

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
26 de noviembre de 2009 (26.11.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/142472 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2009/000046
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de mayo de 2009 (21.05.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2008/006546
21 de mayo de 2008 (21.05.2008) MX
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **SIGMA ALIMENTOS, S. A. DE C. V.** [MX/MX]; Ave. Gómez Morín 1111, Col. Carrizalejo, San Pedro Garza García, Nuevo León, 66254 (MX).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GARZA GONZÁLEZ, Elvira** [MX/MX]; Valle de Aguayo 217, Col. Valle del Contry, Monterrey, Nuevo León, 67174 (MX). **BOSQUES PADILLA, Francisco Javier** [MX/MX]; Alejandro Dumas 210, Colina de San Jerónimo, Monterrey, Nuevo León, 64630 (MX).

NARANJO MODAD, Sandra [MX/MX]; Paso de la Sierra 303-A, Col. Jerónimo Siller, San Pedro Garza García, Nuevo León, 66250 (MX). **MORENO CAMPAÑA, Víctor Manuel** [MX/MX]; Columbia 461, Col. Residencial Cumbres, Monterrey, Nuevo León, 64619 (MX).

(74) Mandatario: **GARCÍA LÓPEZ, César**; Zaachila 156, Residencial Los Pinos, Saltillo, Coahuila, 25198 (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: BIFIDOBACTERIA THAT PRODUCES FOLIC ACID, FOOD COMPOSITION AND USE OF SAID BIFIDOBACTERIA

(54) Título: BIFIDOBACTERIA PRODUCTORA DE ÁCIDO FÓLICO, COMPOSICIÓN ALIMENTICIA Y USO DE LA BIFIDOBACTERIA

1 2 3 4 5 6 7 8 9

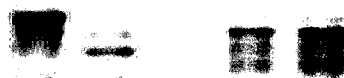


FIG. 1

(57) Abstract: The invention relates to a bacterial strain of human origin belonging to the species *Bifidobacterium animalis* identified as PTA-9175 which produces between 120 ng/ml and 398 ng/ml of folic acid and which can be used as a probiotic in food compositions. Said *Bifidobacterium animalis* strain is deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) in the United States of America under the Budapest Treaty, dated 23 April 2008 and identified with the ATCC number for patent PTA-9175.

(57) Resumen: Una cepa bacteriana de origen humano que pertenecen a la especie *Bifidobacterium animalis* identificada como PTA-9175 que tiene un nivel de producción de ácido fólico en una cantidad de 120 ng/ml a 398 ng/ml y que puede ser empleada como probiótico en composiciones alimenticias. La cepa de *Bifidobacterium animalis* del invento está depositada en American Type Culture Collection (ATCC) en los Estados Unidos de América bajo el Tratado de Budapest con fecha de depósito del 23 de abril de 2008 y respectivamente identificada con el número de designación ATCC de depósito para patente PTA-9175.



CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))*

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

Declaraciones según la Regla 4.17:

— *sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))*

BIFIDOBACTERIA PRODUCTORA DE ÁCIDO FÓLICO, COMPOSICIÓN ALIMENTICIA Y USO DE LA BIFIDOBACTERIA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona, en general, a cepas de bacterias pertenecientes al genero *Bifidobacterium* que son productoras de ácido fólico, y particularmente a un cultivo puro de cepa de *Bifidobacterium animalis* productora de ácido fólico, a una composición alimenticia conteniendo esta cepa y a usos de la cepa.

10 La *Bifidobacterium animalis* está depositada en American Type Culture Collection (ATCC) bajo el Tratado de Budapest con fecha de depósito del día 23 de abril de 2008 y respectivamente identificada con el número de designación ATCC de deposito para patente PTA-9175.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Descubierto en los años 40, el ácido fólico es considerado como una vitamina hidrosoluble que pertenece al complejo B. También se lo conoce como folacina o folatos cuya etimología proviene del latín *folium* que significa hoja.

20

Esta vitamina es fundamental para llevar a cabo todas las funciones de nuestro organismo. Su gran importancia radica en que el ácido fólico es esencial a nivel celular para sintetizar ADN (ácido desoxirribonucleico), que trasmite los caracteres genéticos, y para sintetizar también ARN (ácido ribonucleico), necesario para formar las proteínas

25 y tejido del cuerpo y otros procesos celulares. Por lo tanto la presencia de ácido fólico en el organismo es indispensable para la correcta división y duplicación celular.

Los folatos funcionan en conjunto con la vitamina B12 y la vitamina C en la utilización de las proteínas. Es importante señalar que el ácido fólico es básico para la

formación del grupo hemo (parte de la hemoglobina que contiene el hierro), por eso esta relacionado con la formación de glóbulos rojos.

El ácido fólico también brinda beneficios al aparato cardiovascular, al sistema nervioso, y a la formación neurológica fetal entre otros. Dada su gran importancia para el ser humano, muchos de los alimentos que hoy consumimos llevan ácido fólico adicionado.

Este ácido se forma en el intestino a partir de la flora intestinal. Se absorbe principalmente en el intestino delgado, luego se distribuye en los tejidos a través de la circulación sanguínea y se almacena en el hígado. Se excreta por orina y heces.

Dentro de las funciones del ácido fólico encontramos que actúa como coenzima en el proceso de transferencia de grupos monocarbonados; interviene en la síntesis de purinas y pirimidinas, por ello participa en el metabolismo del ADN, ARN y proteínas; es necesario para la formación del células sanguíneas, más concretamente de glóbulos rojos; reduce el riesgo de aparición de defectos del tubo neural del feto como lo son la espina bífida y la anencefalia; disminuye la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares; previene algunos tipos de cáncer; ayuda a aumentar el apetito; y estimula la formación de ácidos digestivos.

Entre las fuentes de ácido fólico se encuentran la de origen animal, en niveles muy bajos, como en el hígado, pollo, leche y sus derivados; fuentes de origen vegetal como en legumbres (lentejas, habas soja), cereales integrales y sus derivados, vegetales de hoja verde (espinacas, coles, lechugas, espárragos), el germen de trigo, y las frutas (melón, bananas, plátanos, naranjas y aguacate o palta entre otros; y como suplementos por medio se comprimidos de ácido fólico.

Con la manipulación de los alimentos, se puede llegar a perder o destruir más de la mitad del contenido natural de ácido fólico. Se destruye con las cocciones prolongadas en abundante agua, con el recalentamiento de las comidas y también con el almacenamiento de los alimentos a temperatura ambiente.

5

La deficiencia de ácido fólico se puede manifestar a través de los siguientes síntomas: anemia megaloblástica (los glóbulos rojos inmaduros tienen un tamaño más grande que lo normal), bajo peso, falta de apetito, debilidad, palidez, fatiga, náuseas, diarreas, mal humor, depresión, inflamación y llagas linguales, úlceras bucales, taquicardias, retraso del crecimiento y cabello cano.

