

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 450**

51 Int. Cl.:

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2010 PCT/IB2010/053482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11013106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10747076 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2459203**

54 Título: **Bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para tratar endotoxemia**

30 Prioridad:

30.07.2009 US 229980 P

10.03.2010 US 312400 P

08.04.2010 US 321949 P

20.04.2010 US 325919 P

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

09.04.2019

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)**

**Langebrogade 1
1411 Copenhagen K , DK**

72 Inventor/es:

**BURCELIN, RÉMY;
CARCANO, DIDIER;
DESREUMAUX, PIERRE;
LAHTINEN, SAMPO;
RAUTONEN, NINA;
PUTAALA, HELI;
TIIHONEN, KIRSTI y
BARRANGOU, RODOLPHE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 708 450 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

Bacterias ácido lácticas y bifidobacterias para tratar endotoxemia

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos usos de la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas, (en particular, aunque no exclusivamente, bacterias probióticas), y a productos alimentarios, productos de alimentación, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas que los contienen.

Antecedentes de la invención

15 La endotoxemia se define como la presencia de un nivel elevado de lipopolisacáridos (también conocidos como endotoxinas) en el cuerpo. Los lipopolisacáridos (LPS), también conocidos como lipoglicanos, son moléculas grandes que consisten en al menos un resto lipídico y al menos un resto polisacárido unidos por un enlace covalente. Los LPS se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, actúan como endotoxinas y provocan fuertes respuestas inmunitarias en los animales.

20 Cani *et al.*, Diabetes, 2007, 56, 1761-1772, describe la inducción de un aumento de la endotoxemia en ratones alimentados con una dieta con alto contenido de grasa. Los autores encontraron que la concentración de LPS en plasma varía a lo largo del día, aumentando hasta un máximo al final de la oscuridad, el periodo de alimentación para los ratones alimentados con una dieta normal, y que una dieta con alto contenido de grasa hizo que la endotoxemia fuera elevada durante todo el día. Los autores definen el término 'endotoxemia metabólica' como un aumento crónico de 2 a 3 veces de la concentración de lipopolisacáridos (LPS) en plasma desde los niveles basales, inducido por una dieta con alto contenido de grasa, y observan que los niveles de endotoxemia alcanzados fueron 10-50 veces menores que los obtenidos durante el shock séptico.

30 La translocación bacteriana se define como el paso de bacterias viables desde el tracto intestinal a través de la mucosa epitelial en el cuerpo. Las bacterias pueden entrar en el sistema linfático a través de los ganglios linfáticos mesentéricos y, por lo tanto, pueden circular de forma sistémica. Las bacterias también pueden entrar en la circulación sanguínea (bacteriemia) y también se pueden localizar en tejidos. La translocación bacteriana puede ocurrir en una serie de afecciones médicas, incluyendo el crecimiento excesivo de bacterias intestinales, lesión intestinal y shock. Cualquier afección médica asociada con un aumento de la permeabilidad intestinal puede conducir potencialmente a la translocación bacteriana.

35 Como los LPS se originan a partir de bacterias en el intestino, la translocación de bacterias desde el intestino en el cuerpo puede servir potencialmente como un mecanismo potencial para la endotoxemia, incluyendo la endotoxemia metabólica. Si las bacterias Gram-negativas se desplazan en el cuerpo, sirven como una fuente de LPS. Sin embargo, en la actualidad no se conoce la ruta exacta de los LPS en el cuerpo en la endotoxemia metabólica: se considera que la translocación bacteriana puede ser una posible explicación, pero los LPS libres del intestino también puede entrar en el cuerpo durante la absorción normal de lípidos. También es posible que varios mecanismos se produzcan al mismo tiempo.

45 Schiffrin *et al.*, Br. J. Nutr., 2009, 101, 961-966, describen el uso de un suplemento de yogur probiótico en pacientes de edad avanzada con crecimiento excesivo de bacterias en el intestino delgado (SIBO). Se evaluaron los efectos con respecto a la colonización intestinal, permeabilidad intestinal, translocación de endotoxinas y modificación de las funciones inmunes innatas. Sin embargo, la endotoxemia en los pacientes que se describen en el presente documento es la endotoxemia por shock séptico, que está causada por la infección con agentes patógenos, tales como bacterias patógenicas, y porque, como se describe en Cani *et al.*, en el artículo que se ha mencionado anteriormente, los niveles de LPS en plasma aumentan en un factor mucho mayor que los niveles normales. Esto es distinto de la endotoxemia metabólica, que como se ha descrito anteriormente está causada generalmente por la dieta (en particular, por una dieta con alto contenido de grasa) y porque el aumento de los niveles de LPS en plasma (expresado como un múltiplo de los niveles normales) es mucho más bajo.

55 Sumario de la Invención

60 En un aspecto, la invención proporciona el uso de una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxemia metabólica en un mamífero.

65 En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxina metabólica, en la que la endotoxemia metabólica comprende un aumento del nivel de lipopolisacáridos en el cuerpo del mamífero en un factor en el intervalo de 1,5 a 20 en comparación con los niveles basales de lipopolisacárido.

En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxina metabólica, en la que la endotoxemia metabólica comprende un aumento del nivel de lipopolisacáridos en el cuerpo del mamífero en un factor en el intervalo de 2 a 4 en comparación con los niveles basales de lipopolisacárido.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxina metabólica, en la que la endotoxemia está inducida por la dieta y/o asociada a la dieta.

Además en otro aspecto adicional, la invención proporciona una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxina metabólica, en la que el animal continúa ingiriendo una dieta con alto contenido de grasa durante el transcurso del tratamiento.

Además en otro aspecto, la invención proporciona una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxina metabólica, en la que la bacteria se administra en combinación con uno o más prebióticos.

Además en otro aspecto, la invención proporciona una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxina metabólica, en la que el prebiótico se selecciona entre alginato, xantano, pectina, goma de algarrobo, inulina, goma guar, un galacto-oligosacárido, un fructo-oligosacárido, polidextrosa, lactitol, lactosacarosa, un oligosacárido de soja, palatinosa, un isomalto-oligosacárido, un gluco-oligosacárido o un xilo-oligosacárido, o una mezcla de cualquiera de los mismos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el nivel de LPS en plasma (endotoxemia) en ratones a los que se les administra comida normal (NC), dieta con alto contenido de grasa (HFD), o dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención, en particular la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus* (NCFM), la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420) o una combinación de las dos (NCFM + B420);

La Figura 2 ilustra el nivel de tejido medio de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (niveles por encima del límite de detección) en ratones a los que se les administra comida normal, dieta con alto contenido de grasa, o dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (NCFM, B420 o NCFM + B420);

La Figura 3 ilustra el nivel de tejido medio de bacterias del género *Enterococcus* (niveles por encima del límite de detección) en ratones a los que se les administra comida normal, dieta con alto contenido de grasa, o dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (NCFM, B420 o NCFM + B420);

La Figura 4 ilustra el nivel de tejido medio de bacterias del género *Lactobacillus* (niveles por encima del límite de detección) en ratones a los que se les administra comida normal, dieta con alto contenido de grasa, o dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (NCFM, B420 o NCFM + B420);

La Figura 5 ilustra el nivel de tejido medio de bacterias de la clase *Bacteroidetes* (niveles por encima del límite de detección) en ratones a los que se les administra comida normal, dieta con alto contenido de grasa, o dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (NCFM, B420 o NCFM + B420);

La Figura 6 ilustra el nivel de tejido medio de *Bacterium* de Dominio Total (niveles por encima del límite de detección) en ratones a los que se les administra comida normal, dieta con alto contenido de grasa, o dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (NCFM, B420 o NCFM + B420);

La Figura 7 ilustra los niveles de *E. coli* en la mucosa o diferentes segmentos de la abertura interna de ratones a los que se les administra una dieta con alto contenido de grasa y se tratan con vehículo o una dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (B420);

La Figura 8 ilustra el efecto en la adhesión de *Escherichia coli* en la mucosa del ciego de ratones a los que se les administra una dieta con alto contenido de grasa y se tratan con vehículo o una dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (B420), sola o en combinación con un prebiótico;

La Figura 9 ilustra el efecto en la translocación de *Escherichia coli* en los tejidos hospedadores de ratones a los que se les administra una dieta con alto contenido de grasa y se tratan con vehículo o una dieta con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (B420), sola o en combinación con un prebiótico; y

La Figura 10 ilustra el efecto en los niveles de insulina en ayunas y secreción de insulina en estado con alimento de ratones a los que se les administra una dieta con alto contenido de grasa y se tratan con vehículo o una dieta

con alto contenido de grasa suplementada con bacterias de acuerdo con la presente invención (B420), sola o en combinación con un prebiótico.

Descripción detallada de la invención

5

Bacterias Ácido Lácticas y Bifidobacterias

10 La bacteria usada en realizaciones de la presente invención se selecciona entre una bacteria ácido láctica (LAB), una *Bifidobacterium* o una mezcla de cualquiera de las mismas. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'bacteria del ácido láctica' incluye cualquier bacteria capaz de producir, como el producto metabólico final principal de la fermentación de carbohidratos, ácido láctico o al menos uno de sus derivados (incluyendo, pero no limitado a, ácido acético o ácido propiónico) Por lo tanto, la expresión tiene como objeto incluir bacterias ácido propiónicas (PAB), que producen ácido propiónico como producto de fermentación de carbohidratos.

15 La bacteria se puede usar en cualquier forma capaz de ejercer los efectos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, las bacterias pueden ser bacterias viables, latentes, inactivas o muertas. Preferentemente, las bacterias son bacterias viables.

20 Las bacterias pueden comprender bacterias completas o pueden comprender componentes bacterianos. Los ejemplos de los componentes de este tipo incluyen componentes de la pared celular bacteriana tales como peptidoglicano, ácidos nucleicos bacterianos tales como ADN y ARN, componentes de membrana bacteriana y componentes estructurales bacterianos tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y combinaciones de los mismos tales como lipoproteínas, glicolípidos y glicoproteínas.

25 Las bacterias también pueden comprender o como alternativa comprenden metabolitos bacterianos. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'metabolitos bacterianos' incluye todas las moléculas producidas o modificadas por las bacterias (probióticas) como resultado del metabolismo bacteriano durante el crecimiento, supervivencia, persistencia, tránsito o existencia de bacterias durante la fabricación y el almacenamiento de productos probióticos y durante el tránsito gastrointestinal en un mamífero. Los ejemplos incluyen todos los ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, bases, proteínas y péptidos, enzimas y coenzimas, aminoácidos y ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, vitaminas, todos los compuestos bioactivos, metabolitos que contienen un componente inorgánico y todas las moléculas pequeñas, por ejemplo moléculas nitrosas o moléculas que contienen un ácido sulfuroso.

35 Preferentemente las bacterias comprenden bacterias completas, más preferentemente bacterias viables completas.

40 Preferentemente la bacteria ácido láctica y/o *Bifidobacterium* que se va a usar en la presente invención es a bacteria ácido láctica y/o *Bifidobacterium* que generalmente se reconoce como segura y, que está preferentemente aprobada por GRAS.

45 Una persona con experiencia estará rápidamente informada de las especies específicas y/o cepas de bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a partir de los géneros que se describen en el presente documento que se usa en las industrias alimentaria y/o agrícola y que generan el que se consideran adecuadas para consumo humano y/o animal.

50 Preferentemente, la bacteria ácido láctica y/o *Bifidobacterium* usaba de acuerdo con la presente invención es una que es adecuada para consumo humano y/o animal.

