ponderado).

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA.

Se transfirieron 120-190 mg de heces congeladas a un tubo de vidrio (16×125 mm) provisto de una tapa roscada y se añadieron 100 µl de solución de reserva de patrón interno ([1-¹³C]acetato y [²H₆]propionato en concentración 1 M, [¹³C₄]butirato en concentración 0,5 M, [1-¹³C₁]isobutirato y [1-¹³C]isovalerato en concentración 0,1 M, [1,2-¹³C₂]hexanoato, [¹³C]lactato y [¹³C₄]ácido succínico cada uno en concentración 40 mM). Antes de la extracción se liofilizaron las muestras a -50 °C durante 3 h (rendimiento 28-78 mg/peso en seco). Después de la acidificación con 50 µl de HCl al 37 %, se extrajeron los ácidos orgánicos (2 ml de éter dietílico/extracción; 2 ciclos). Se mezcló una parte alícuota de 500 µl de la muestra extraída junto con 50 µl de N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoracetamida (MTBSTFA; Sigma) a temperatura ambiente. Se inyectó una parte alícuota (1 µl) del material derivatizado resultante en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890 A) acoplado a un detector de espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5975 C). Se usó un gradiente de temperatura lineal. La temperatura inicial de 65 °C se mantuvo durante 6 min, se aumentó a 260 °C (15 °C/min) y después a 280 °C durante 5 min. Las temperaturas del inyector y de la vía de transferencia fueron de 250 °C. La cuantificación se completó en modo de adquisición de monitorización iónica seleccionada por comparación con patrones internos etiquetados (se comparó valerato con [1-¹³C]isovalerato, heptanoato y octanoato se compararon con [1,2-¹³C₂]hexanoato y fumarato se comparó con [¹³C₄]ácido succínico). Las proporciones m/z de iones monitorizados fueron las siguientes: 117 (ácido acético), 131 (ácido propiónico), 145 (ácido butírico), 146 (ácido isovalérico), 159 (ácido isovalérico y ácido valérico), 173 (ácido hexanoico), 187 (ácido heptanoico), 201 (ácido octanoico), 261 (ácido láctico), 287 (ácido fumárico), 289 (ácido succínico), 121 ([²H₂]- y [1-¹³C]acetato), 136 ([²H₅]propionato), 146 ([1-¹³C₁]isobutirato), 149 ([¹³C₄]butirato), 160 ([1-¹³C]isovalerato), 175 ([1,2-¹³C₂]hexanoato), 264 ([¹³C]lactato) y 293 ([¹³C₄]ácido succínico).

45 RESULTADOS RELATIVOS AL PATRÓN MICROBIANO FECAL EN LOS SERES HUMANOS

La pirosecuenciación de los amplicones de código de barras de genes de ARN 16S produjo 755 963 secuencias de alta calidad, con una media de 12 599 secuencias (intervalo 7018-21116) por muestra con una cantidad similar de secuencias generadas en respondedores (R) y no respondedores (NR) después de cada tratamiento. Firmicutes (~70 %) fue el filo más abundante en cada grupo de estudio seguido por Bacteroidetes (~20 %). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidetes entre respondedores o no respondedores o por cualquier tratamiento. Sin embargo, se observó un aumento no significativo en la abundancia de Bacteroidetes en el grupo de respondedores con dieta con suplemento de pan de grano de cebada (**Figura 8A**).

El filo Bacteroidetes está compuesto por *Prevotella* y *Bacteroides* y de forma interesante los autores de la invención encontraron una abundancia relativa significativamente mayor en los grupos de respondedores de *Prevotella* (**Figura 8B**, ANOVA de dos vías, $P < 0,01$). Además, los niveles de *Prevotella* aumentaron después del consumo del pan de grano de cebada en el grupo de respondedores, que no se observó en el de no respondedores.

60

Por otra parte, se midió un aumento significativo en los niveles fecales de succinato en el grupo de respondedores en dieta con suplemento de pan de grano de cebada (**Tabla 6**). Se sabe que el succinato es el principal metabolito de las actividades de fermentación de las especies *Prevotella*.