10

La mejor manera de satisfacer las necesidades diarias de esta vitamina es a través de una dieta balanceada y equilibrada que incluya a todos los grupos de alimentos, pero sin embargo existen situaciones donde pueden llegar a necesitarse suplementos de ácido fólico, como en mujeres en edad fértil, embarazadas o en lactancia para prevenir defectos del tubo neural del feto, entre ellos la espina bífida y anencefalia, pues se considera que todas aquellas mujeres que toman suplementos de ácido fólico antes de la concepción reducen en un 50% los riesgos de defectos neurológicos en el futuro bebé; en caso de ancianos y personas mayores, pues a partir de los 65 años de edad la capacidad de absorción de vitaminas está claramente disminuida; en personas fumadoras debido a que el consumo de tabaco entorpece la absorción y disponibilidad de las vitaminas del complejo B; en personas alcohólicas pues el alcohol disminuye y dificulta la absorción de vitaminas; en personas con enfermedades con evacuaciones frecuentes y diarreicas que evitan una buena absorción de esta vitamina; y en personas con uso continuado de ciertos fármacos, como anticonceptivos orales, antiinflamatorios, sedantes, somníferos, etc.

15

20

25

En la Tabla 1 se establecen la ingesta diaria recomendada de ácido fólico según el Departamento de Nutrición del IOM (Institute of Medicine: Instituto de Medicina) y USDA (United States Department of Agriculture: Departamento de Agricultura de Estados Unidos) tanto para infantes, niños y adultos.

5

Ingesta diaria recomendada de ácido fólico		
Edad	Hombres µg/día	Mujeres µg/día
1 a 3 años	150	
4 a 8 años	200	
9 a 13 años	300	
14 a 18 años	400	
19 años y mas	400	
Embarazadas		600
Lactancia		500

Tabla 1

Debido a información insuficiente con respecto a la dosis recomendada de folatos para infantes, se ha establecido la ingesta adecuada basada en la cantidad de folato consumido por infantes sanos y que se alimentan a través de la leche materna. Esta es de 60 µg/día hasta los 6 meses y 80 µg/día hasta los 12 meses de edad.

Aunado a lo anterior, se ha reportado que una dosis de 400 µg/día de ácido fólico permite una disminución sobre los niveles de concentración de homocisteína en sangre, disminuyendo así el riesgo de enfermedad cardiovascular (Lynnette J. Riddell, Alexandra Chisholm, Sheila Williams, and Jim I. Mann, Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations, *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1448–54).

El riesgo de toxicidad con la ingesta de ácido fólico proveniente de alimentos así como de suplementos es bajo. Al ser una vitamina hidrosoluble, toda ingesta en exceso se elimina a través de la orina. Igualmente existe evidencia que ciertos pacientes que toman medicamentos anticonvulsionantes pueden experimentar convulsiones ante altos niveles de ácido fólico.

25

Como referencia se han establecido niveles de ingesta máximas tolerables (ver Tabla 2) para prevenir el riesgo de toxicidad con ácido fólico. Los efectos adversos se incrementan a ingestas mayores al nivel máximo tolerable. Una ingesta mayor a la máxima establecida puede traer síntomas de deficiencia de vitamina B12 (degeneración nerviosa y enmascaramiento de anemias) debido a la interacción presente entre ellos.

Ingesta máxima tolerable de ácido fólico		
Edad	Hombres µg/día	Mujeres µg/día
1 a 3 años	300	
4 a 8 años	400	
9 a 13 años	600	
14 a 18 años	800	
19 años y mas	1000	
Embarazadas		800-1000
Lactancia		800-1000

Tabla 2

Es así de la importancia extrema para encontrar medios por los cuales se pueda dotar al organismo con una fuente endógena natural, no tóxica, capaz de proveer continuamente la cantidad necesaria de ácido fólico y así proporcionar un alternativa a los métodos convencionales de administración de dicha sustancia o sus sales.

El tracto digestivo humano se acomoda a un número plural de bacterias que viven en simbiosis con el hospedador. Existen grandes diferencias en el contenido microbiano entre las diferentes partes del tracto, apareciendo aproximadamente un 95% de todas las bacterias intestinales en el colon, que es la parte más importante del intestino. Se ha calculado que más de 400 especies bacterianas proliferan en el colon. Además de éstas, el intestino contiene microbios conocidos como microbios transitorios (G.R. Gibson y M.B. Roberfroid (eds.), Colonic Microbiota; Nutrition and Health, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1999). Las especies dominantes son las siguientes: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Peptostretococcus*,

Eubacterium y *Ruminococcus*. El número de especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Propionibacterium* y *Enterobacteriaceae* es ligeramente menor. Algunas de las especies representan microbios útiles, mientras que otras pueden ser incluso perjudiciales. El contenido microbiano medio en las heces es de 5 1×10^{12} cfu/g (por materia seca). Las bacterias degradan y fermentan aquellos componentes del alimento en el colon que no se absorben en el intestino delgado, absorbiéndose los productos finales de la fermentación en el intestino para su uso por parte del organismo. Además de la nutrición, el equilibrio microbiano de colon tiene una significación fundamental para el estado de salud de un hombre (Tannock, G.W., 10 1998, Studies of the intestinal microflora: A prerequisite for the development of probiotics, Int. Dairy J., 8: 527-533). Los cambios en la composición de la flora intestinal o una reducción repentina en la cantidad de ésta (debido a diarrea grave, tratamiento con antibióticos, etc.) aumentan la infectividad de especies potencialmente patógenas, lo que puede tener graves consecuencias (aparición de 15 alergias, enfermedades intestinales, cáncer).

El género *Bifidobacterium* es altamente conocido por su actividad beneficiosa dentro del cuerpo. Esta actividad se traduce, por ejemplo, en su capacidad de repoblar y recompensar la flora bacteriana intestinal después de una terapia con antibióticos, 20 en el mantenimiento de un equilibrio entre los diferentes grupos microbianos intestinales, en la reducción de niveles de colesterol, en la producción de vitaminas y en el aligeramiento de la intolerancia a la lactosa.

Las bacterias que pertenecen al género de *Bifidobacterium* son consideradas 25 probióticos que son comúnmente usados en sectores farmacéuticos, veterinario y/o de alimentos. Los probióticos son microbios vivos que, cuando se administran al hombre o a los animales, promueven el bienestar del hospedador mejorando el equilibrio microbiano intestinal (Fuller, R., Probiotics in man and animals, 1989, J. Appl.

Microbiol. 66: 365-378). Los probióticos mejor documentados incluyen *L. Rhamnosus* LGG, *L. Johnsonii* LAI, *L. Casei* Shirota y *Bifidobacterium lactis* Bbl2. Además, se ha descrito una serie de otros probióticos en la literatura de la técnica (véase, por ejemplo, M.E. Sanders y J.H. in't Veld 1999, *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 293-315, Kluwer Academic Publishers). Los efectos promotores de la salud de los probióticos incluyen el equilibrio y el mantenimiento de la flora intestinal, la estimulación del sistema inmune y la actividad anticarcinogénica. Los efectos útiles de los probióticos en el intestino humano se basan en varios factores causados por las células bacterianas vivas, sus estructuras celulares y sus productos metabólicos. Los probióticos son normalmente administrados en nutrientes o como cápsulas.