55 En la presente invención, las bacterias usadas pueden ser del mismo tipo (género, especie y cepa) o pueden comprender una mezcla de géneros, especies y/o cepas.

60 Las bacterias ácido lácticas adecuadas se pueden seleccionar entre los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* y mezclas de los mismos. Por lo general, las bacterias ácido lácticas se seleccionan entre las especies *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus jensenii*, y combinaciones de cualquiera de las mismas.

65 Las *Bifidobacteria* se seleccionan entre las especies *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, y *Bifidobacterium angulatum*, y combinaciones de cualquiera de las mismas.

Preferentemente, las bacterias usadas en la presente invención se seleccionan entre los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* y mezclas de los mismos. Más preferentemente, las bacterias usadas en la presente invención se seleccionan entre las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, o *Bifidobacterium bifidum*, y mezclas de las mismas. Es especialmente preferente una combinación de bacterias de la especie *Lactobacillus acidophilus* y bacterias de la especie *Bifidobacterium animalis*.

En una realización particularmente preferente, las bacterias usadas la presente invención son de la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*. La cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus* está disponible en el mercado en Danisco A/S con el nombre comercial HOWARU™ Dophilus.

En una realización alternativa particularmente preferente, las bacterias usadas en la presente invención son de la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420). Esta cepa está disponible en el mercado en Danisco A/S.

En una realización alternativa particularmente preferente, las bacterias usadas en la presente invención son de la cepa 33 de *Lactobacillus salivarius* 33 (Ls-33). Esta cepa está disponible en el mercado en Danisco A/S.

En una realización, la bacteria usada en la presente invención es una bacteria probiótica. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'bacteria probiótica' se define como la cobertura de cualquier bacteria no patógena que, cuando se administra viva en cantidades adecuadas, confiere un beneficio para la salud en el hospedador. Estas cepas probióticas generalmente tienen la capacidad de sobrevivir el pase a través de la parte superior del tracto digestivo. No son patogénicas ni tóxicas y ejercen su efecto beneficioso sobre la salud, por un lado, a través de las interacciones ecológicas con la flora residente en el tracto digestivo, y por otro lado, por su capacidad para influir en el sistema inmunológico de manera positiva a través del "GALT" (tejido linfoide asociado al intestino). Dependiendo de la definición de probióticos, estas bacterias, cuando se administran en un número suficiente, tienen la capacidad de progresar vivas a través del intestino, sin embargo, no atraviesan la barrera intestinal y, por lo tanto, sus efectos principales se inducen en la abertura interna y/o la pared del tracto gastrointestinal. A continuación forman parte de la flora residente durante el periodo de administración. Esta colonización (o colonización transitoria) permite que las bacterias probióticas ejerzan un efecto beneficioso, tal como la represión de microorganismos potencialmente patógenos presentes en la flora e interacciones con el sistema inmunológico del intestino.

En realizaciones preferentes, la bacteria usada en la presente invención es una bacteria ácido láctica probiótica y/o una bacteria *Bifidobacterium* probiótica.

En algunas realizaciones preferentes, la bacteria *Bifidobacterium* se usa en la presente invención junto con una bacteria del género *Lactobacillus*. Una combinación de bacterias *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* de acuerdo con la presente invención presenta un efecto sinérgico en ciertas aplicaciones (es decir, un efecto que es mayor que el efecto aditivo de las bacterias cuando se usa por separado). Por ejemplo, las combinaciones que, además de tener efecto de mamífero como componentes individuales, pueden tener un efecto beneficioso en los otros componentes de la combinación, por ejemplo produciendo metabolitos que a continuación se usan a su vez como una fuente de energía por otros componentes de la combinación, o pueden mantener condiciones fisiológicas que favorecen a los otros componentes.

Por lo general, las bacterias *Lactobacillus* usadas en la combinación se seleccionan entre las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus parapantarum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus jensenii*, y combinaciones de cualquiera de las mismas.

En realizaciones preferentes, la bacteria *Lactobacillus* usada en la presente invención es una *Lactobacillus* probiótica.

Preferentemente, la bacteria *Lactobacillus* usada en la presente invención es de la especie *Lactobacillus acidophilus*.

En una realización particularmente preferente, las bacterias usadas en la presente invención comprenden una combinación de la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420) y la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*.

Dosificación

La bacteria ácido láctica y/o *Bifidobacterium* usada de acuerdo con la presente invención (tal como una cepa de *Lactobacillus* spp.; por ejemplo una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* y/o *Lactobacillus plantarum*, tal como una cepa de *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus salivarius*, por ejemplo la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus* o la cepa 33 de *Lactobacillus salivarius*) y/o una cepa de *Bifidobacterium* spp., tal como

una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, por ejemplo la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420)), puede comprender de 10^6 a 10^{12} CFU de bacterias/g de soporte, y más particularmente de 10^8 a 10^{12} CFU de bacterias/g de soporte, preferentemente de 10^9 a 10^{12} CFU/g para la forma liofilizada.

5 De forma adecuada la bacteria ácido láctica y/o *Bifidobacterium* usada de acuerdo con la presente invención (tal como una cepa de *Lactobacillus* spp.; por ejemplo una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* y/o *Lactobacillus plantarum*, tal como una cepa de *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus salivarius*, por ejemplo la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus* o la cepa 33 de *Lactobacillus salivarius*) y/o una cepa de *Bifidobacterium* spp., tal como una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, por ejemplo la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420)), se puede administrar a una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis. Con el término "por dosis" se hace referencia a que esta cantidad de microorganismo se proporciona un sujeto ya sea al día o por ingesta, preferentemente al día. Por ejemplo, si el microorganismo se va a administrar en un producto alimentario (por ejemplo en un yogur) - entonces el yogur contendrá preferentemente de aproximadamente 10^8 a 10^{12} CFU del microorganismo. Como alternativa, sin embargo, esta cantidad de microorganismo se puede separar en múltiples administraciones cada una de las cuales consistiendo en una cantidad más pequeña de carga microbiana - siempre y cuando la cantidad total de microorganismo recibido por el sujeto en cualquier momento específico (por ejemplo cada periodo de 24 horas) es de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo, preferentemente de 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo.

De acuerdo con la presente invención una cantidad eficaz de al menos una cepa de un microorganismo puede ser de al menos 10^6 CFU de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis.

En una realización, preferentemente la bacteria ácido láctica y/o *Bifidobacterium* usada de acuerdo con la presente invención (tal como una cepa de *Lactobacillus* spp.; por ejemplo una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* y/o *Lactobacillus plantarum* y/o una cepa de *Bifidobacterium* spp., tal como una cepa de *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus salivarius*, por ejemplo la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus* o la cepa 33 de *Lactobacillus salivarius*) tal como una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, por ejemplo la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420)) se puede administrar una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día. Por lo tanto, la cantidad eficaz en esta realización puede ser de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día.

CFU representa "unidades formadoras de colonias". Por 'soporte' se hace referencia al producto alimentario, suplemento dietético buen soporte farmacéuticamente aceptable.

40 *Sujetos / Indicaciones Médicas*

Las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se administran a un mamífero, incluyendo por ejemplo ganado (incluyendo vacas, caballos, cerdos, pollos y ovejas), y seres humanos. En algunos aspectos de la presente invención el mamífero es un animal de compañía (incluyendo mascotas), tal como un perro o un gato por ejemplo. En algunos aspectos de la presente invención, el sujeto puede ser de forma adecuada un ser humano.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que pertenece la presente invención son capaces de disminuir los niveles de lipopolisacáridos (LPS) en plasma sanguíneo. Este hallazgo confiere a las bacterias el potencial de utilidad en el tratamiento de endotoxemia, en particular endotoxemia metabólica.

El LPS es un componente principal de la pared celular de las bacterias gram-negativas, que se produce en el intestino como un componente de la microbiota gram-negativa pero también como LPS libre. La reducción de la endotoxemia metabólica puede resultar de la reducción de la translocación de las bacterias gram-negativas en el hospedador, reducción de la absorción del LPS libre por el hospedador, o aumento de la eliminación de LPS por el hospedador.

En la presente memoria descriptiva, el término 'endotoxemia' cuando se usa solo se refiere a la presencia de un nivel elevado de lipopolisacáridos (también conocidos como endotoxinas) en el cuerpo (en particular, aunque no exclusivamente, en plasma sanguíneo) cuando se compara con los niveles basales de lipopolisacárido. El término 'endotoxemia' cuando se usa solo pretende incluir tanto endotoxemia metabólica, definirá con más detalle a continuación, y endotoxemia de otras etiologías, tales como endotoxemia causada por infecciones patógenas (especialmente infecciones bacterianas) o endotoxemia causada por crecimiento excesivo de bacterias del intestino delgado (SIBO).

En algunas realizaciones, las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se usan para tratar endotoxemia metabólica. En un aspecto, la expresión 'endotoxemia metabólica' se refiere a endotoxemia (como se ha definido anteriormente) inducida por una dieta con alto contenido de grasa. La expresión 'dieta con alto contenido de grasa' se define con más detalle a continuación.

5 En un aspecto, la expresión 'endotoxemia metabólica' se refiere a un aumento del nivel de lipopolisacáridos en el cuerpo del mamífero (en particular, aunque no exclusivamente, en plasma sanguíneo) en un factor que varía de 1,5 a 20, preferentemente de 2 a 10, tal como de 2 a 4, preferentemente de 2 a 3,5, en comparación con los niveles basales (normal) de lipopolisacárido de mamífero. El aumento de los niveles de lipopolisacárido generalmente se mide con el ensayo de amebocitos de *Limulus*, un ensayo bien conocido por las personas con experiencia en la materia.

15 Por el contrario, en el caso de endotoxemia causada por infecciones patogénicas, tales como infecciones bacterianas (endotoxemia por shock séptico), los niveles de LPS en el cuerpo del mamífero, especialmente el cuerpo humano (en particular, aunque no exclusivamente, en la sangre) generalmente aumentan en un factor mayor que 20, tal como mayor que 30, preferentemente mayor que 50, tal como mayor que 70, tal como mayor que 100, tal como mayor que 150, tal como mayor que 200 veces en comparación con los niveles basales (normal) de lipopolisacárido de mamífero.

20 Los niveles basales de lipopolisacáridos en seres humanos generalmente están en el intervalo de 1-2 Unidades de Endotoxina (EU) por ml, tal como se mide con el ensayo de amebocitos de *Limulus*, un ejemplo del cual es el ensayo de extracto de amebocitos de *Limulus* con el ensayo Cinético-QCL (Bio Whittaker, Cambrex BioScience).

25 Por lo tanto en un aspecto alternativo, la expresión 'endotoxemia metabólica' se refiere a un nivel de lipopolisacáridos en el cuerpo (en particular, aunque no exclusivamente, en plasma sanguíneo) que varía de 1,5 a 40, preferentemente de 2 a 20, tal como de 2 a 8, preferentemente de 2 a 7, Unidades de Endotoxina (EU)/ml, tal como se mide con el ensayo de extracto de amebocitos de *Limulus*.

30 Por el contrario, en el caso de endotoxemia causada por infecciones patogénicas, tales como infecciones bacterianas (endotoxemia por shock séptico), los niveles de LPS en el cuerpo del mamífero, especialmente el cuerpo humano (en particular, aunque no exclusivamente, en la sangre) generalmente son mayores que 40, tal como mayores que 60, preferentemente mayores que 100, tal como mayores que 140, tal como mayores que 200, tal como mayores que 300, tal como mayores que 400 EU/ml, tal como se mide con el ensayo de extracto de amebocitos de *Limulus*. Los presentes inventores también han encontrado de forma sorprendente que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente divulgación pueden reducir en nivel de bacterias en tejidos metabólicamente muy importantes, el tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo subcutáneo, ganglio linfático mesentérico y ganglio linfático subcutáneo, y el hígado y bazo. Esto confiere el potencial para que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente divulgación se puedan usar para prevenir o tratar la translocación bacteriana en tejidos y evitar o tratar la endotoxemia metabólica.