5 **Tabla 6.** Concentración fecal de ácidos orgánicos.

Metabolito µmol/g de peso en seco	Respondedores de control	Respondedores PT	Respondedores PC	No respondedores de control	No respondedores PT	No respondedores PC
Acetato	92,82	93,47	77,58	90,95	100,92	79,51
Propionato	40,08	36,88	35,12	29,02	37,47	27,57
Butirato	38,02	32,41	30,07	28,27	33,49	23,81
Lactato	3,54	12,86	5,37	4,73	4,89	8,30
Succinato	4,32	2,86	9,32	1,66	1,33	2,43

EXPERIMENTOS DE INOCULACIÓN EN RATONES

A ratones macho Swiss Webster sin gérmenes de 10 a 12 semanas se les inoculó con alimentación forzada única de 10⁸ CFU de *Bacteroidetes thetaiotaomicron* cepa VPI-5482 (cultivo durante toda la noche en medio YCFA) o *Prevotella copri* cepa DSM18205 (cultivo durante toda la noche en medio PYG) en aislamiento o juntos. Las dos cepas se habían aislado de heces humanas. Las dos se cultivaron y se transportaron a las instalaciones con ratones en tubos Hungate de 15 ml. Se alojaron ratones monocolonizados y bicolonizados en sistema iso-cage durante 14 días. Antes de sacrificar a los ratones se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Todos los ratones se mantuvieron en ayunas 4 h antes de OGTT. La densidad de colonización se verificó usando ensayos qPCR que usaron cebadores específicos de la especie. A un grupo de control de ratones Swiss Webster machos gnotobióticos de edad comparable también se les suministró la misma dieta de pienso en autoclave a voluntad.

Se dejó en ayunas a los ratones durante horas y a continuación se les suministró alimentación forzada por vía oral de D-glucosa al 60 % (3 g/kg de peso corporal). Se extrajo sangre de la vena caudal a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos y se midieron los niveles de glucosa en sangre usando un glucómetro HemoCue®. Se recogió sangre adicional de la vena caudal a 0, 15 y 30 minutos para análisis de los niveles de insulina sérica usando ensayo ELISA de insulina (Crystal Chem, Inc.).

25 RESULTADOS

Para investigar si *Prevotella* tiene un impacto en las mejoras en la tolerancia a la glucosa los autores de la invención monocolonizaron ratones gnotobióticos con cepa de *Prevotella* derivada de heces humanas, *Prevotella copri*, y compararon la tolerancia a la glucosa de esos ratones con ratones monocolonizados con *B. thetaiotaomicron* y bicolonizados con las dos cepas. La colonización con *B. thetaiotaomicron* provocó un deterioro de la tolerancia a la glucosa en comparación con los ratones colonizados *P. copri* (**Figura 9A-B**). Además, los niveles de insulina sérica en los ratones monocolonizados con *P. copri* fueron menores a 15 y 30 min después de la alimentación forzada por vía oral de glucosa, en comparación con los ratones monocolonizados *B. thetaiotaomicron* (**Figura 9C**). De forma importante, los ratones colonizados con *B. thetaiotaomicron* mostraron mejora en la tolerancia a la glucosa cuando fueron cocolonizados con *P. copri*. Estos datos sugieren que mientras que *B. thetaiotaomicron* deteriora la tolerancia a la glucosa *P. copri* puede prevenir este deterioro.

Ejemplo 3

40 EJEMPLOS DE PRODUCTOS

A) Un vaso de precipitados que incluye una ración de yogur, con FD de cebada y/o AR y *Prevotella* (10⁷ CFU o más), cerrado herméticamente en la tapa y separado por una membrana.

45 B) Un frasco que incluye una ración de yogur bebible, con FD de cebada, AR y *Prevotella* (10⁹ CFU) cerrado herméticamente en una paja para beber de acompañamiento.

C) Una ración de FD de cebada, AR y *Prevotella* cerrada herméticamente en envases monodosis.