Se puede hacer referencia a una bacteria como probiótico si cumple esencialmente los siguientes requerimientos (Lee, Y-K. y Salminen, S., 1995, *The coming age of probiotics. Trend Food Sci. Technol.*, 6: 241-245): permanece viable en las condiciones exigentes que prevalecen en el tracto digestivo (bajo pH gástrico, ácidos en el sistema digestivo, etc.), se une a las paredes del intestino, se metaboliza en el intestino, es tecnológicamente aplicable (soporta el procesado), exhibe efectos para la salud clínicamente estudiados y descritos y es seguro de consumir.

Una aplicación actual de probiótico productor de ácido fólico perteneciente al género *Bifidobacterium* es descrita por Giovanni Mogna y Gian Paolo Strozzi en la publicación de la solicitud internacional de patente WO-2006/013588A1. En el documento se describen cepas bacterianas de origen humano que pertenecen al género *Bifidobacterium* que se caracterizan por ser productoras de ácido fólico y empleadas como probióticos en formulaciones farmacéuticas, veterinarias y alimenticias. En particular, las especies que se describen son *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositadas en el centro de la colección de DSMZ (und Zellkulturen de Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen GmbH; Braunschweig, Alemania), de acuerdo con el tratado de Budapest, el 21 de julio de 2004.

Las especies de bifidobacterias descritas en este documento de patente WO-
5 2006/013588A1 tienen un nivel de producción de ácido fólico de acuerdo a lo
siguiente: *Bifidobacterium adolescentis* identificada como DMS 16594 de 56 ng/ml a
62 ng/ml; *Bifidobacterium adolescentis* identificada como DMS 16595 de 16 ng/ml a
20 ng/ml; *Bifidobacterium breve* identificada como DMS 16596 de 6 ng/ml a 9 ng/ml;
la *Bifidobacterium pseudocatenulatum* identificada como DMS 16597 de 14 ng/ml a 16
10 ng/ml; y la *Bifidobacterium pseudocatenulatum* identificada como DMS 16598 de 14
ng/ml a 19 ng/ml. Estos niveles de producción de ácido fólico son bajos en
comparación con *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 del presente invento que más
adelante se describe.

15 Aunado a lo anterior, el documento de patente WO-2006/013588A1 no describe
a detalle ni identifica una especie de *Bifidobacterium animalis* que sea productora de
ácido fólico en niveles comparables con la producción de ácido fólico de
Bifidobacterium animalis PTA-9175 del presente invento y que además pueda ser
empelada como probiótico en composiciones alimenticias.

20

En consecuencia, existe una necesidad continua y evidente de ofrecer a los
consumidores productos nuevos que tengan efectos probióticos mediante el empleo de
bifidobacterias que sean capaz de producir niveles de ácido fólico en cantidad mucho
mayor que los niveles de producción de ácido fólico de las bifidobacterias actualmente
25 identificadas, con el objeto de proporcionar productos convenientes que sean parte,
complemento o suplemento de la dieta diaria de ácido fólico requerida.

SUMARIO DE LA INVENCION

En vista de lo anteriormente descrito y con el propósito de dar solución a las limitantes encontradas, es objeto de la invención ofrecer un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 como productora de ácido fólico.

Aunado a lo anterior es también objeto de la invención proporcionar una composición alimenticia formada por un producto alimenticio y un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 como productor de ácido fólico.

Es también objeto de la invención proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de deficiencia de ácido fólico que contiene un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 como productor de ácido fólico.

Otro objeto de la invención es un uso de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 como probiótico productor de ácido fólico en composiciones alimenticias.

Es también objeto de la invención el uso de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de deficiencia de ácido fólico.

Es también objeto de la invención ofrecer un método para producir un producto alimenticio de leche fermentada que contiene *Bifidobacterium animalis* viable y productora de ácido fólico, el método consiste de cultivar *Bifidobacterium animalis*

PTA-9175 en un medio que consiste de leche, leche reconstituida, suero de leche, leche entera o leche descremada.

Otro objeto de la invención es ofrecer una cepa de *Bifidobacterium animalis*
5 PTA-9175 que tiene una producción de ácido fólico de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Los detalles característicos de la invención se describen en los siguientes
10 párrafos en conjunto con las figuras que lo acompañan, las cuales son con el propósito de definir al invento pero sin limitar el alcance de éste.

Figura 1 ilustra un patrón molecular de cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 de acuerdo al invento, en donde carril 1 es marcador de peso molecular de 100
15 pb y carriles 8 y 9 cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

PRUEBAS IN VITRO

20

Identificación de género y especie por una combinación de características fenotípicas y genéticas

Características fenotípicas

25

Método: Se utilizó el sistema API Rapid ID 32A, el cual es un sistema de identificación de bacterias anaerobias en 4 horas que incluye pruebas enzimáticas estandarizadas, miniaturizadas y una base de datos específica. La tipificación se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A partir de una colonia bien

aislada, se hizo un subcultivo en agar MRS y se incubó por 48 h en aneaeobiosis. Se realizó una suspensión de turbidez igual al 4 de McFarland y se inoculó la galería con 55 µl en cada cúpula. Se cubrió la cúpula de URE, con 2 gotas de aceite de parafina y se incubó por 4 h 37 °C en aerobiosis.

5

Resultados. El perfil bioquímico mostró los siguientes resultados contenidos en la Tabla 3.

Lectura de resultados de la tipificación fenotípica de la cepa de <i>Bifidobacterium animalis</i> PTA-9175	
PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
Producción de ureasa	Negativo
Arginina dihidrolasa	Negativo
Alfa galactosidasa	Positivo
Beta galactosidasa 6-fosfato	Positivo
Prolina arilamidasa	Negativo
Alfa glucosidasa	Positivo
Beta glucosidasa	Positivo
Alfa arabinosidasa	Positivo
Beta glucuronidasa	Negativo
Beta N-acetil-glucosaminidasa	Negativo
Fermentación de la manosa	Negativo
Fermentación de la rafinosa	Positivo
Ac. Glutámico descarboxilasa	Negativo
Alfa fucosidasa	Negativo
Reducción de nitratos	Negativo
Producción de indol	Negativo

Fosfatasa alcalina	Negativo
Arginina arilamidasa	Positivo
Prolina arilamidasa	Positivo
L-Leucil glicina arilamidasa	Positivo
Fenilalanina arilamidasa	Positivo
Leucina arilamidasa	Positivo
Ácido piroglutámico arilamidasa	Negativo
Tirosina arilamidasa	Positivo
Alanina arilamidasa	Negativo
Glicina arilamidasa	Positivo
Histidina arilamidasa	Positivo
Glutamil ácido glutámico arilamidasa	Negativo
Serina arilamidasa	positivo

Tabla 3

De acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas, las cuales se
 5 realizaron al menos 10 veces, se identificó a la cepa como *Bifidobacterium sp* con un
 99 % de certeza.