40 En realizaciones particularmente preferentes, las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente divulgación se pueden usar para reducir los niveles de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en el tejido adiposo mesentérico y la clase *Bacteroidetes* en el tejido hepático. Estos dos grupos bacterianos principales contienen LPS como un componente de la pared celular bacteriana y por lo tanto actúan como fuente potencial de LPS en plasma elevado, que está asociado con la endotoxemia metabólica. Estos tejidos desempeñan un papel particularmente importante en la endotoxemia metabólica y otras enfermedades metabólicas, dado que el LPS causó inflamación en estos tejidos, lo que conduce de forma potencial a una cascada de sucesos adversos que incluyen alteración del metabolismo de la glucosa y reducción de la sensibilidad a la insulina.

45 Los presentes inventores también han encontrado de forma sorprendente que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención son capaces de regular la absorción de lípidos. Sin desear quedar limitado a la teoría, se cree que, como los LPS se transportan principalmente en los lípidos, la regulación de la absorción de lípidos reduce la cantidad de bacterias y, por lo tanto, la cantidad de LPS que pasan la barrera intestinal. Esto confiere la posibilidad de que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se usen para prevenir el paso de los LPS en tejidos y, por lo tanto, para prevenir o tratar la endotoxemia metabólica.

50 Además, los presentes inventores han encontrado de forma sorprendente que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención son capaces de reducir la adhesión bacteriana gram-negativa elevada en el tracto gastrointestinal. Sin desear quedar limitado a la teoría, se cree que la reducción de la adhesión bacteriana gram-negativa elevada reduce la cantidad de bacterias y, por lo tanto, la cantidad de LPS que pasan la barrera intestinal. Esto confiere la posibilidad de que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* se usen para prevenir el paso de los LPS en tejidos y, por lo tanto, para prevenir o tratar la endotoxemia metabólica.

65 Las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención son adecuadas para su administración a mamíferos tanto diabéticos como obesos. También podrían ser adecuadas para mamíferos

diabéticos y no obesos, así como para mamíferos obesos que poseen los factores de riesgo para diabetes, pero que aún no están en un estado diabético. Este aspecto se discute con más detalle a continuación.

5 En realizaciones preferentes, la condición que se está tratando o previniendo está inducida por la dieta y/o asociada a la dieta. Los presentes inventores han encontrado de forma sorprendente que las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para tratar una serie de afecciones inducidas por la dieta y/o asociadas a la dieta, como se describe con más detalle en el presente documento.

10 En particular, el uso de bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacterias* de acuerdo con la presente invención es adecuado para el tratamiento de mamíferos que ingieren una dieta con alto contenido de grasa. Este aspecto se discute con más detalle a continuación.

15 Las composiciones son adecuadas para su uso en pacientes obesos y diabéticos. En la presente memoria descriptiva, el término 'diabetes' incluye todas las formas de diabetes que, como se ha indicado anteriormente, se caracteriza por un metabolismo desordenado y un nivel anómalamente alto de azúcar en sangre (hiperglucemia) como resultado de niveles insuficientes de la hormona insulina. Por lo tanto, el término incluye diabetes de Tipo 1, diabetes de Tipo 2, diabetes gestacional y alteración de la tolerancia a la glucosa. La diabetes de Tipo 1 se caracteriza por la pérdida de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que conduce a una deficiencia de insulina. La diabetes mellitus de Tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina o reducción de la sensibilidad a la insulina, combinada con una reducción de la secreción reducida de insulina. La diabetes gestacional se define formalmente como "cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo". La Alteración de la Tolerancia a la Glucosa (IGT) es un estado pre-diabético de disglucemia que está asociado a la resistencia a la insulina y un aumento del riesgo de patología cardiovascular. De acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud y la Asociación Americana de Diabetes, la alteración de la tolerancia a la glucosa se define como niveles de glucosa a las dos horas de 140 a 199 mg por dl (de 7,8 a 11,0 mmol) en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral de 75 g. Se dice que un paciente está con la afección de IGT cuando tiene un nivel de glucosa elevado de manera intermedia después de 2 horas, pero menos de lo que podría calificar para la diabetes mellitus de tipo 2. La glucosa en ayunas puede ser normal o ligeramente elevada. La IGT puede preceder a la diabetes mellitus de tipo 2 durante muchos años. La IGT también es un factor de riesgo para la mortalidad.

35 En la presente memoria descriptiva, el término obesidad está relacionado con el índice de masa corporal (IMC). El índice de masa corporal (IMC) (calculado como peso en kilogramos dividido entre el cuadrado de la altura en metros) es la medida más comúnmente aceptada para sobrepeso y/u obesidad. Un IMC que supera 25 se considera sobrepeso. La obesidad se define como un IMC de 30 o más, con un IMC de 35 o más siendo considerado como obesidad de comorbilidad grave y un IMC de 40 o más obesidad mórbida.

40 Como se ha indicado anteriormente, el término "obesidad" como se usa en el presente documento incluye obesidad, obesidad de comorbilidad y obesidad mórbida. Por lo tanto, el término "obeso" tal como se usa en el presente documento se puede definir como un sujeto que tiene un IMC mayor que o igual a 30. En algunas situaciones, de forma adecuada un sujeto obeso puede tener un IMC mayor que o igual a 30, de forma adecuada 35, de forma adecuada 40.

45 Aunque la composición de la invención es particularmente adecuada para uso en pacientes que son tanto diabéticos como obesos, la composición también es adecuada para aquellos que son diabéticos pero no obesos. También puede ser adecuada para pacientes obesos que posean los factores de riesgo de diabetes, pero que aún no están en un estado diabético, ya que se podría esperar que una persona obesa (pero no diabética) pudiera limitar las consecuencias metabólicas de su obesidad, es decir, la diabetes o al menos un desarrollo de resistencia a la insulina.

50 En la presente memoria descriptiva el término "tratamiento" o "que trata" se refiere a cualquier administración de las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* de acuerdo con la presente invención e incluye: (1) prevenir que la enfermedad especificada se produzca en un animal que pueda estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no experimenta ni presenta la patología o sintomatología de la enfermedad (incluyendo la prevención de uno o más factores de riesgo asociados con la enfermedad); (2) inhibir la enfermedad en un animal que está experimentando o presentando la patología o sintomatología del sujeto enfermo (es decir, detener un desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología), o (3) mejorar la enfermedad en un animal que está experimentando o presentando la patología o sintomatología del sujeto enfermo (es decir, invertir la patología y/o sintomatología).

60 *Dieta*

65 Como se ha indicado anteriormente, los mamíferos diabéticos y/o obesos tratados con bacterias de acuerdo con la presente invención pueden continuar ingiriendo una dieta con alto contenido de grasa a la vez que se mitigan las consecuencias metabólicas de su afección o afecciones. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'dieta con alto contenido de grasa' se refiere a una dieta que generalmente contiene al menos un 20 %, preferentemente al menos un 25 %, tal como al menos un 30 %, por ejemplo al menos un 35 %, tal como al menos un 40 %, por

ejemplo al menos un 45 %, tal como al menos un 50 %, por ejemplo al menos un 55 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, tal como al menos un 70 %, por ejemplo al menos un 75 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 % de calorías a partir de la grasa.

5 En algunas realizaciones, los mamíferos diabéticos y/o obesos tratados con bacterias de acuerdo con la presente invención pueden ingerir una dieta con alto contenido de carbohidratos a la vez que se mitigan las consecuencias metabólicas de su afección o afecciones. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'directa con alto contenido de carbohidratos' se refiere a una dieta que generalmente contiene al menos un 50 %, por ejemplo al menos un 55 %, tal como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, tal como al menos un 70 %, por ejemplo al menos un 75 %, tal como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, tal como al menos un 90 % de calorías a partir del carbohidrato.

Composiciones

15 Aunque es posible administrar bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* solas de acuerdo con la presente invención, las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* se administran general y preferentemente sobre o en un soporte como parte de un producto, en particular como un componente de un producto alimentario, un suplemento dietético o una formulación farmacéutica. Estos productos generalmente contienen componentes adicionales bien conocidos por las personas con experiencia en la materia.

20 En la presente invención se puede usar cualquier producto que pueda beneficiarse de la composición. Estos incluyen, pero no se limitan a, alimentos, en particular conservas de fruta y productos lácteos y productos obtenidos a partir de alimento lácteo, y productos farmacéuticos. En el presente documento las bacterias ácido láctica se pueden denominar "la composición de la presente invención" o "la composición".

Alimento

25 En una realización, las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* se usan de acuerdo con la invención en un producto alimentario tal como un suplemento alimentario, una bebida o un polvo a base de leche. En el presente documento, el término "alimento" se usa en un sentido amplio – y cubre alimento para seres humanos así como alimento para animales (es decir, una alimentación). En un aspecto preferente, el alimento es para consumo humano.

30 El alimento se puede presentar en forma de una solución o en forma de un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

35 Cuando se usa como, o en la preparación de, un alimento, tal como un alimento funcional, la composición de la presente invención se puede usar en conjunto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un agente nutricionalmente activo.

40 A modo de ejemplo, la composición de la presente invención se puede usar como un ingrediente para refrescos, un zumo de fruta o una bebida que comprende proteína de suero de leche, té saludables, bebidas de cacao, bebidas lácteas y debidas con bacterias ácido lácticas, yogur y yogur para beber, quesos, helado, helados de hielo y postres, confitería, bizcochos, tartas y mezclas para pasteles, alimentos de aperitivo, comidas y bebidas equilibradas, rellenos de frutas, glaseados, rellenos de panadería de chocolate, rellenos con sabor a carta de queso, rellenos de tartas con sabor a frutas, glaseado para tarta y donut, cremas de relleno de panadería instantánea, rellenos para galletas, relleno de panadería listo para usar, relleno de calorías reducidas, bebida nutricional para adultos, bebida de soja/zumo acidificada, bebida de chocolate aséptica/mezclada, mezclas de barra, bebidas en polvo, leche de soja/pura y de chocolate enriquecida con calcio, bebida de café enriquecida con calcio.

50 La composición se puede usar adicionalmente como un ingrediente en productos alimentarios tales como salsa de queso americana, agente antiaglomerante para queso rallado y troceado, salsa de patatas fritas, crema de queso, crema agria sin grasa con aderezo dulce batida mezclada en seco, crema dulce láctea para congelar/descongelar, aderezo batido estable a la congelación/descongelación, queso cheddar natural con bajo contenido de grasa y ligero, yogur de estilo suizo con bajo contenido de grasa, postres congelados aireados, helado de envase duro, de etiqueta ecológica, economía mejorada y satisfacción del helado de envase duro, helado con bajo contenido de grasa: helado de crema, salsa barbacoa, salsa de queso para mojar, aderezo de queso cottage, salsa Alfredo en mezcla seca, salsa de queso mezcla, salsa de tomate de mezcla seca y otros.

60 La expresión "producto lácteo" tal como se usa en el presente documento se refiere a la inclusión de un medio que comprende leche de origen animal y/o vegetal. Como leche de origen animal se puede mencionar la leche de vaca, oveja, cabra o búfalo. Como leche de origen vegetal se puede mencionar cualquier sustancia fermentable de origen vegetal que se pueda usar de acuerdo con la invención, en particular que tenga su origen en sojas, arroz o cereales.