50 D) Un frasco que incluye una ración de bebida de frutas, con FD de cebada y/o AR y *Prevotella* (10⁹ CFU) cerrado herméticamente en una paja para beber de acompañamiento.

E) Un frasco que incluye una ración de bebida de frutas, con FD de cebada y AR y *Prevotella* (10^9 CFU) cerrado herméticamente en una tapa y separado por una membrana.

F) Un producto alimentario emulsionado que contiene la *Prevotella* encapsulada en una matriz con o sin el componente de hidratos de carbono de prebiótico.

A-F) Una porción de FD de cebada y AR y *Prevotella* (7 g de FD de cebada insoluble, 3,3 g de FD de cebada soluble, 8,5 g de AR y 10^9 CFU de *Prevotella*).

10 REFERENCIAS

1. Vidhyalakshmi, R., R. Bhakayaraj, and R. S. Subhasree, *Encapsulation "The Future of Probiotics"—A Review*. *Advances in Biological Research* 2009. **3**(3-4): p. 96-103.
2. Holm, J., et al., *A rapid method for the analysis of starch*. *Starch/Stärke*, 1986. **38**: p. 224-226.
- 15 3. Björck, I. M. E. and M. A. Siljeström, *In-vivo and in-vitro digestibility of starch in autoclaved pea and potatoe products*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1992. **58**: p. 541-553.
4. Åkerberg, A. K., et al., *An in vitro method, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber*. *The Journal of Nutrition*, 1998. **128**(3): p. 651-60.
- 20 5. Asp, N.-G., et al., *Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983. **31**: p. 476-482.
6. Brighenti, F., *Summary of the conclusion of the working group on Profibre interlaboratory study on determination of short chain fatty acids in blood*, in *Functional properties of non-digestible carbohydrates*, F. Gullion, et al., Editors. 1998, European Commission, DG XII, Science, Research and Development: Brussels, Belgium. p. 150-153.
- 25 7. Salonen, A., et al., *Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis*. *J Microbiol Methods*, 2010. **81**(2): p. 127-34.

REIVINDICACIONES

1. Un producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal que comprende al menos una cepa bacteriana aislada a partir de las especies *Prevotellaceae*, donde la cepa se selecciona de entre el grupo que consiste en *Prevotella copri* y *Prevotella ruminicola*.
2. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con la reivindicación 1, donde el producto comprende *Prevotella copri*.
3. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, donde el producto comprende al menos un tipo de fibra dietética.
4. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con la reivindicación 3, donde el producto comprende al menos un almidón resistente.
5. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha cepa bacteriana está modificada genéticamente.
6. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dichas fibras dietéticas y dicho almidón resistente están relacionados con cereales en cualquier forma tales como fibra de cebada, trigo, centeno, avena, beta-glucano.
7. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha fibra dietética es de cebada.
8. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho almidón resistente está en cualquier forma como la intrínseca de granos de cebada, almidón retrogradado, almidón encapsulado botánicamente, almidón no gelatinizado natural, ciclo-dextrinas o almidón modificado químicamente.
9. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una cepa bacteriana adicional, donde dicha cepa es una cepa que produce succinato.
10. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende succinato.
11. El producto para su uso en el tratamiento de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad inflamatoria intestinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la cepa bacteriana de la especie *Prevotellaceae* está encapsulada o liofilizada.
12. Un producto que comprende al menos una cepa bacteriana aislada a partir de las especies *Prevotellaceae*, donde la cepa se selecciona de entre el grupo que consiste en *Prevotella copri* y *Prevotella ruminicola*, y donde el producto comprende además al menos un tipo de fibra dietética.
13. El producto de acuerdo con la reivindicación 12, donde el producto comprende como única cepa bacteriana una cepa bacteriana aislada a partir de las especies *Prevotellaceae*, donde la cepa es *Prevotella copri*.

60

14. El producto de acuerdo con la reivindicación 12, donde el producto comprende además una cepa bacteriana adicional, donde dicha cepa es una cepa que produce succinato.