Tipificación por secuenciación de subunidad 16S ribosomal

Método: Se llevó a cabo la extracción del DNA cromosómico a partir de la cepa
 10 de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 empleando extracción con fenol cloroformo-
 alcohol isoamílico y precipitación con etanol.

Se obtuvo un cultivo de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 de 48
 horas, se colocó a un vial que contenía 700 µl de una solución de Tris-HCL 100 mM, se
 15 añadieron 150 µg de lisozima y se incubó a 37 °C por 60 min en b.a.

Transcurrido el tiempo, se añadieron 200 µl de TE1X (Tris-HCL 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0 con dodecil sulfato de sodio al 1 % y 6 µl de proteinasa K de concentración 10 mg/ml y se incubó a 55 °C por 60 min a baño maría. El DNA se
5 extrajo agregando 500 µl de fenol saturado, 100 µl de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico), 200 µl de TE1X, mezclando por inversión cada vez que se añadía un reactivo y una agitación final de 5 min por inversión.

La muestra se centrifugó a 14,000 rpm, por 8 minutos. A partir de la fase
10 acuosa se precipitó el ADN con 2.33 volúmenes de etanol al 98 %, a -20 °C por 24 horas. Después se separó el ADN por centrifugación a 10,000 rpm por 5 min y se resuspendió el ADN en 50 µl de TE1X.

Se dejó en refrigeración por 24 horas antes de cuantificarse por fluorescencia a
15 460 nm y finalmente se ajustó a una concentración de 100 ng/µl con TE1X.

Se determinó la concentración de DNA por fluorometría y se ajustó a 100 ng/ml

Amplificación de la subunidad 16S ribosomal

20 Se emplearon los iniciadores: Im26 F 5'gattctggctcaggatgaacg-3' y Im3 R 5'cggtgtgtcttccactttcatg-3'. La mezcla de reacción que se utilizó fue de 25 µl, la cual contenía, 2.5 µl de buffer 10X, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 17.25 µl de agua, 0.25 µl de Taq polimerasa, la concentración final dNTP's fue de 0.2 µM de cada uno, cada primer tuvo una concentración final de 0.3 µM y 100 ng de DNA. Las condiciones de
25 amplificación de la PCR que se utilizaron fueron 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 s, alineamiento a 57 °C por 120 s, extensión a 72 °C por 120 s, y por último un ciclo para extensión final a 72 °C por 3 min, se utilizó un equipo termociclador modelo PX2 Thermal cycler (Termo Electrón Corporation, MA. U.S.A.).

La detección de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con tinción por bromuro de etidio.

5 Secuenciación *Bifidobacterium animalis* PTA-9175

```

1      AATTAAAACC TTGGGYTTAC ATGCAGTCGA ACGGGATCCC TGGCAGCTTG CTGTCGGGGT
61     GAGAGTGGCG AACGGGTGAG TAATGCGTGA CCAACCTGCC CTGTGCACCG GAATAGCTCC
121    TGGAAACGGG TGGTAATACC GGATGCTCCG CTCCATCGCA TGGTGGGGTG GGAAATGCTT
10 181    TTGCGGCATG GGATGGGGTC GCGTCCTATC AGCTTGTGG CGGGGTGATG GCCCACCAAG
241    GCGTTGACGG GTAGCCGGCC TGAGAGGGTG ACCGGCCACA TTGGGACTGA GATACGGCCC
301    AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGCAAGC CTGATGCAGC
361    GACGCCGCGT GCGGGATGGA GGCCTTCGGG TTGTAAACCG CTTTGTGTCA AGGGCAAGGC
421    ACGGTTTCGG CCGTGTTGAG TGGATTGTTC GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA
15 481    GCCGCGGTAA TACGTAGGGT GCGAGCGTTA TCCGGATTTA TTGGGCGTAA AGGGCTCGTA
541    GGCGGTTTCGT CGCGTCCGGT GTGAAAGTCC ATCGCCTAAC GGTGGATCTG CGCCGGGTAC
601    GGGCGGGCTG GAGTGCGGTA GGGGAGACTG GAATTCCCGG TGTAACGGTG GAATGTGTAG
661    ATATCGGGAA GAACACCAAT GGCGAAGGCA GGTCTCTGGG CCGTCACTGA CGCTGAGGAG
721    CGAAAGCGTG GGGAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGGTGGA
20 781    TGCTGGATGT GGGGCCCTTT CCACGGGTCC CGTGTCTGGAG CCAACGCGTT AAGCATCCCG
841    CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGCTAAAAC TCAAAGAAATT GACGGGGGGC CCGCACAAGC
901    GGCGGAGCAT GCGGATTAAT TCGATGCAAC GCGAAGAACC TTACCTGGGC TTGACATGTG
961    CCGGATCGCC GTGGAGACAC GGTTTCCCTT CGGGGCCGGT TCACAGGTGG TGCATGCTCG
1021   TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTGTGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTCGCCGCA
25 1081   TGTGCCAGGC GGGTGATGCC GGGAATCAT GTTGGACCGT CGGGTCACTC GGAGGAGGTG
1141   GGGATGACGT CAGATCATCA TGCCCTTACG TCAGGCTCAC GCATGCTACA ATGCGCTACA
1201   CCCGGTGCGA CTGGTGACGT GGGGGCGATC GCTGAAAACC GGTCTCTCAG ATTTGCGGAT
1261   ACTGCAACAT CCTG

```

30 Análisis de la secuencia

La secuencia obtenida se analizó empleando el programa Blast 2.2.14 y se obtuvo homología del 99 % con *Bifidobacterium animalis*. En la Tabla 4 se muestra el listado de bacterias con porcentaje de homología superior al 95 %.

Organismos encontrados con una similitud superior al 95 %. Comparativo con muestras de Gen Bank, en el <i>National Center for Biotechnology Information</i>	
Organismo	Homología (%)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	99
<i>Bifidobacterium animalis</i>	99
<i>Bifidobacterium animalis</i>	99
<i>Bifidobacterium animalis</i>	99
<i>Bifidobacterium animalis</i>	99
<i>Bifidobacterium lactis</i>	99
<i>Bifidobacterium animalis</i>	99
<i>B.lactis</i>	99
<i>Bifidobacterium sp.</i>	99
<i>Bifidobacterium animalis</i>	98
<i>Bifidobacterium infantis</i>	98
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	97
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	97
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	98
<i>Bacterium ic1332</i>	96
<i>Uncultured bacterium</i>	96

5

Tabla 4

Tipificación de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 por RAPD

Método: Se llevó a cabo la extracción del DNA por la metodología previamente
10 descrita para la secuenciación de la subunidad 16S ribosomal.