65 Aún más preferentemente el producto alimentario usado de acuerdo con la invención es una leche fermentada o leche humanizada.

Para ciertos aspectos, la presente invención se puede usar preferentemente en conexión con la producción de yogur, tal como de vida de yogur fermentado, yogur, yogur para beber, queso, crema fermentada, postres a base de leche y otros.

5 De forma adecuada, la composición se puede usar adicionalmente como un ingrediente en una o más aplicaciones de queso, aplicaciones de carne, o aplicaciones que comprenden cultivos protectores.

10 La presente invención también proporciona un método para preparar un alimento o un ingrediente alimentario, método que comprende la mezcla de la composición de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente alimentario.

15 De forma ventajosa, la presente invención se refiere a productos que se han puesto en contacto con la composición de la presente invención (y opcionalmente con otros componentes/ingredientes), en los que la composición se usa en una cantidad que pueda mejorar los beneficios nutricionales y/o de salud del producto.

20 Como se usa en el presente documento la expresión "poner en contacto" se refiere a la aplicación indirecta o directa de la composición de la presente invención al producto. Los ejemplos de los métodos de aplicación que se pueden usar, incluyen, pero no se limitan a, tratar el producto en un material que comprende la composición, aplicación directa mediante mezcla de la composición con el producto, pulverización de la composición sobre la superficie del producto o inmersión del producto en una preparación de la composición.

25 Cuando el producto de la invención es un alimento comestible, la composición de la presente invención se mezcla preferentemente con el producto. Como alternativa, la composición se puede incluir en la emulsión o ingredientes sin procesar de un alimento comestible. En una alternativa adicional, la composición se puede aplicar como a condimento, glaseado, mezcla colorante, y similares. Para algunas aplicaciones, es importante que la composición se haga disponible sobre o con respecto a la superficie de un producto al que va a afectar/tratar. Esto permite que la composición transmita una o más de las siguientes características favorables: beneficios de nutrición y/o salud.

30 Las composiciones de la presente divulgación se pueden aplicar para entremezclar, revestir y/o impregnar un producto con una cantidad controlada de un microorganismo viable.

35 Preferentemente, la composición se usa para fermentar leche o leche enriquecida con sacarosa o medios lácticos con sacarosa y/o maltosa en la que los medios resultantes que contienen todos los componentes de la composición - es decir, dicho microorganismo de acuerdo con la presente divulgación - se pueden añadir como un ingrediente a la leche para yogur en concentraciones adecuadas - tal como por ejemplo en concentraciones en el producto final que ofrecen una dosis diaria de 10^6 - 10^{10} cfu. El microorganismo de acuerdo con la presente divulgación se puede usar antes o después de la fermentación del yogur.

40 Para algunos aspectos, los microorganismos de acuerdo con la presente divulgación se usan como, o en la preparación de, alimentos para animales, tal como alimentos para ganado, en particular alimentos para aves (tales como pollo), o alimentos para mascotas.

45 De forma ventajosa, cuando el producto es un producto alimentario, las bacterias ácido lácticas deberían permanecer eficaces durante el periodo de la fecha normal de "caducidad de venta" o "caducidad" durante la cual el minorista ofrece el producto alimentario para su venta. Preferentemente, el tiempo eficaz se debería extender después de tales fechas hasta el final del periodo de frescura normal cuando el deterioro del alimento empieza a ser evidente. Los periodos de duración deseados y el periodo de almacenamiento normal variarán de alimento comestible a alimento comestible las personas con una experiencia habitual en la materia reconocerán que los periodos de almacenamiento variarán dependiendo del tipo de alimento comestible, el tamaño del alimento comestible, temperaturas de almacenamiento, condiciones de procesamiento, material de envasado y equipo de envasado.

Ingrediente Alimentario

55 La composición de la presente invención se puede usar como un ingrediente alimentario y/o ingrediente de alimentación.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "ingrediente alimentario" o "ingrediente de alimentación" incluye una formulación que es o qué se puede añadir a alimentos funcionales o alimentos comestibles como un suplemento nutricional. El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Suplementos Alimentarios

65 La composición de la presente invención puede ser - o se puede añadir a - suplementos alimentarios (en el presente documento también denominados suplementos dietéticos).

Alimentos Funcionales

La composición de la presente invención puede ser - o se puede añadir a - alimentos funcionales.

5 Como se usa el presente documento, la expresión "alimento funcional" se refiere a un alimento que puede proporcionar no solamente un efecto nutricional, sino que también puede proporcionar al consumidor un efecto beneficioso adicional.

10 Por consiguiente, los alimentos funcionales son alimentos habituales que tienen componentes o ingredientes (tales como los que se describen en el presente documento) incorporados en los mismos que transmiten al alimento una funcionalidad específica - por ejemplo beneficio médico o físico – además de un efecto simplemente nutricional.

15 Aunque no hay una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes con interés en este área están de acuerdo en que se trata de alimentos comercializados con efectos de salud específicos más allá de los efectos nutricionales básicos.

20 Algunos alimentos funcionales son agentes nutracéuticos. En el presente documento, la expresión "agente nutracéutico" se refiere a un alimento que puede proporcionarnos solamente un efecto nutricional y/o una satisfacción de sabor, sino que también puede proporcionar al consumidor un efecto terapéutico (u otro efecto beneficioso). Los agentes nutracéuticos cruzan las líneas de división tradicionales entre alimentos y medicina.

Medicamento

25 El término "medicamento" como se usa en el presente documento incluye medicamentos para uso tanto humano como animal en medicina humana y veterinaria. Además, el término "medicamento" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que proporciona un efecto terapéutico y/o beneficios. El término "medicamento" como se usa en el presente documento no está limitado necesariamente a sustancias que necesitan una Aprobación de Marketing, pero pueden incluir sustancias que se pueden usar en cosméticos, agentes nutracéuticos, alimento (incluyendo alimentos y bebidas por ejemplo), cultivos probióticos, y remedios naturales.

30 Además, el término "medicamento" como se usa en el presente documento incluye un producto diseñado para su incorporación en alimentación animal, por ejemplo alimentación de ganado y/o alimento de mascotas.

Agente farmacéutico

35 La composición de la presente invención se puede usar como - o en la preparación de – un agente farmacéutico. En el presente documento, la expresión "agente farmacéutico" se usa en un sentido amplio – y cubre agentes farmacéuticos para seres humanos así como agentes farmacéuticos para animales (es decir, aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferente, el agente farmacéutico es para uso humano y/o para cría de animales.

40 El agente farmacéutico puede ser para fines terapéuticos – que pueden ser de naturaleza curativa o paliativa o preventiva. El agente farmacéutico puede ser incluso para fines de diagnóstico.

45 Un soporte farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo un soporte en forma de comprimidos formados mediante compresión, comprimidos, cápsulas, pomadas, supositorios o soluciones que se pueden beber. A continuación se proporcionan otras formas adecuadas.

50 Cuando se usa como - o en la preparación de – un agente farmacéutico, la composición de la presente invención se puede usar en conjunto con uno o más de: un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, un ingrediente farmacéuticamente activo.

El agente farmacéutico puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

55 Las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se pueden usar como ingredientes farmacéuticos. En el presente documento, la composición puede ser el único componente activo o puede ser al menos uno de un número (es decir, 2 o más) de componentes activos.

60 El ingrediente farmacéutico puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

65 Las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se pueden usar en cualquier forma adecuada – ya sea cuando están solos o cuando están presentes en una combinación con otros componentes o ingredientes. En el presente documento las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se pueden denominar "la composición". De forma análoga, las combinaciones que comprenden la composición de la presente invención y otros componentes y/o ingredientes (es decir, ingredientes - tales como

ingredientes alimentarios, ingredientes alimentarios funcionales o ingredientes farmacéuticos) se pueden usar en cualquier forma adecuada.

5 Las bacterias ácido lácticas y/o *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención se pueden usar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de las mismas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos y polvos que se pueden humectar, secar por pulverización o liofilizar. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas, suspensiones y emulsiones.

10 Los ejemplos adecuados de formas incluyen uno o más de: comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

15 A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en una forma de comprimido – tal como para uso como un ingrediente funcional – los comprimidos también pueden contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina; agentes disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos; aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábica; pueden estar incluidos agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

20 Los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, gelatina de petróleo, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácido graso, ésteres de ácido graso petroetral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

25 Los excipientes preferentes para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.

30 Para suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o saborizantes, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

35 Las formas también pueden incluir cápsulas de gelatina; cápsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.; o incluso bebidas de fibra.

40 Los ejemplos adicionales de forma incluyen cremas. Para algunos aspectos, el microorganismo usado en la presente invención se puede usar en cremas farmacéuticas y/o cosméticas tales como cremas solares y/o cremas para después del sol por ejemplo.

45 En un aspecto, la composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar en un aerosol, por ejemplo por medio de una pulverización nasal, por ejemplo para su administración al tracto respiratorio.

Prebióticos

50 La composición de la presente invención puede contener adicionalmente uno o más prebióticos. Los prebióticos son una categoría de alimento funcional, definidos como ingredientes alimentarios no digeribles que influyen de forma beneficiosa en el hospedador al estimular de forma selectiva de crecimiento y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias (en particular, aunque no exclusivamente, probióticos, *Bifidobacteria* y/o bacterias ácido lácticas) en el colon, y de ese modo mejoran la salud del hospedador. Por lo general, los prebióticos son carbohidratos (tales como oligosacáridos), pero la definición no excluye a los que no son carbohidratos. Las formas más prevalentes de prebióticos se clasifican nutricionalmente como fibra soluble. En cierta medida, muchas formas de fibra dietética presentan un cierto nivel de efecto prebiótico.

55 En una realización, un prebiótico es un ingrediente fermentado de forma selectiva que permite cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad en la microflora gastrointestinal que confiere beneficios de bienestar y salud en el hospedador.

60 De forma adecuada, el prebiótico se puede usar de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 0,01 a 100 g / día, preferentemente de 0,1 a 50 g / día, más preferentemente de 0,5 a 20 g / día. En una realización, el prebiótico se puede usar de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 1 a 100 g / día, preferentemente de 2 a 9 g / día, más preferentemente de 3 a 8 g / día. En otra realización, el prebiótico se puede usar de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 5 a 50 g / día, preferentemente de 10 a 25 g / día.

65

Los ejemplos de fuentes dietéticas de prebióticos incluyen sojas, fuentes de inulina (tales como alcachofa de Jerusalén, jícama, y raíz de achicoria), avena sin procesar, trigo sin refinar, cebada y yacón sin refinar.

Los ejemplos de prebióticos adecuados incluyen alginato, xantano, pectina, goma de algarrobo (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), polidextrosa (es decir, Litesse®), lactitol, lactosacarosa, oligosacáridos de soja, isomaltulosas (Palatinose™), isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, mano-oligosacáridos, beta-glucanos, celobiosa, rafinosa, gentiobiosa, melibiosa, xilobiosa, ciclodextrinas, isomaltosa, trehalosa, estaquiosa, panosa, pululano, verbascosa, galactomananos, y todas las formas de almidones resistentes. Un ejemplo particularmente preferente de un prebiótico es la polidextrosa.

Además en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una combinación de:

- (a) una bacteria ácido láctica, una *Bifidobacterium* o una mezcla de cualquiera de las mismas; y
- (b) un prebiótico;

en la fabricación de un producto alimentario, suplemento dietético o medicamento para reducir los niveles de insulina en ayunas en un mamífero.