15. El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde el producto comprende 5 además succinato.

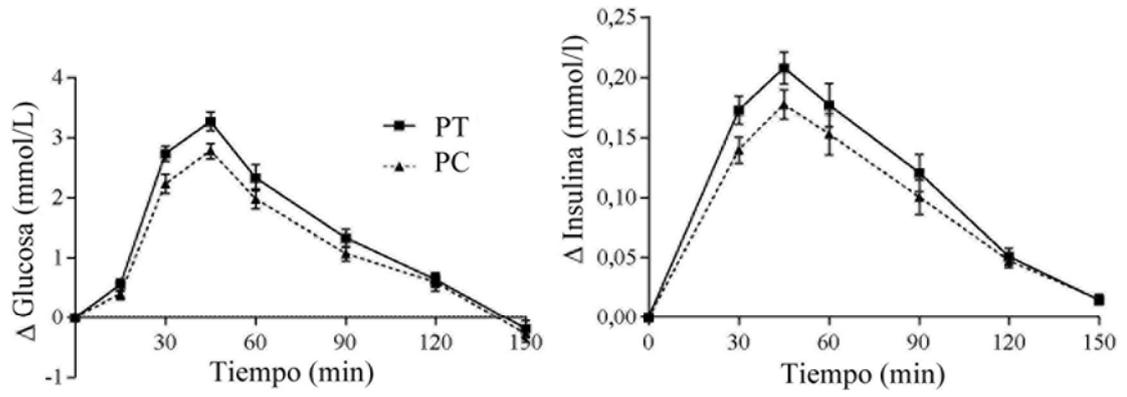


Fig. 1

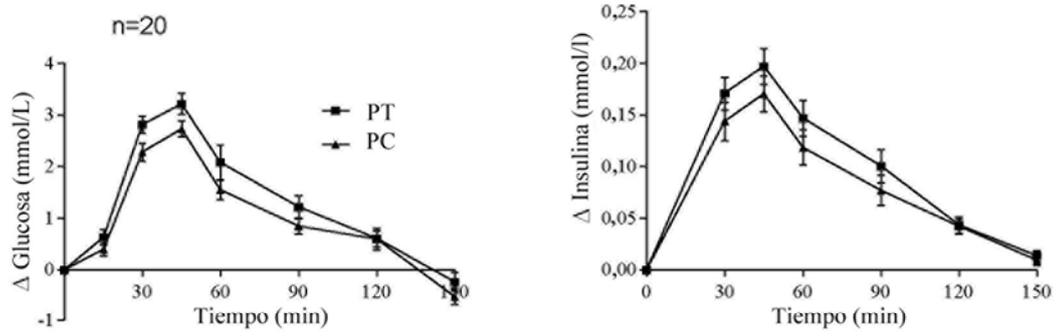
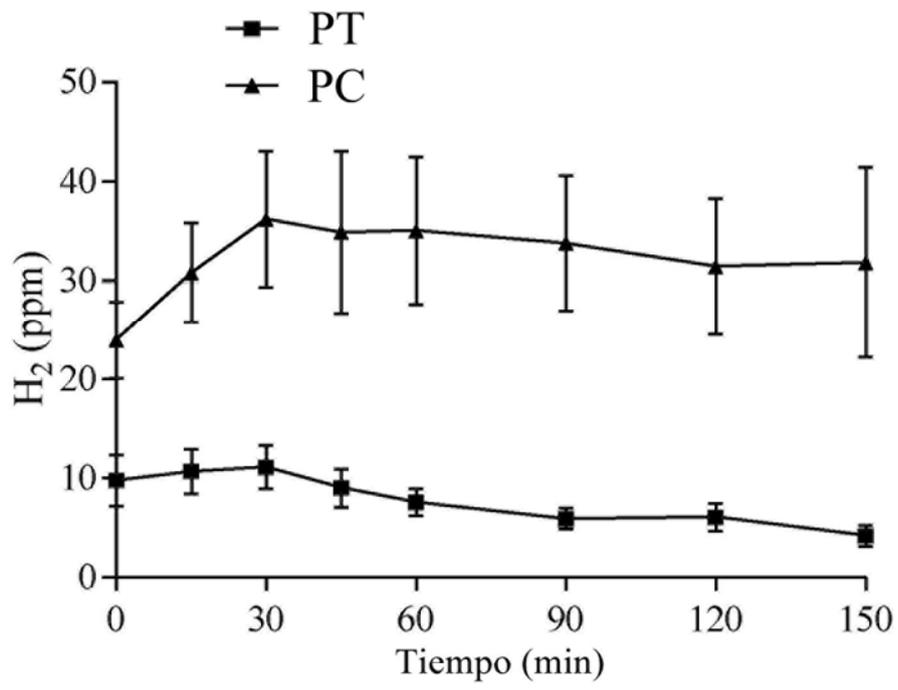