La genotipificación se utilizó el iniciador: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC
G -3'. Se prepararon mezclas de reacción con un volumen de 25 µl. Cada muestra

contenía lo siguiente: 200 μ M de cada desoxinucleósido trifosfato, 0.3 μ M del iniciador ERIC 2, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH= 8.3, 3 mM $MgCl_2$, 3 U de Taq DNA polimerasa (Bioline, MA, USA), 500 ng de DNA genómico. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 1 ciclo a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 s, alineamiento a 35 °C por 20 s y extensión a 72 °C por 1 min; por último una extensión final de 1 ciclo a 72 °C por 1 min utilizando un termociclador Px2 Thermal Cycler (Termo Electro Corporation Milford, MA, EEUU). Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio y fueron revelados en luz UV. El patrón de bandas de amplificación se analizó con el software Lab Works UVP Versión 4.5 para Windows.

Resultados: Se obtuvo un patrón característico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175. El patrón se muestra en la Figura 1.

15 Determinación de patrones de resistencia

Método: Para la determinación del fenotipo de resistencia a los antibióticos se empleó el método de Kirby-Bauer. De un cultivo joven de 18 a 24 horas se tomaron varias colonias con un hisopo estéril y se inocularon en un tubo de ensayo con solución salina isotónica estéril. El inóculo se ajustó visualmente a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Antes de que transcurrieran 15 min de haber ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión y al retirarlo se eliminó el exceso de líquido. Se inocularon placas con agar Muller-Hinton, sin dejar ninguna zona libre, deslizando el hisopo por la superficie del agar 3 veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme.

Se dejaron secar las placas de 3 a 5 min y se colocaron los sensidiscos de los siguientes antibióticos: norfloxacin, cefalotina, azitromicina, tobramicina

ampicilina/sulbactam, cefatoxima eritromicina, ac.nalidíxico, ceftacidime, aztreonam, vancomicina, cefuroxima, rifampicina, nitrofurantoina, oxacilina, nefilmicina amikacina, kanamicina ticarcilina, clindamicina, ampicilina.

- 5 Resultados: Los resultados de las pruebas de sensibilidad se muestran en la Tabla 5. Todas las cepas con un diámetro de inhibición de 0 son resistentes al antibiótico probado. De acuerdo a los resultados se puede concluir que la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es resistente a los aminoglucósidos.

Resultados de los halos de inhibición de cada uno de los antibióticos probados frente a la cepa de <i>Bifidobacterium animalis</i> PTA-9175	
Antibiótico	Halo de inhibición (mm)
Norfloxacin	0
Cefalotina	24
Azitromicina	30
Eritromicina	40
Ceftacidime	38
Vancomicina	27
Rifampicina	2
Oxacilina	0
Nefilmicina	0
Kanamicina	0
Clindamicina	43
Tobramicina	0
Ampicilina/Sulbactam	30
Cefatoxima	40

Ácido nalidíxico	0
Aztreonam	0
Cefuroxima	25
Nitrofurantoína	40
Ofloxacina	12
Amikacina	0
Ticarcilina	40
Ampicilina	35

Tabla 5

Determinación de la hemólisis en sangre humana

- 5 Método: Se prepararon placas de agar MRS y se suplementaron con sangre humana al 5 %. Las placas se sembraron con la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 y se incubaron en condiciones de anaerobiosis por 48 horas.

 Resultado: No se observó hemólisis en las colonias desarrolladas de la cepa de
10 *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

Resistencia a la acidez del estómago

- Método: Se preparó un frasco con 300 mL de HCl pH 1 y se añadieron 25 ml de
 leche pH 4.5 + 1 ml de una suspensión de 10^{13} de la cepa de *Bifidobacterium animalis*
15 PTA-9175.

 Se mezcló suavemente y se tomaron muestras cada 30 min hasta completar 3
 horas. Las muestras se sembraron en medio MRS y se incubaron en anaerobiosis.

Resultados: Se observó desarrollo en todas las muestras tomadas hasta las 3 horas. Con este resultado se concluye que la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es resistente a la presencia de ácido.

5 Resistencia a bilis

Método: Se prepararon placas de agar MRS y se suplementaron con bilis humana obtenida por colecistectomía laproscópica hasta concentraciones finales de 0.3 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % y 7.5 %.

10 Las placas se incubaron en anaerobiosis a 37 °C por 72 h. Se sembró además una placa de la misma suspensión de bacterias en una placa sin bilis.

Se contó el número de colonias desarrolladas en el control y en las placas con bilis y se calculó el porcentaje de inhibición.

15

Para determinar si el efecto era bacteriostático o bactericida, de las placas en las cuales no hubo crecimiento, se tomó de la superficie del agar una muestra con hisopo para resembrar en un medio MRS sin bilis.

20

Resultados: En la placa control se desarrollaron 115 colonias, en la placa 2 se desarrollaron 78 y en la placa 3 se desarrollaron 17 colonias por lo que los porcentajes de inhibición fueron del 67.8 % para la placa con 0.3 % de bilis y del 14.8 % para la placa con 1 % de bilis. No hubo desarrollo en las placas con 2 %, 3 %, 4 %, 5 % y 6 % de bilis.

25

Cada una de las placas en las cuales no hubo desarrollo (de la 4 a la 8), se sembró en agar MRS sin bilis determinar si el efecto era bacteriostático o bactericida.

No se obtuvo crecimiento en ninguna placa por lo que se asume que un porcentaje ≥ 2 % de bilis tiene efecto bactericida sobre la cepa *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

Adherencia a moco y/o células epiteliales humanas y líneas celulares

5

Se emplearon las líneas celulares Caco-2, HT-29.

Preparación del cultivo celular: Para obtener el volumen de células necesario para enfrentarlas a cepa *Bifidobacterium animalis* PTA-9175, se utilizó la técnica de
10 transferencia o propagación de líneas celulares adherentes formadoras de monocapa de un cultivo base a otro.

A partir de un vial con un stock de cada una de las células, se inoculó el medio completo Eagle modificado (MEM) con suero fetal bovino al 20 % y 50 μg de
15 gentamicina por ml de medio completo para las células Caco-2 y MacCoy para las células HT-29. Se incubó a 37 °C con 5 % de CO_2 y se observó diariamente hasta observar un crecimiento confluyente.

Se les eliminó el medio de cultivo, se agregó 1 ml de tripsina 0.25 % -EDTA,
20 por cada cm^2 de monocapa y se dejó 1 hora en incubación a 37 °C hasta que se observó al microscopio que las células estaban desprendidas. Las células despegadas se colectaron en tubos Falcon y se inactivó la tripsina añadiendo 1.5 ml de medio completo por cada ml de tripsina utilizado.

25 Se centrifugó a 1,000 rpm por 3 min y se elimina el sobrenadante con tripsina. El botón de células obtenido se lavó con una solución de PBS 1X y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones.

El botón de células se resuspendió suavemente en 1 ml de medio MEM o MacCoy por cada 10 cm² de monocapa. De esta suspensión de células se tomaron alícuotas de 0.5 ml y se transfirieron a botellas de 25 cm², y se les agregaron 7.5 ml de medio completo. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %
5 por 48 a 72 horas o hasta observar confluencia en los frascos.