Además en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una combinación de:

- (a) una bacteria ácido láctica, una *Bifidobacterium* o una mezcla de cualquiera de las mismas; y
- (b) un prebiótico;

en la fabricación de un producto alimentario, suplemento dietético o medicamento para aumentar la secreción de insulina en estado con alimento en un mamífero.

Dentro del alcance de la presente invención se prevé que las realizaciones de la invención se pueden combinar de modo que las combinaciones de cualquiera de las características que se describen en el presente documento están incluidas dentro del alcance de la presente invención. En particular, dentro del alcance de la presente invención se prevé que cualquiera de los efectos terapéuticos de las bacterias se puede presentar de forma simultánea.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Modelo animal y tratamiento probiótico

Una población base de cincuenta ratones C57Bl/6 macho de 10 semanas de edad se alimentaron con una Comida Normal (NC) (A03, SAFE, Augy, Francia), o una dieta con alto contenido de grasa (HFD) (que comprendía un 72 % de grasa (aceite de maíz y grasa), un 28 % de proteína y < 1 % de carbohidratos) (SAFE, Augy, Francia) durante 4 semanas. Esta dieta tiene la ventaja peculiar de que induce diabetes antes del inicio de la obesidad (véase por ejemplo Cani *et al.*, 2008 "Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding". *Pathol Biol (Paris)*; Cani *et al.*, *Diabetes*, 2008, 57, 1470-81; Knauf *et al.*, *Endocrinology* 2008, 149, 4768-77; Cani *et al.*, *Diabetologia* 2007, 50, 2374-83; Cani *et al.*, *Diabetes* 2007, 56, 1761-1772 y Turini *et al.*, *Swiss Med Wkly* 2007, 137, 700-4).

Después de la alimentación con la dieta con alto contenido de grasa (antes de la alimentación con probiótico), los ratones se sometieron a un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. El área bajo la curva se calculó y los ratones se enviaron de forma homogénea de acuerdo con los diferentes grupos experimentales o diez ratones por grupo (10 ratones por grupo). Los datos mostraron que todos los ratones estaban en un estado diabético antes de la alimentación con probiótico. Los ratones fueron alimentados durante cuatro semanas más con una comida normal (n = 10) o una HFD (n = 40). Los ratones con la dieta HFD se trataron diariamente durante 4 semanas con uno de los siguientes:

1. Tratado con vehículo
2. La cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B420) (10⁹/bacterias por ratón)
3. *Lactobacillus acidophilus* NCFM (NCFM) (10⁹/bacterias por ratón),
4. NCFM + B420 (5x10⁸ B420 + 5x10⁸ NCFM por ratón).

Los ratones se alojaron en un entorno controlado (ciclo de luz del día de 12 h invertido, luz apagada a las 10:00 a.m.).

Endotoxemia y plasma CD14

Las muestras de sangre se recogieron de los ratones al final de los tratamientos con probiótico o de control. El ensayo de endotoxina basado en un extracto de amebocitos de *Limulus* con ensayo Cinético-QCL (Bio Whittaker, Cambrex BioScience) se usó para la cuantificación de LPS en plasma (endotoxemia) – se trata de un ensayo cuantitativo, cinético para la detección de endotoxina bacteriana Gram-negativa. Los sueros se diluyen de 1/20 a 1/100 y se calientan durante rondas de 10 min a 70 °C. El límite inferior de detección de LPS fue de 0,001 Unidades de Endotoxina/ml. El plasma sCD14, el receptor de LPS, se midió usando un método inmunoenzimático (IBL, GmbH, Hamburgo, Alemania).

Cuantificación de ADN microbiano en tejidos de ratón

Después del sacrificio, los siguientes tejidos de ratón se recogieron de forma aséptica: tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo subcutáneo, e hígado. Los tejidos se congelaron de forma instantánea y se mantuvieron congelados hasta su análisis. Antes de la extracción del ADN, los tejidos se homogeneizaron usando un aparato de lisis de muestras biológicas automático Precellys 24 (Bertin Technologies, Tarnos, Francia). Las muestras se pesaron y se diluyeron con 1,4 ml de Tampón ASL (Qiagen, Hilden, Alemania) en tubos CK14 que contenían perlas de cerámica (Bertin). Las muestras se molieron con perlas durante 3 x 30 segundos a 6.800 rpm y se mantuvieron en hielo entre las realizaciones. El sobrenadante se recogió y se transfirió a tubos VK01 que contenían polvo de vidrio (Bertin) y el proceso de molienda se repitió. El sobrenadante se recogió de nuevo se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml. El ADN bacteriano se aisló se purificó usando el Kit QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ADN bacteriano se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos de grupo o género. Los grupos bacterianos diana (y los cebadores y condiciones usados) fueron: *Bacteria* de dominio total (sin publicar), familia *Enterobacteriaceae* (Matsuda *et al.*, App. Env. Microbiol., 2007, 73, 32-39), género *Bifidobacterium* (Mäkivuo *et al.*, Nutrition and Cancer 2005, 52 (1), 93-103), género *Lactobacillus* (Walter *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 2578-2585, Heilig *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 114-123), clase *Bacteroidetes* y género *Enterococcus* (Rinttilä *et al.*, J. Appl. Microbiol., 2004, 97, 1166-1177). El equipo usado para el análisis de PCR cuantitativa fue el Sistema de PCR en tiempo Real 7500 FAST de Applied Biosystems o el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Los resultados se expresaron como log células por gramo de tejido por encima del límite de detección de cada grupo bacteriano en cada tejido. Los límites de detección se determinaron por separado para cada grupo bacteriano en cada tipo de tejido.

Resultados

Endotoxemia y plasma CD14

La dieta con alto contenido de grasa (HFD) se asoció con 2-3 veces el promedio de aumento en comparación con la endotoxemia basal (nivel basal de LPS en plasma) de los ratones alimentados con comida normal (NC) (Figura 1). Este aumento de LPS en plasma asociado con una dieta con alto contenido de grasa se define como endotoxemia metabólica.

Todos los tratamientos probióticos fueron capaces de reducir la endotoxemia metabólica de forma significativa en los ratones e invertir los efectos adversos de la dieta con alto contenido de grasa. El nivel promedio de sCD14 en plasma, el receptor principal de LPS, de los ratones tratados con probióticos y dieta con alto contenido de grasa fue de aproximadamente cuatro veces más bajo que el de los ratones que recibieron dieta con alto contenido de grasa solamente.

Tomados en conjunto, los resultados demuestran que el tratamiento probiótico reduce la endotoxemia metabólica y además reduce los receptores circulantes de LPS, que también son elevados con la dieta con alto contenido de grasa. El LPS es un componente principal de la pared celular de las bacterias gram-negativas, que se produce en el intestino como un componente de la microbiota gram-negativa pero también como LPS libre. La reducción de la endotoxemia metabólica puede resultar de la reducción de la translocación de bacterias gram-negativas en el hospedador, reducción en la absorción del LPS libre por el hospedador, o aumento de la eliminación de LPS por el hospedador. Por lo tanto, los probióticos se pueden usar como un método innovador para prevenir o tratar la endotoxemia metabólica.

Reducción de translocación bacteriana en tejidos

La dieta con alto contenido de grasa se asoció con niveles elevados de ADN bacteriano en los tejidos, en comparación con la comida normal. El impacto fue particularmente evidente en el tejido adiposo mesentérico, en el que niveles elevados de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 2), género *Enterococcus* (Figura 3), género *Lactobacillus* (Figura 4) y *Bacterium* de Dominio total (Figura 6) se asociaron con la dieta con alto contenido de grasa. En el tejido adiposo subcutáneo, se detectaron niveles elevados de clase *Bacteroidetes* en ratones

alimentados con una dieta con alto contenido de grasa (Figura 5). El género *Bifidobacterium* no se detectó en cantidades significativas en ninguno de los tejidos.

El tratamiento probiótico redujo de forma significativa los niveles de ADN bacteriano en los tejidos. En el tejido adiposo mesentérico, el tratamiento con B420 redujo de forma significativa el nivel de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 2), y el tratamiento con NCFM mostró una tendencia hacia la reducción de niveles de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 2) y el género *Lactobacillus* (Figura 4). En el hígado, la combinación de NCFM y B420 presenta una tendencia a reducir el nivel del género *Lactobacillus* (Figura 4), mientras que el tratamiento con NCFM solo presenta una tendencia a reducir los niveles de la clase *Bacteroidetes* (Figura 5) y el *Bacterium* de Dominio (Figura 6), y el tratamiento con B420 presenta una tendencia a reducir los niveles de la clase *Bacteroidetes* (Figura 5). También se observaron tendencias hacia abajo estadísticamente no significativas para otras bacterias y tejidos (Figuras 2 a 6).

Los resultados demuestran que el tratamiento probiótico puede reducir el nivel de bacterias en tejidos metabólicamente muy importantes, el tejido adiposo mesentérico y el hígado. De ese modo, los probióticos se pueden usar como un método innovador para prevenir o tratar la translocación bacteriana en tejidos, asociado con una dieta con alto contenido de grasa y endotoxemia metabólica. En particular la reducción de la familia *Enterobacteriaceae* en el tejido adiposo mesentérico y la clase *Bacteroidetes* en el tejido hepático puede ser fisiológicamente importante. Estos dos grupos bacterianos principales contienen LPS como un componente de la pared celular bacteriana y por lo tanto actúan como fuente potencial de LPS en plasma elevado, que está asociado con la endotoxemia metabólica. Estos tejidos desempeñan un papel particularmente importante en la endotoxemia metabólica y otras enfermedades metabólicas, ya que el LPS causa inflamación en estos tejidos, conduciendo potencialmente una cascada de sucesos adversos que incluyen alteración del metabolismo de la glucosa y reducción de la sensibilidad a la insulina.

Ejemplo 2

Introducción

El objeto de este estudio fue determinar en ratones el efecto de una alimentación con alto contenido de grasas en la flora intestinal, translocación bacteriana y glucemia, así como el papel protector potencial de la cepa NCFM™ de *Lactobacillus acidophilus* (NCFM™) en estos parámetros.

Materiales y métodos

Se indujeron obesidad y diabetes en ratones macho C57BL/6 mediante una dieta para animales con alto contenido de grasa (60 % de grasa, HFD). Los ratones de control recibieron una dieta convencional (4 % de grasa, LFD). Desde las 19 semanas de edad, estos ratones recibieron 10⁹ CFU/día de la cepa NCFM™ de *Lactobacillus acidophilus* durante 3 semanas. La glucemia en ayunas se midió antes y después del tratamiento con la cepa NCFM™.

Un ensayo de sensibilidad a la insulina intraperitoneal se realizó el día antes del sacrificio. El análisis de la flora adherente colónica y translocación bacteriana se realizó con los siguientes métodos.

Análisis bacteriano

Después de la disección, el colon y el íleon se recogieron. La pared iliaca y el colon se usaron para identificar y cuantificar la flora adherente.

Las muestras se conservaron hasta 2 horas en medio Ringer/Tween 80 en condiciones anaeróbica. Después de homogenización, las muestras se incubaron en Caldo de Cultivo de Cerebro y Corazón para enriquecer e identificar el número más elevado de bacterias anaerobias y aero-anaerobias.

Se realizaron diluciones de 1 a 10 y de 1 a 100 en medio de cisteína de Ringer. Estas diluciones se extendieron en agar Columbia enriquecido con un 5 % de sangre de caballo desfibrinada (CS) y se incubaron a 37 °C en atmósfera aerobia y anaerobia. Se hizo el recuento de las colonias y se identificaron entre 2 y 7 días después de la extensión.