Fig. 2

**Fig. 3**

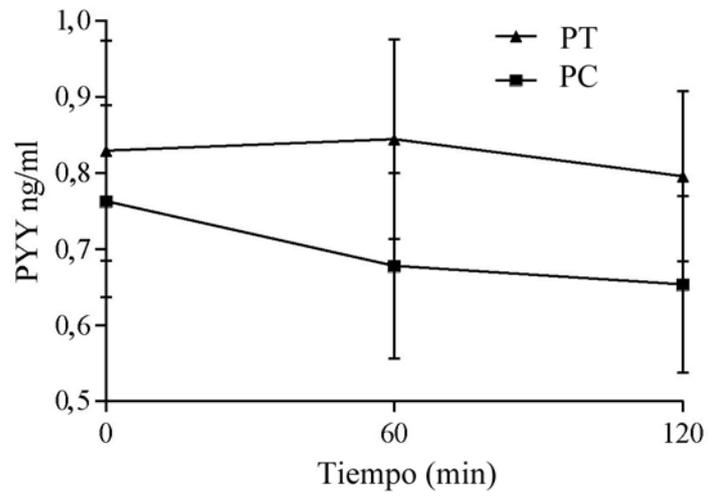


Fig. 4

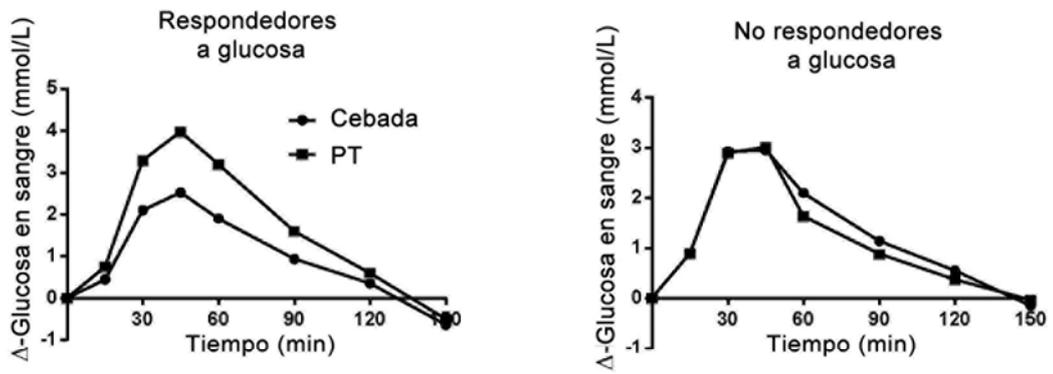


Fig. 5