Enfrentamiento de la cepa *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 a cada una de las líneas celulares: Se preparó una suspensión de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 y se inocularon 10⁵ bacterias en los frascos de cultivo celular con cultivo
10 confluyente. Se continuó la incubación por 24 h y se observó al microscopio si las bacterias están adheridas a las células por movimientos suaves del frasco mientras se observaba.

Resultados: Se observó adherencia aproximada del 20 % de las células a la
15 línea celular Caco-2. Para las células HT-29 se observó una adherencia aproximada del 30 %.

Actividad antimicrobiana contra patógenas

Método: Se obtuvieron cultivos jóvenes de *S. aureus*, *E. coli* O157:H7,
20 *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica* y se prepararon suspensiones con turbidez correspondiente al tubo 1 de MacFarland.

La cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 se cultivó en medio MRS en
25 condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 48 h. Se realizó una suspensión en solución salina ajustando la concentración a la correspondiente al tubo 4 del nefelómetro de MacFarland.

El inóculo preparado se inoculó en agar MRS de 3 mm de profundidad por estría cerrada y con hisopo en el centro de cada placa (un área de 1 por 1.5 pulgadas). Las placas se incubaron en anaerobiosis por 48 h a 37 °C. Después de ese tiempo, las placas se rellenaron con 10 ml de agar sangre para *H. pylori* y medio de cultivo BHI para el resto de las bacterias. El medio se vació fundido, esterilizado y enfriado a aproximadamente 45 °C previamente inoculado con 1 ml de una suspensión del patógeno de prueba. Se permitió que el agar solidificara y las placas se incubaron a 37 °C en microaerobiosis para *H. pylori* y en aerobiosis para el resto de las bacterias, por 48 h para *H. pylori* y 24 para el resto de las bacterias.

10

Luego de observarse la inhibición del crecimiento de los patógenos de prueba, se tomó muestra de la zona de inhibición con un hisopo estéril y se resembró en el medio de cultivo correspondiente.

15

Resultado: Se detectó inhibición del crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica* por la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

20

Luego de observarse la inhibición del crecimiento de los patógenos de prueba, se tomó muestra de la zona de inhibición con un hisopo estéril y se resembró en el medio de cultivo correspondiente. Se observó crecimiento en todas las resiembras realizadas, lo cual mostró que el efecto de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es bacteriostático y no bactericida.

25

Actividad de determinación de materiales extractromosómicos

Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómico se replican intracelularmente de manera autónoma y, aunque en la mayoría de las ocasiones no

son esenciales para la viabilidad de la célula, contienen genes que confieren distintas propiedades como la resistencia a antibióticos, virulencia o actividades metabólicas.

Para la investigación de plásmidos de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 se llevó a cabo extracción del DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina y visualización por electroforesis en gel de agarosa. Se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

Método: Se resuspendió un cultivo joven de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en 200 µL de amortiguador de lisis: solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 10 mM). Después de 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 400 µL de una solución alcalina recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) y se mezcló por inversión de 3 a 6 veces. Se colocó el tubo en hielo por 5 min, se agregaron 300 µL de acetato de amonio 7.5 M pH=7.8 y se mezcló suavemente por inversión el contenido del tubo durante unos segundos. Se mantuvo el tubo en hielo por 10 min para dejar que la mayoría de las proteínas, RNA de alto peso molecular y el DNA cromosómico se precipitaran. Posteriormente, se centrifugó por 9 min a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se agregaron 650 µL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 20 a 30 min. Se centrifugó 14,000 rpm por 15 min, se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla por inversión con 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó 3 min a 14,000 rpm y se dejaron los tubos invertidos en una hoja de papel por 14 min a temperatura ambiente para secar. Se disolvió la pastilla en 50 a 100 µL de TE 1X, se añadieron 5 µL de RNA'sa 1 mg/mL e incubó 15 min a 37 °C. Se corrió un gel en agarosa al 2 % para detectar la presencia de material genético.

Resultados: En el gel de la electroforesis no se detectó material genético correspondiente a plásmidos.

Actividad de hidrolasa de bilis

Método: La actividad de hidrolasa de sales biliares se llevó a cabo por determinación de la liberación de aminoácidos de las sales biliares.

5 Se suspendió un cultivo joven de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en amortiguador de fosfato pH=7 y se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador de fosfato de sodio pH=7 y se resuspendieron en el mismo amortiguador para dar una densidad de 5 a 10 unidades ópticas a 600 nm. Diez ml de esta suspensión celular se sonicaron por 3 min y la mezcla se centrifugó
10 por 10 min a 20,000 rpm. El sobrenadante se mantuvo como extracto libre de células.

Se mezclaron 180 µl de amortiguador (fosfato de sodio 0.1 M pH=6), 10 µl de muestra, 10 µl de mezcla de sales biliares humanas, y se calentó 37 °C. Se tomó una muestra de 50 µl después de 10 y 30 min y la muestra se mezcló inmediatamente con
15 TCA al 15 %. Estas muestras centrifugaron a la máxima velocidad para remover el precipitado.

Para la segunda reacción, una alícuota del sobrenadante se mezcló con agua para dar un volumen de 100 µl (20 de muestra y 80 de agua). A esta mezcla se
20 añadieron 1.9 ml de ninhidrina en amortiguador de citrato de sodio 0.5 M pH=5.5, 1.2 ml de glicerol y 0.2 ml de amortiguador de citrato de sodio pH=5.5. Se mezcló vigorosamente y se hirvió por 14 min. Posteriormente los tubos se enfriaron y se midió la absorbancia a 570 nm.

25 Se emplearon cepas de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacteroides* como controles de la producción de la hidrolasa de bilis. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados: Se detectó actividad de hidrolasa de bilis en las cepas empleadas como controles positivos. No se detectó actividad alguna en la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

- 5 Conclusiones: La habilidad de las bacterias probióticas para hidrolizar las sales biliares ha sido incluido entre los criterios para seleccionar a una bacteria como probiótica, y una gran diversidad de hidrolasas de sales biliares se ha identificado y caracterizado. Sin embargo la actividad de esta enzima ha mostrado también un efecto dañino en el hospedero y que algunas bacterias patógenas, tal como *L.*
- 10 *monocytogenes* y otras potencialmente patógenas como *Enterococcus faecalis* la producen.

PRUEBAS *IN VIVO*

15 Determinación de la falta de infectividad en animales inmunocomprometidos

Método y Resultados: Se utilizaron ratones BALB/c, machos, comprados en Harlan-México, de 6 semanas de edad.

- 20 Se preparó un cultivo de 20 h de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en medio de leche (leche descremada al 10 %, clorhidrato de cisteína al 0.05 % y extracto de levadura al 0.5 %). Este cultivo se empleó para administrar las dosis a los animales. Las dosis y frecuencia se detallan a continuación.