Se usaron tres tipos de medio. Agar en cierto modo no selectivo, agar DCL (Desoxicolato, Citrato, y Lactosa) Para aislar enterobacterias y agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe) específico para *Lactobacillus* spp. La identificación de las bacterias se realizó mediante la determinación del tipo respiratorio, la tinción Gram y las características metabólicas.

Translocación bacteriana

Después de disección, los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y el tejido adiposo mesentérico (MAT) se recogieron. La translocación bacteriana se cuantificó en MLN y MAT.

Las muestras se conservaron hasta 2 horas en medio de Ringer/Tween 80 en condiciones analógicas. Después de homogenización, se inoculó 1 ml de las metas iniciales en caldo de cultivo de enriquecimiento de cerebro-corazón con el fin de disminuir el umbral de detección para muestras con un nivel bacteriano bajo. Los cultivos de enriquecimiento se cubrieron con una capa de parafina con el fin de permitir el crecimiento de bacterias anaerobias incubadas durante cuatro días y se comprobó para crecimiento diario.

Los cultivos positivos se aislaron en placas de agar con sangre de Columbia modificada incubadas 48 h en condiciones anaerobias. Se subcultivaron e identificar diferentes tipos de colonias. Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C. Los recuentos bacterianos se establecieron y expresaron como log CFU/ g de tejido.

Resultados

A las 18 semanas de edad, los ratones con una dieta con alto contenido de grasa (HFD) pesaban un 39 % más que los ratones con la dieta de control (LFD) ($39,2 \pm 3,3$ con respecto a $28,1 \pm 1,1$ g, $p < 0,01$). La hiperglucemia en ayunas aumentó en un 77 % (174 ± 31 con respecto a 98 ± 6 mg/dl, $p < 0,01$), y la sensibilidad a la insulina disminuyó (un 2 con respecto a un 48 % de glucemia disminuyó 60 min después de inyección de insulina) se encontró en el grupo de HFD en comparación con LFD.

La administración de la cepa NCFM™ de *Lactobacillus acidophilus* no modificó la glucemia en ayunas de los ratones con LFD (95 ± 5 mg/dl con respecto a 92 ± 6 mg/dl). Sin embargo, la glucemia de los ratones con HFD disminuyó de forma significativa, lo que tendía hacia la normalización (226 ± 23 mg/dl con respecto a 125 ± 10 mg/dl, $p < 0,02$). Los ratones con HFD tratados con la cepa NCFM™ permanecieron resistentes a la insulina.

Los ratones con HFD presentaron una flora adherente colónica significativamente más abundante (6.5 ± 0.7 con respecto a $4,6 \pm 0,4$ log CFU/g, $p < 0,01$) incluyendo más *Lactobacilli* ($6,0 \pm 0,5$ con respecto a $4,5 \pm 0,2$, $p < 0,01$) y *Enterococci* ($5,4 \pm 0,4$ con respecto a $4,4 \pm 0,2$ log CFU/g, $p < 0,01$). Este exceso se canceló con el tratamiento con la cepa NCFM™ (de nuevo a $5,4 \pm 0,6$ log CFU/g para flora total, $4,3 \pm 0,2$ log CFU/g para *Lactobacilli*, y $4,6 \pm 0,4$ log CFU/g para *Enterococci*). El aumento de las bacterias detectadas en la grasa mesentérica de los ratones con HFD ($3,8 \pm 1,5$ con respecto a $2,2 \pm 0,9$ log CFU/g) se modificó ligeramente con el tratamiento con la cepa NCFM™ ($4,0 \pm 1,2$ log CFU/g). En el colon y el íleon de los ratones con HFD, la flora se diversificó con apariencia de bacterias Gram-negativas, que no se eliminaron con la cepa NCFM™. En los ganglios linfáticos mesentéricos, las bacterias Gram-positivas aparecieron en los ratones con una dieta con alto contenido de grasa, y desaparecieron después del tratamiento con la cepa NCFM™.

Conclusión

La cepa probiótica NCFM™ de *Lactobacillus acidophilus* presenta una tendencia a normalizar la hiperglucemia en ayunas de ratones obesos y diabético. Los últimos presentaban una flora intestinal adherente más abundante y más diversificada que los ratones de control. El tratamiento con la cepa NCFM™ de *Lactobacillus acidophilus* condujo a una disminución de los niveles de bacterias adheridas a la mucosa en el colon, y a una eliminación de las bacterias Gram-positivas potencialmente patogénicas en íleon, colon y ganglios linfáticos mesentéricos.

Ejemplo 3

Medición de translocación de *Escherichia coli* adherente a mucosa y luminal y translocación de *E. coli*

El efecto del tratamiento probiótico en la adhesión mucosal y translocación bacteriana de *E. coli* se determinó mediante cultivo. El modelo de ratón y el tratamiento probiótico usados fueron los mismos que los que se han descrito en el Ejemplo 1 y se ha mencionado anteriormente. Además, se incluyó un grupo que recibía una combinación del probiótico con un componente prebiótico (fructo-oligosacáridos a 0,2 g por animal al día).

Los ratones en ayunas se trataron mediante sonda con 10^9 unidades formadoras de colonias de *E. coli* resistente a ampicilina aislada a partir del ratón y se hicieron resistentes a la ampicilina por medio de un plásmido que expresa el gen de β-lactamasa bajo el control de un promotor procariota. Dos horas después, los ratones se sacrificaron y la mucosa o la abertura interna del duodeno, el yeyuno, el íleon, el ciego y el colon, se recogieron por separado, se diluyeron, se sembraron en placas sobre agarosa que contenía ampicilina y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se hizo el recuento del número de colonias. De forma análoga, la *E. coli* fluorescente resistente a ampicilina se cultivó a partir de tejidos recogidos que incluían hígado, bazo, tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo subcutáneo, ganglios linfáticos mesentéricos y ganglios linfáticos subcutáneos. La concentración de insulina se midió a partir de plasma en estado en ayunas así como el estado con alimento.

Resultados

Con el fin de investigar el papel de la adhesión mucosal en este proceso, la adherencia de *Escherichia coli* comensal resistente a antibióticos en la mucosa intestinal del ratón se cuantificó. La cuantificación de colonias resistentes a antibióticos en una placa de agarosa que se originan a partir de la mucosa o diferentes segmentos de la abertura

interna mostró que la dieta HFD aumentaba los niveles de *E. coli* asociada a la mucosa, pero el tratamiento con la cepa B420 probiótica reducía la adherencia mucosal de *E. coli* inducida por HFD con respecto al yeyuno y el íleon (Figura 7). Aunque los ensayos iniciales no desvelaron cambios en el ciego o en el colon, los ensayos adicionales mostraron que la cepa B420 probiótica reducía la adherencia mucosal de *E. coli* inducida por HFD con respecto al ciego (Figura 8).

El tratamiento con B420 sola o en combinación con un prebiótico también redujo la translocación de *E. coli* en tejidos de ratón incluyendo tejidos que incluían el hígado, bazo, tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo subcutáneo, ganglios linfáticos mesentéricos y ganglios linfáticos subcutáneos (Figura 9). La reducción de la adhesión mucosal y la translocación de *E. coli* iba acompañada con un aumento de los niveles de insulina, en particular, una reducción de los niveles de insulina en estado con alimento y una mejora de la secreción de insulina después de la alimentación (Figura 10).

Ejemplo 4

Reducción de la expresión genética

Materiales y Métodos

Las células Caco-2 (ECACC, Salisbury, Reino Unido) se usaron como modelo para células epiteliales intestinales humanas (IEC) tal como en Putaala H, *et al.*, ("Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression", Research in Microbiology 2008) y en Makivuokko H, *et al.*, (Nutr. Cancer, 2005, 52, 94-104) en condiciones de cultivo *in vitro* convencionales que comprendían una atmósfera humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 %, y medios de cultivo de células Caco-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US y BD Biosciences, San Jose, CA, US).

Para exposición de las células Caco-2, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* 420 se propagó en caldo de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante una noche, las densidades de las células bacterianas se determinaron con citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos), se sedimentaron (25 °C, 5 min, 3000 g), se lavaron una vez con medio de cultivo de Caco-2, y se diluyeron en medio de cultivo de Caco-2 en una proporción de 20 a 100 células bacterianas con respecto a una célula Caco-2. Después de esto, las células Caco-2 se trataron durante 8 horas en condiciones *in vitro* convencionales. Como un control, se usaron células Caco-2 tratadas con medio de cultivo de Caco-2 sin adición de la cepa 420 de *B. animalis ssp. lactis* 420.

Para la exposición de las células Caco-2 en primer lugar se hizo una fermentación con povidex, povidex al 1 % (v/v) y al 2 % (v/v) (Litesse®) en medio de simulación de colon en un simulador de colon *in vitro* al igual que en Makivuokko *et al.*, al que se ha hecho referencia anteriormente. En este estudio se usó la simulación de colon *in vitro* que consiste en cuatro etapas y cuatro unidades paralelas.

Una sola unidad comprende cuatro recipientes conectados de forma secuencial (V1, V2, V3 y V4) con condiciones ajustadas para representar diferentes partes del colon humano en series que representan diferentes partes del colon: colon proximal, ascendente, descendente, y distal. Después de simulación de la fermentación con povidex, los sobrenadantes se alimentaron (25 °C, 5 min, 10.000 g), se diluyeron a un 10 % (v/v) en medio de cultivo de células Caco-2. Las células se trataron durante 24 h en condiciones *in vitro* convencionales. Como un control, se usaron células Caco-2 tratadas del mismo modo con medio de simulación de colon fermentado sin povidex añadida.

Después de exposición, el ARN celular total se aisló de las células Caco-2 usando el kit RNeasy mini (Qiagen, Hilden, Alemania). Se usó Affymetrix U133+2.0 GeneChips (Affymetrix Inc. Santa Clara, CA, Estados Unidos) para estudiar el transcriptoma de células humanas. El procesamiento, etiquetado, hibridaciones, lavado, tinción y barrido de ARN durante el procesamiento de la micromatriz se realizaron de acuerdo con las recomendaciones convencionales del fabricante.

Los datos de la micromatriz se procesaron previamente con GC-RMA, y se analizaron estadísticamente usando el lenguaje de programación R (versión 2.5.0) (R Development Core Team; "R: A language and environment for statistical computing", Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2006), y Bioconductor (versión 2.0) (Gentleman RC *et al.*, "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics" Genome Biol. 2004, 5, R80). Los genes expresados de forma diferencial se seleccionaron basándose en la expresión genética con una diferencia de proporción log de más de 1,6 en la intensidad de la señal en comparación con la de control para muestras tratadas con la cepa 420 de *B. animalis ssp. lactis*. Para las muestras de Caco-2 tratadas con povidex, se seleccionaron genes expresados de forma diferencial basándose en su comportamiento total calculado usando la norma de los genes de los tres últimos recipientes (V2, V3, V4) de simulación.

La mayoría de los genes siguieron un patrón similar a través de los cuatro recipientes: dentro de perfiles regulados de forma negativa, o regulados de forma positiva, la expresión disminuyó o aumentó hacia el último recipiente.

También, si un perfil genético se regulaba de forma positiva en el control, un 0 % de povidexrosa, estaba regulado de forma positiva más ligeramente en el tratamiento con un 1 % de povidexrosa e incluso más en un 2 % de povidexrosa. De forma análoga, en los perfiles regulados de forma negativa, el tratamiento con un 2 % de povidexrosa estaba más regulado de forma negativa que con un 1 % que estaba más regulado de forma negativa que el control. De ese modo, los genes se definieron como regulados de forma positiva o negativa basándose en los últimos tres recipientes. La diferencia entre las muestras no tratadas y dos concentraciones de povidexrosa se calculó usando el ensayo t de Student para muestras relacionadas con un valor p de límite de separación $p < 0,01$.