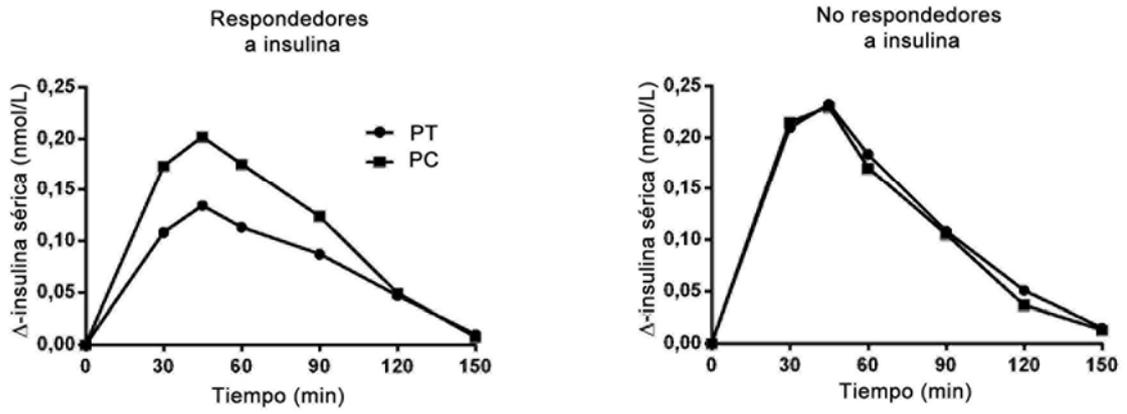


Fig. 6

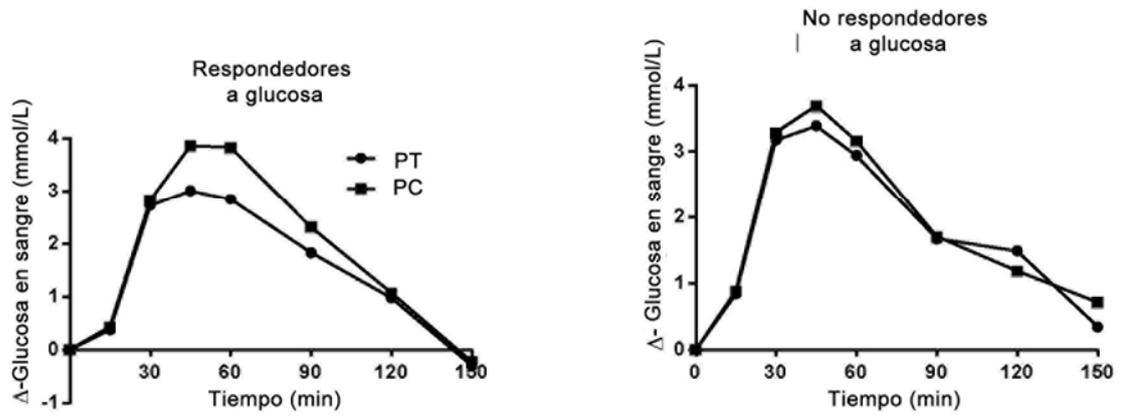
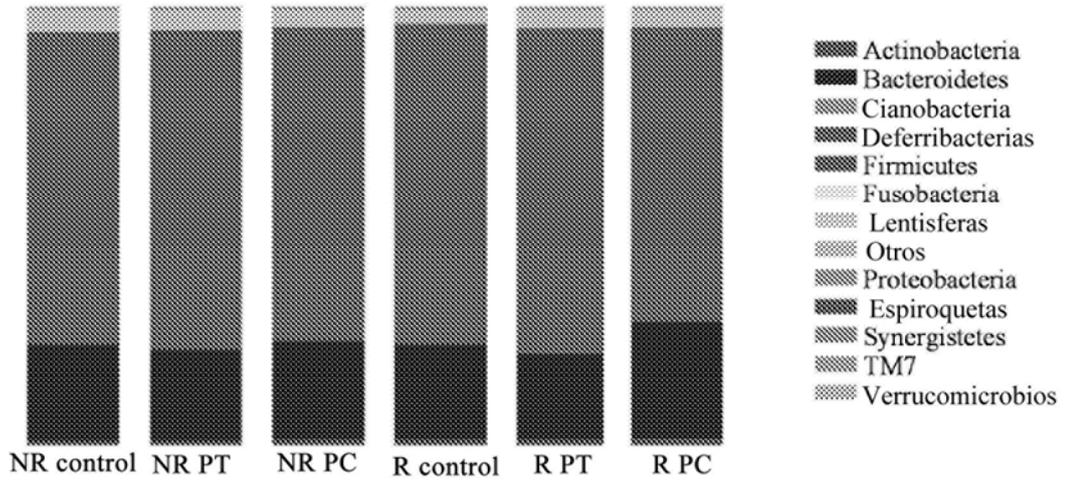