Etapa 1. Sin ciclofosfamida

- 25 Grupo 1. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} dos veces al día durante 18 días (0.2 ml/ oral)

Peso al inicio del tratamiento: 21.05 gr

Peso al final del tratamiento: 19.58 gr

Perdieron 1.47 gr de peso

Grupo 2. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} dos veces al día durante 24 días (0.2 ml/oral)

5 Peso al inicio del tratamiento: 21.74 gr

Peso al final del tratamiento: 22.77 gr

Ganaron 1.03 gr de peso

Grupo 3. 10 ratones

10 Inóculo: 10^{10} tres veces al día durante 18 días (0.2 ml/oral)

Peso al inicio del tratamiento: 22.32 gr

Peso al final del tratamiento: 21.09 gr

Perdieron 1.23 gr de peso

15 Grupo 4. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} tres veces al día durante 24 días (0.2 ml/oral)

Peso al inicio del tratamiento: 23.09 gr

Peso al final del tratamiento: 23.8 gr

Ganaron: 0.71 gr de peso

20

Etapa II. Con ciclofosfamida (200 mg/kg/ cada 7 días)/IP (neutropenia permanente)

Grupo 1. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} dos veces al día durante 18 días (0.2 ml/oral)

25 Peso al inicio del tratamiento: 22.23 gr

Peso al final del tratamiento: 19.06 gr

Perdieron: 3.17 gr de peso

Grupo 2. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} dos veces al día durante 24 días (0.2 ml/oral)

Peso al inicio del tratamiento: 21.88 gr

Peso al final del tratamiento: 19.68 gr

5 Perdieron: 2.20 gr de peso

Grupo 3. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} tres veces al día durante 18 días (0.2 ml/oral)

Peso al inicio del tratamiento: 20.84 gr

10 Peso al final del tratamiento: 17.17 gr

Perdieron: 3.67 gr de peso

Grupo 4. 10 ratones

Inóculo: 10^{10} tres veces al día durante 24 días (0.2 ml/oral)

15 Peso al inicio del tratamiento: 20.97 gr

Peso al final del tratamiento: 19.75 gr

Perdieron: 1.22 gr de peso

20 Manejo de los animales al fin de los períodos indicados. Al término de los periodos indicados, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajeron esófago, estómago, ciego, riñón, bazo, hígado. Se colocaron en frascos con formaldehído y se enviaron a estudio anatomopatológico.

25 Observaciones en los animales durante el estudio: Durante el estudio, los ratones del grupo sin ciclofosfamida no presentaron fiebre, no hubo cambios en su comportamiento, ni cambios en su pelaje. Los ratones del grupo con ciclofosfamida no presentaron fiebre, su comportamiento fue de estar mucho tiempo agrupados, no presentaron cambios en el pelaje.

En los órganos extraídos no se observaron macroscópicamente cambios en coloración y tamaño. No se observó la formación de abscesos.

5 En el estudio histopatológico, no se encontró la presencia de bacterias en ninguna de las muestras estudiadas. No se detectaron alteraciones histológicas con inflamación. Se detectaron alteraciones relacionadas con estrés en hígado y bazo.

Conclusiones: Bajo las condiciones establecidas en este estudio, la
10 administración oral en ratones normales y en ratones tratados con ciclofosfamida con la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 no mostró toxicidad visible.

Determinación de efectos adversos durante estudios en humanos

Selección de individuos: Se evaluaron de 24 sujetos sanos a los cuales se les
15 realizó coproparasitoscópico único para búsqueda de parásitos, así como interrogatorio completo para corroborar su buen estado de salud incluyendo una toma de muestra de sangre basal para la realización de una química sanguínea (glucosa, urea y creatinina), una biometría hemática completa y una prueba de embarazo a las mujeres.

20

Todos los sujetos de estudio mostraron valores normales en los parámetros de la química sanguínea, así como en la biometría hemática.

Los sujetos fueron divididos al azar en dos grupos para recibir placebo (grupo
25 A) (n=13, media de edad = 25, rango =19-50, F/M = 7/6) o el yogurt suplementado con la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 (grupo B) (n= 11, media de edad = 24, rango de edad =19-33, F/M= 8/3).

Diseño de la fase: Esta fase duró dos semanas, durante las cuales se administraron dos botellas diarias de yogurt de 250 mL c/u de acuerdo al grupo de prueba.

- 5 Evaluación clínica: Los sujetos fueron instruidos para referir cualquier cambio en su hábito intestinal o ingesta de cualquier medicamento que pudiera interferir con el estudio.

- 10 Recolección de muestras de heces: Luego de una y dos semanas de ingesta de yogurt se recolectaron muestras de heces para búsqueda de Bifidobacterias y su tipificación molecular.

Análisis de Bifidobacterias

- 15 A la primera y segunda semana de estudio, se tomaron 3 colonias identificadas como Bifidobacterias de cada paciente y cada una de ellas se cultivó para obtención de biomasa, extracción de DNA e identificación molecular empleando una PCR.

- 20 Todas las cepas se sometieron a genotipificación empleando el primer 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' para la identificación del patrón característico.

- Para complementar el estudio, se llevó a cabo el cultivo, extracción de DNA y genotipificación por ERIC-PCR de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 administrada.

- 25 El cronograma de estudio se muestra en la Tabla 6.

Cronograma de estudio	
Procedimiento	Semana de estudio

	0	1	2
Evaluación clínica	X	X	X
Ingesta de yogurt		X	X
Cultivo de heces para Bifidobacterias		X	X

Tabla 6

Resultados

5 Cuenta de leucocitos: No se observaron diferencias en las cuentas de leucocitos entre la toma de sangre basal y la toma a la primera semana del estudio en ninguno de los dos grupos de estudio ($p < 0.05$).

10 Peso: No se detectó incremento o disminución en el peso durante las dos semanas de estudio en ninguno de los dos grupos ($p < 0.05$).

 Presión arterial: No hubo incrementos ni disminuciones de la presión arterial en ninguno de los grupos durante las dos semanas de estudio

15 Escala de Bristol. En el grupo A, 4 pacientes incrementaron en un valor de la escala de Bristol y el resto permanecieron sin cambios

 En el grupo B, 1 paciente incrementó un valor en la escala de Bristol. El resto permanecieron sin cambios.

20

 Color de las heces: No hubo cambios en el color de las heces en ninguno de los grupos de estudio.

Consistencia de las heces: En 5 pacientes del grupo A se mejoró la consistencia de las heces y en el grupo B, 5 pacientes se mejoró la consistencia de las heces.

No hubo diferencia entre los grupos de estudio ($p < 0.05$).

5

Número de evacuaciones: No hubo diferencia en la frecuencia de las evacuaciones entre los grupos de estudio. ($p < 0.05$).

Cantidad de evacuación: No hubo diferencia en cantidad de evacuación entre los grupos de estudio. ($p < 0.05$).

10

Satisfacción luego de la primera y segunda semana de ingesta de yogurt: En el grupo A, dos sujetos refirieron sentirse muy bien después de dos semanas de consumo de yogurt. Dos individuos refirieron sentirse muy bien.

15

En el grupo B un individuo manifestó sentirse regular a la primera semana y en la segunda uno de ellos refirió sentirse muy bien. Todos los demás reportes fueron de sentirse bien.