Resultados

La expresión de genes relacionados con la absorción del colesterol intestinal se regula en células Caco-2 con la cepa 420 de *B. animalis* ssp. *lactis* 420 (Tabla 1) o con sobrenadantes de fermentación en povidexrosa (Tabla 2).

El efecto de regulación negativa en APOB, APOC2, APOC3, APOAIV y MTTP tienen un efecto reductor en el colesterol y en la absorción de triglicéridos desde el intestino (Iqbal J y Hussain MM, American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2009, 296, E1183-E1194), mientras que el efecto de regulación positiva en NPC1 aumenta la formación de HDL en el intestino (Brunham LR *et al.*, J Clin Invest 2006, 116, 1052-62). NR2F2 y HNF4A son factores de transcripción que regulan la expresión de genes de apolipoproteína: véanse Antes TJ, *et al.*, Biochemistry 2001, 40, 6720-30 y Leng SY, *et al.*, American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007, 293, G475-G483.

Tabla 1

Efecto de la cepa 420 de <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	
Gen	Nivel de expresión
Apolipoproteína B (APOB)	-2,89
Apolipoproteína C-II (APOC2)	-2,53
Apolipoproteína C-III (APOC3)	-1,47
Apolipoproteína A-IV (APOAIV)	-2,84
Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP)	-2,99
Receptor nuclear de la subfamilia 2, grupo F, miembro 2 (NR2F2), también conocido como ARP1	-1,67
Factor nuclear de hepatocitos 4, alfa (HNF4A)	-2,3

Tabla 2

Efecto de la fermentación de povidexrosa								
	Nivel de expresión							
	1 % V1	1 % V2	1 % V3	1 % V4	2 % V1	2 % V2	2 % V3	2 % V4
Enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1 (NPC1)	1,03	1,87	1,62	1,68	1,20	1,82	1,99	1,78

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una bacteria seleccionada entre la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la cepa 420 de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, o una mezcla de las mismas para uso en el tratamiento de endotoxemia metabólica en un mamífero.
- 10 2. Una bacteria para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la endotoxemia metabólica comprende un aumento del nivel de lipopolisacáridos en el cuerpo del mamífero en un factor en el intervalo de 1,5 a 20 en comparación con los niveles basales de lipopolisacárido.
- 15 3. Una bacteria para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la endotoxemia metabólica comprende un aumento del nivel de lipopolisacáridos en el cuerpo del mamífero en un factor en el intervalo de 2 a 4 en comparación con los niveles basales de lipopolisacárido.
- 20 4. Una bacteria para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la endotoxemia está inducida por la dieta y/o asociada a la dieta.
- 25 5. Una bacteria para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el animal continúa ingiriendo una dieta con alto contenido de grasa durante el transcurso del tratamiento.
6. Una bacteria para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bacteria se administra en combinación con uno o más prebióticos.
7. Una bacteria para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el prebiótico se selecciona entre alginato, xantano, pectina, goma de algarrobo, inulina, goma guar, un galacto-oligosacárido, un fructo-oligosacárido, polidextrosa, lactitol, lactosacarosa, un oligosacárido de soja, palatinosa, un isomalto-oligosacárido, un gluco-oligosacárido o un xilo-oligosacárido, o una mezcla de cualquiera de los mismos.

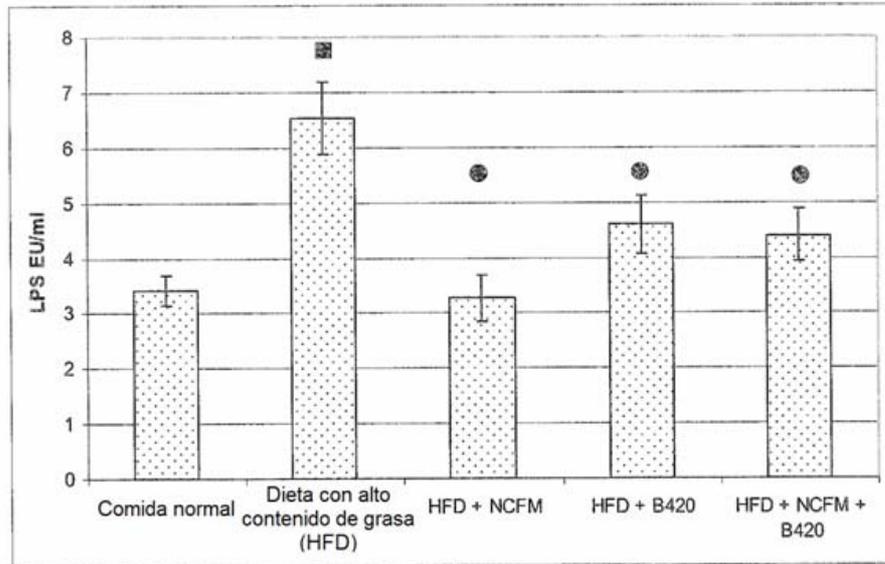


Fig. 1

■ = Diferencia significativa entre el grupo de comida normal y el grupo de dieta con alto contenido de grasa (Valor P de ensayo t de Student < 0,05)
 ● = Diferencia significativa entre el grupo de dieta con alto contenido de grasa y los grupos de dieta con alto contenido de grasa + probióticos (Valor P de ensayo t de Student < 0,05).

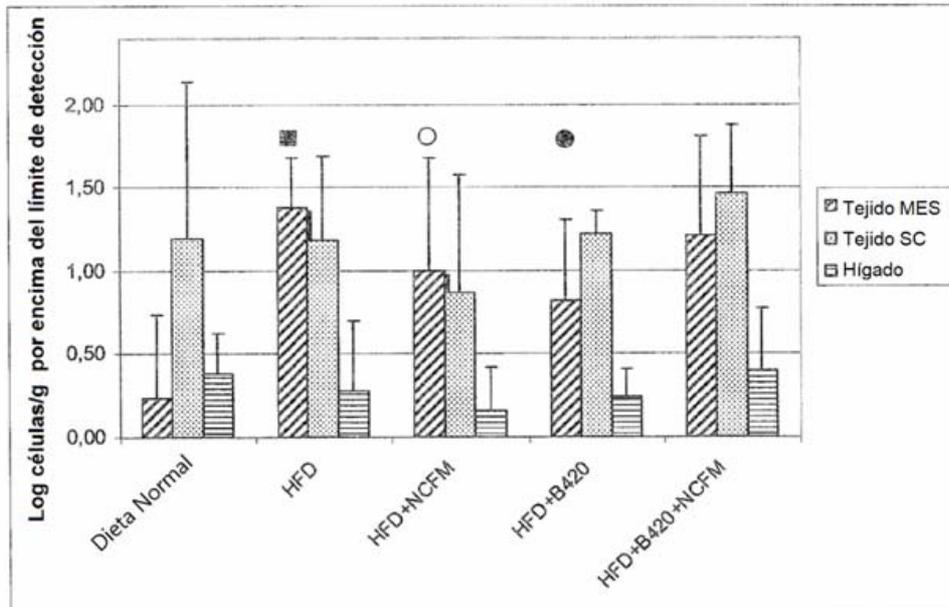


Fig. 2

- = Diferencia significativa entre el grupo de comida normal y el grupo de dieta con alto contenido de grasa (Valor P de ensayo t de Student < 0,05);
- = Diferencia significativa entre el grupo de dieta con alto contenido de grasa y los grupos de dieta con alto contenido de grasa + probióticos (Valor P de ensayo t de Student < 0,05);
- = Tendencia para una diferencia significativa entre el grupo de dieta con alto contenido de grasa y los grupos de dieta con alto contenido de grasa + probióticos (ensayo t de Student 0,05 < valor P < 0,15).

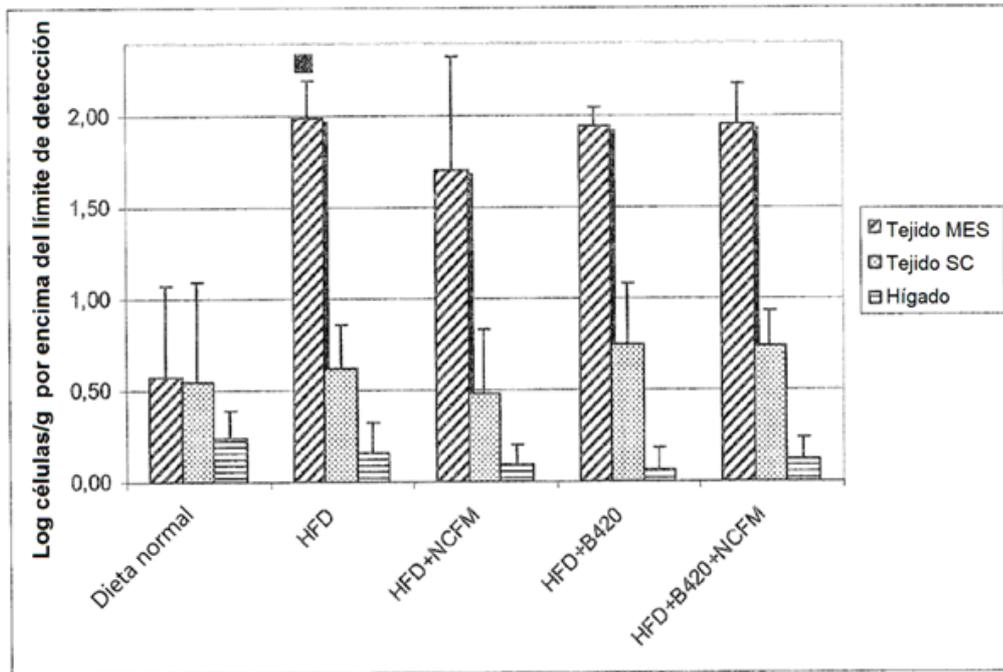


Fig. 3

■ = Diferencia significativa entre el grupo de comida normal y el grupo de dieta con alto contenido de grasa (Valor P de ensayo t de Student < 0,05)

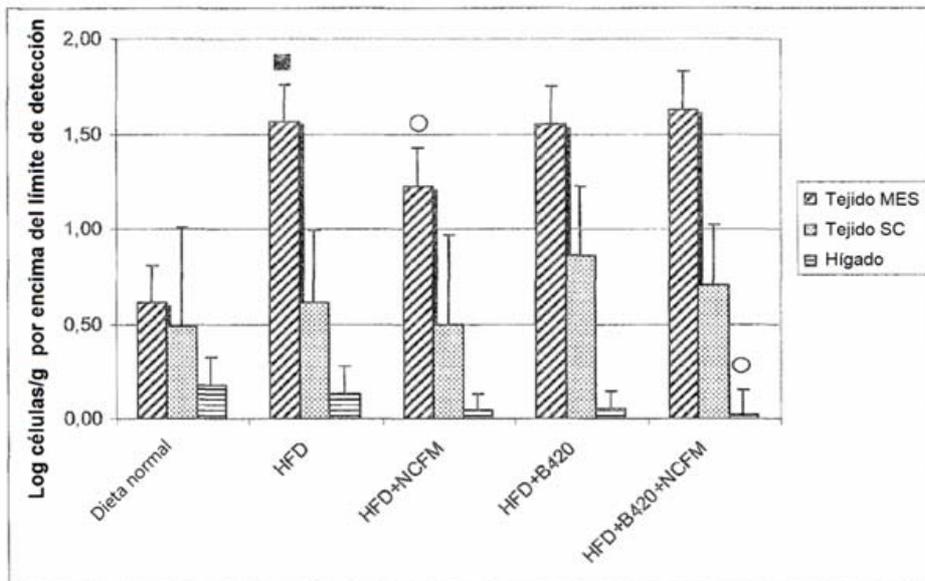


Fig. 4

■ = Diferencia significativa entre el grupo de comida normal y el grupo de dieta con alto contenido de grasa (Valor P de ensayo t de Student < 0,05)
 ○ = Tendencia para una diferencia significativa entre el grupo de dieta con alto contenido de grasa y los grupos de dieta con alto contenido de grasa + probióticos (ensayo t de Student 0,05 < valor P < 0,15).