Fig. 7

A



B

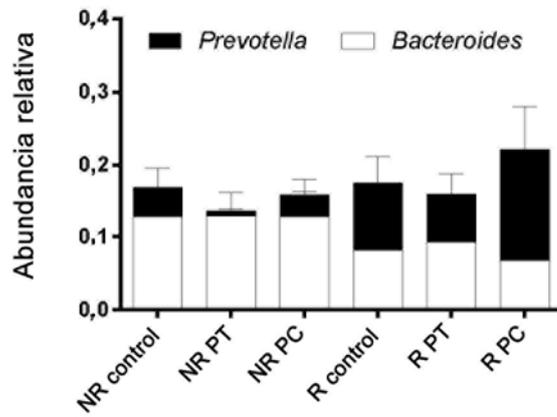


Fig. 8

A.

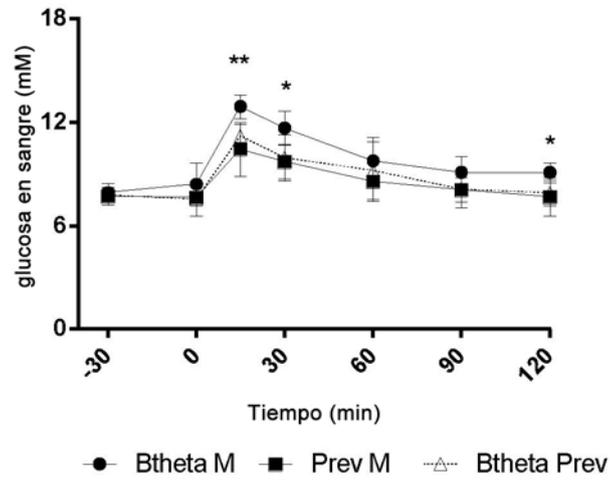


Fig. 9 a

B.

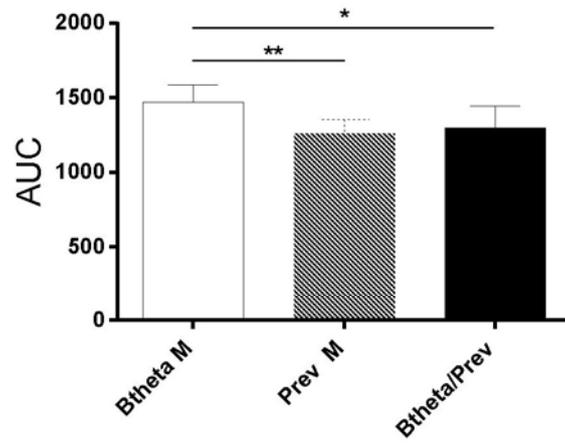


Fig. 9 b

C.

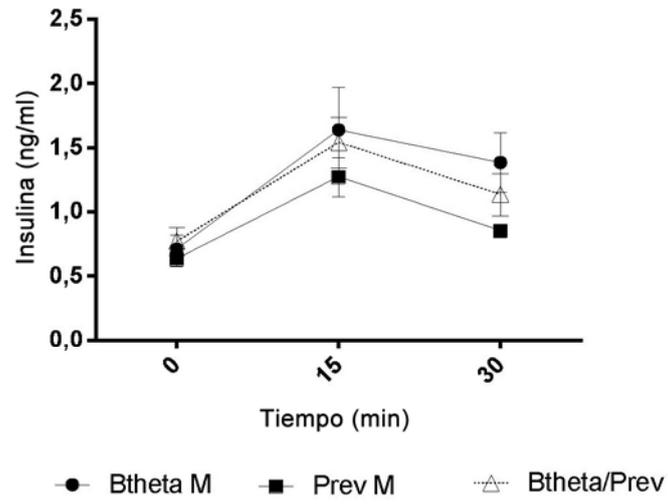


Fig. 9 c