Constipación: Un paciente en el grupo A y un paciente en el grupo B refirieron constipación a la primera semana de consumo de yogurt. La constipación se resolvió a la segunda semana de consumir yogurt.

20

Diarrea: Ninguno de los individuos de estudio describió la presencia de diarrea.

25

Dolor abdominal: En el grupo A ningún individuo refirió dolor abdominal. En el grupo B, un individuo refirió dolor abdominal leve el cual persistió la segunda semana.

Plenitud postprandial: En el grupo A no hubo reporte de plenitud postprandial. En el grupo B, dos pacientes reportaron plenitud postprandial la primera semana que desapareció la segunda semana de consumo de yogurt.

5 Flatulencia: No hubo diferencias en la presencia de flatulencia entre los grupos de estudio.

Distensión abdominal: Ninguno de los individuos del grupo A mostraron distensión abdominal. Uno de los sujetos del grupo B mostró distensión abdominal la
10 primera semana de consumo de producto, la cual desapareció la segunda semana de consumo de yogurt.

Efectos adversos: Dos pacientes del grupo A presentaron fiebre durante el estudio. Ninguna de las dos ameritó la administración de antibióticos por lo que
15 continuaron en el estudio.

Una de las pacientes presentó faringitis viral documentada clínicamente. La otra paciente presentó una febrícula que cursó con mialgias y artralgias. El malestar desapareció en aproximadamente 6 horas.

20

Análisis de *Bifidobacterias*: Se llevó a cabo la genotipificación de todas las cepas de *Bifidobacterias* recuperadas y se encontró el patrón característico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en 5 sujetos del grupo B y en ninguno de los sujetos del grupo A.

25

Conclusión: En los estudios en humanos no se encontraron datos que sugirieran infectividad de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

CARACTERISTICAS DE LA CEPA DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* PTA-9175

De los resultados mostrados anteriormente, se concluye que la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 del invento tiene las características deseables de una cepa probiótica, pues:

- Corresponde a la especie *Bifidobacterium animalis*, de la cual se ha demostrado su actividad probiótica en repetidas publicaciones.

- Es de origen humano, particularmente proviene de heces de bebés.

- No es hemolítica.

- Su morfología es de bacteria Gram positiva en forma de bacilo no porulado.

- Su nivel de producción de ácido fólico es de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

- Resiste la presencia de bilis, aunque en pequeñas cantidades.

- Es resistente al pH del estómago.

- Es capaz de adherirse a células intestinales.

- Inhibe el desarrollo *in vitro* de diferentes bacteria patógenas.

- Mostró seguridad al ser administrada en animales inmunosuprimidos.

- Mostró que es segura para administrarse en humanos.

- No posee plásmidos.

20 PREPARACIÓN DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS CONTENIENDO CEPA DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* PTA-9175

A continuación se describen ejemplos de realizaciones para preparar productos alimenticios que contengan la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

25

Un modo de preparación para producir productos alimenticios de leche fermentada, por ejemplo yogurt, que contengan la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es agregar para su cultivo un mínimo de 25 % de cultivo de cepa de

Bifidobacterium animalis PTA-9175 al volumen total leche entera, leche reconstituida, suero de leche o leche descremada y mezclarlo, y posteriormente agregar el sabor a fruta, agua, endulzantes, saborizantes o pulpa de frutas deseado, a fin de producir una bebida láctea novedosa, y batir. La cantidad de cultivo de cepa de *Bifidobacterium*
5 *animalis* PTA-9175 agregado puede variar y puede agregarse en mayor o menor cantidad. Todos los ingredientes para hacer crecer a la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 son de grado alimenticio por lo que el cultivo es 100 % seguro y se puede consumir directamente una vez que se le haya agregado el sabor deseado.

10 En alimentos como el queso, el cultivo de cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 puede ser agregado en la última fase de elaboración del producto. En otro tipo de productos como leche en polvo, jugos, café, bebidas refrescantes, polvos para preparar bebidas, postres, carnes frías, dulces, etc., el cultivo de cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 puede ser liofilizado y una vez obtenido el polvo se
15 puede agregar en dichos productos en la etapa final donde no sea sometido a un proceso de calentamiento posterior. En el caso de alimentos preparados y congelados el cultivo puede ser agregado una vez que el producto esté listo para consumir. Es importante no agregar el cultivo de cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 si el alimento será sometido a calentamiento.

20

En una realización alternativa el producto alimenticio puede incluir además otras bacterias probióticas afines a la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

En otra realización, la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 puede se
25 usada para preparar un producto farmacéutico para tratamiento de deficiencia de ácido fólico.

En base a las realizaciones descritas anteriormente, se contempla que las modificaciones de las realizaciones descritas, así como de las realizaciones alternativas serán consideradas evidentes para una persona experta en el arte de la técnica bajo la presente descripción. Es por lo tanto, contemplado que las reivindicaciones abarcan

5 dichas modificaciones y alternativas que estén dentro del alcance del presente invento o sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175
5 como productora de ácido fólico.

2. El cultivo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la
producción de ácido fólico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es de
120 ng/ml a 398 ng/ml.

3. Una composición alimenticia que comprende:

un producto alimenticio; y

un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-
9175 como productor de ácido fólico.

4. La composición alimenticia de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada
porque dicho producto alimenticio es seleccionado de un grupo que consiste de
productos de leche fermentada, leche en polvo, queso, carnes frías, bebidas
refrescantes, polvos para preparar bebidas, jugos, dulces y sus combinaciones.

5. La composición alimenticia de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada
porque dicho producto de leche fermentada es yogurt.

6. La composición alimenticia de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada
porque la producción de ácido fólico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-
9175 es de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

7. La composición alimenticia de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque incluye otras bacterias probióticas afines al cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175.

5 8. Una composición farmacéutica para el tratamiento de deficiencia de ácido fólico que comprende un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 como productor de ácido fólico.

9. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada
10 porque la producción de ácido fólico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

10. Uso de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 como probiótico productor de ácido fólico en composiciones alimenticias.

15

11. El uso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la producción de ácido fólico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

20 12. El uso de conformidad con la reivindicación 10, para la preparación de productos alimenticios de leche fermentada.

13. Uso de una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de deficiencia de ácido fólico.

25

14. El uso de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque la producción de ácido fólico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

15. Un método para producir un producto alimenticio de leche fermentada conteniendo *Bifidobacterium animalis* viable y productora de ácido fólico, el método comprende el paso de cultivar una cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 en un medio que consiste de leche, leche reconstituida, suero de leche, leche entera o leche descremada.

5

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la producción de ácido fólico de la cepa de *Bifidobacterium animalis* PTA-9175 es de 120 ng/ml a 398 ng/ml.

10

17. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque dicho producto de leche fermentada es yogurt.

1/1

1 2 3 4 5 6 7 8 9

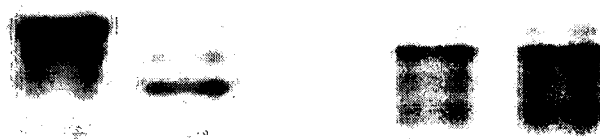


FIG. 1