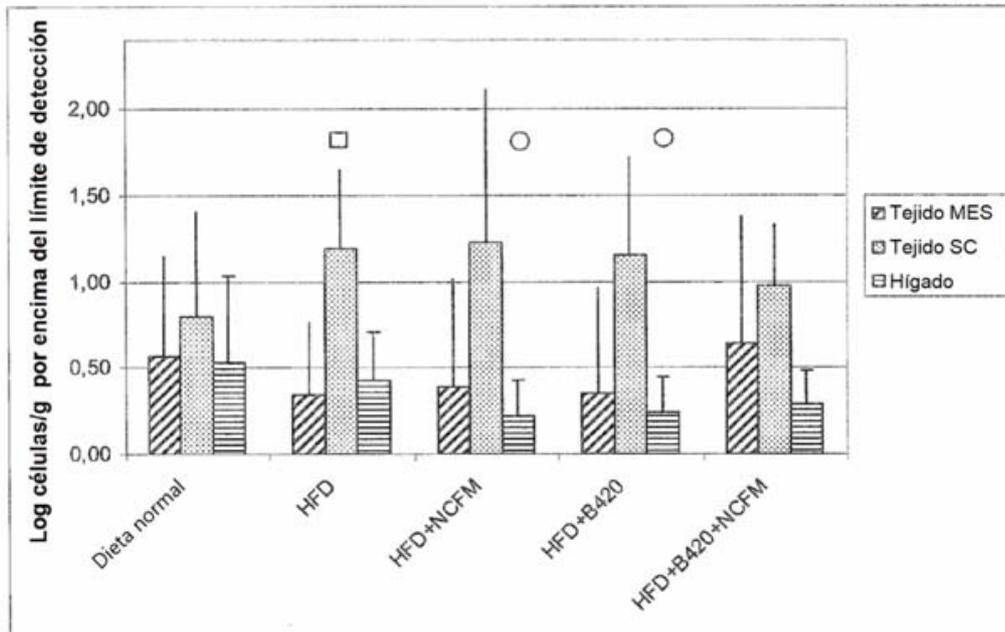


Fig. 5

□ = Diferencia significativa entre el grupo de comida normal y el grupo de dieta con alto contenido de grasa (ensayo t de Student 0,05 < valor P < 0,15);
 ○ = Tendencia para una diferencia significativa entre el grupo de dieta con alto contenido de grasa y los grupos de dieta con alto contenido de grasa + probióticos (ensayo t de Student 0,05 < valor P < 0,15).

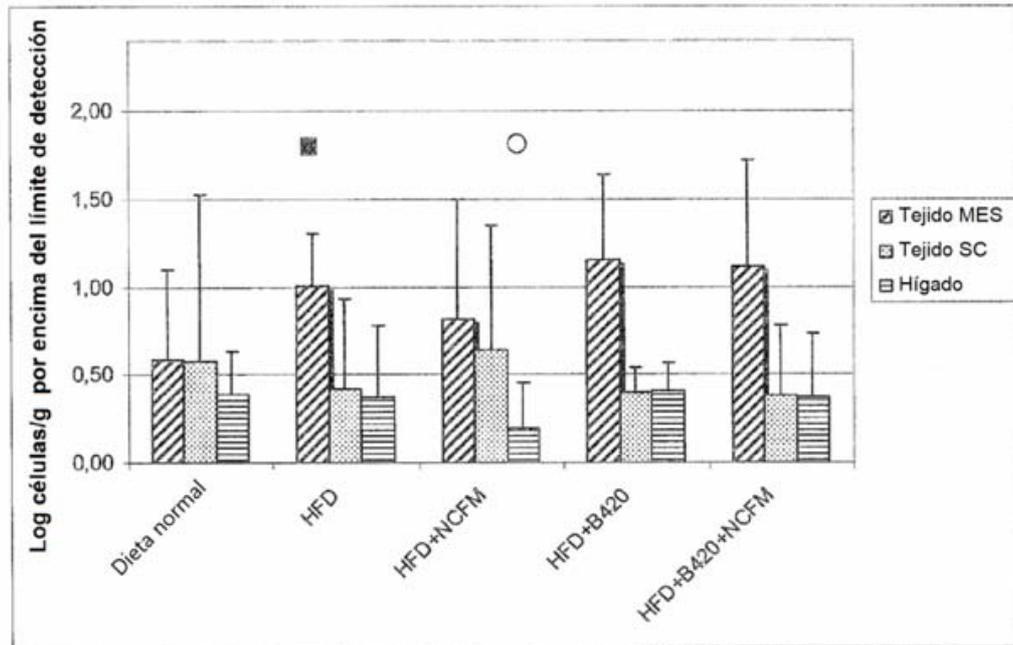


Fig. 6

■ = Diferencia significativa entre el grupo de comida normal y el grupo de dieta con alto contenido de grasa (Valor P de ensayo t de Student < 0,05);
 ○ = Tendencia para una diferencia significativa entre el grupo de dieta con alto contenido de grasa y los grupos de dieta con alto contenido de grasa + probióticos (ensayo t de Student 0,05 < valor P < 0,15).

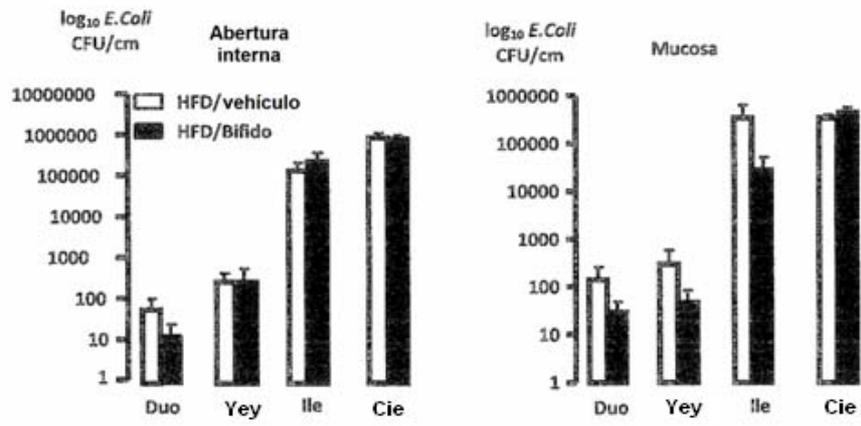


Fig. 7

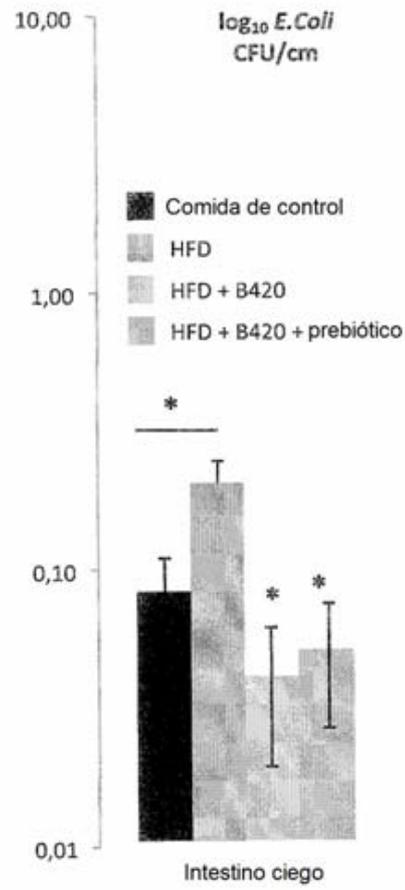


Fig. 8

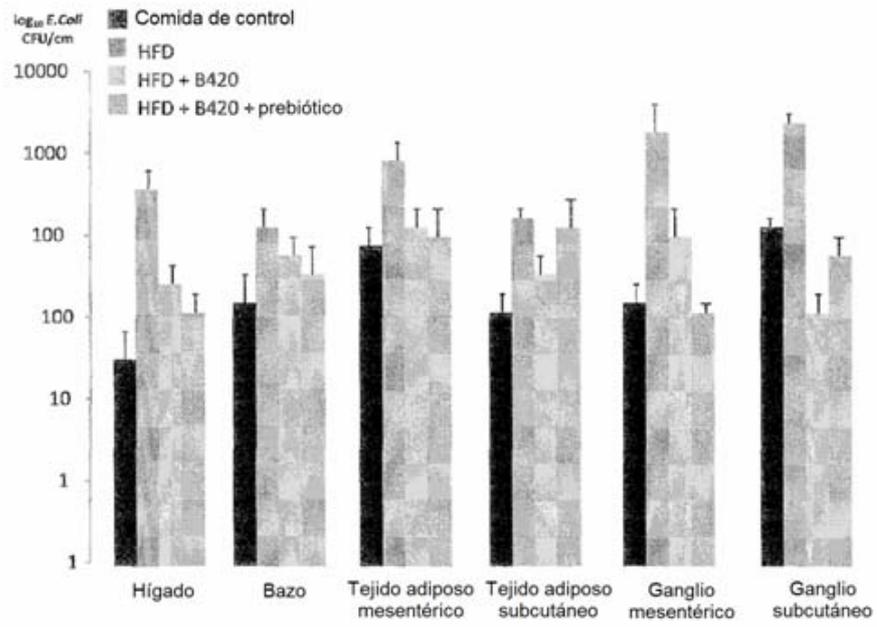


Fig. 9

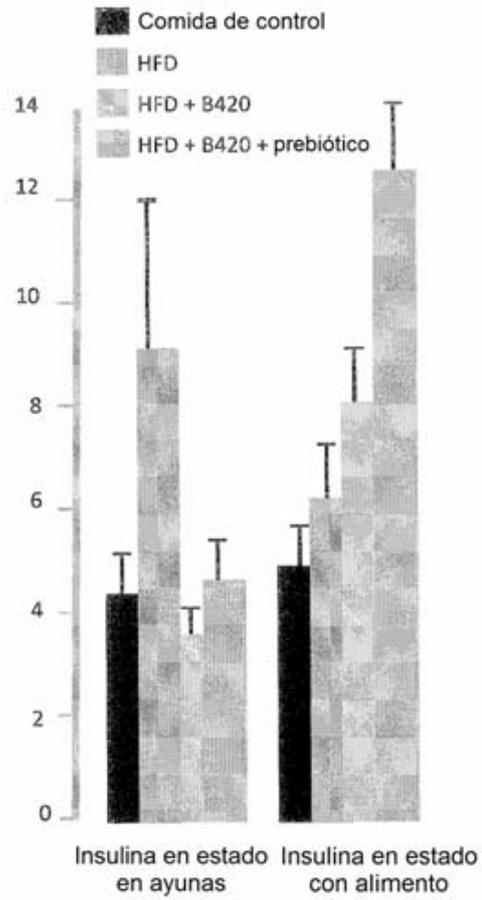


Fig. 10