

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 661**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 9/48** (2006.01)

**A23L 19/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2015** **PCT/NZ2015/050200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016** **WO16085356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2015** **E 15863825 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2025** **EP 3223838**

54 Título: **Composiciones de kiwi amarillo y procedimientos de preparación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**28.11.2014 NZ 70245414**

**27.03.2015 NZ 70640515**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.06.2025**

73 Titular/es:

**ANAGENIX IP LIMITED (100.00%)**

**Level 1, 272 Parnell Rd**

**Parnell, Auckland 1010, NZ**

72 Inventor/es:

**ANSELL, JULIET y**

**BLATCHFORD, PAUL**

74 Agente/Representante:

**DÍAZ NUÑEZ, Joaquín**

ES 3 023 661 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

Composiciones de kiwi amarillo y procedimientos de preparación y uso de las mismas

## 5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones preparadas a partir de kiwi amarillo, *Actinidia chinensis*. También están relacionados procedimientos de preparación de dichas composiciones y procedimientos de uso de dichas composiciones, incluyendo procedimientos de tratamiento o prevención de trastornos del aparato gastrointestinal.

## 10 Antecedentes de la invención

El tubo gastrointestinal alberga aproximadamente  $10^{14}$  células microbianas, que consisten en más de 1000 especies o filotipos, la mayoría de los cuales se hallan en el colon (Rajilic-Stojanovic y de Vosm 2014; Qin *et al.* 2010; Egert *et al.* 2006). El intestino grueso es un sitio de fermentación metabólicamente activo, caracterizado por diversas e intrincadas relaciones microbianas que son fundamentales para la salud humana (Backhed *et al.* 2005). Los datos experimentales han demostrado hasta qué punto la microbiota colónica y su huésped humano existen en un delicado estado de equilibrio. Se ha demostrado que la microbiota está asociada con una amplia gama de beneficios para la salud, incluyendo función y maduración inmunitarias mejoradas, comportamiento modificado, regulación de la saciedad, inhibición de patógenos, aumento de la absorción de minerales y mantenimiento del equilibrio energético (Geurts *et al.* 2014; Parnell y Reimer 2012; Bravo *et al.* 2011; Buffie y Pamer 2013).

Esta interdependencia huésped-microbiota se ha ilustrado en un estudio usando ratones y peces cebra, donde las microbiotas naturales de cada uno se trasplantaron a representantes libres de gérmenes de las otras especies. Se descubrió que la composición volvería a revertir para parecerse a la de la microbiota del huésped natural (Rawls *et al.* 2006). Los desequilibrios en la composición de la comunidad microbiana provocados por la alimentación, genética, edad, estrés o xenobióticos pueden inducir un estado de disbiosis que puede promover una microbiota más susceptible a las enfermedades. El consumo de determinados tipos de componentes alimenticios tiene una influencia importante en las comunidades de microorganismos colónicos, observándose típicamente los cambios dentro de las 24 horas posteriores al consumo (Wu *et al.* 2011; Parker *et al.* 2012).

En el tubo gastrointestinal humano, *Faecalibacterium prausnitzii* es una de las especies más pobladas, observándose típicamente en más de un 5 % de la proporción total de la microbiota colónica de adultos sanos (Miquel *et al.* 2013). Los miembros del filo Firmicutes, *F. prausnitzii*, son habitantes comensales del intestino grueso humano, con propiedades antiinflamatorias demostradas *in vivo* (Sokol *et al.* 2009; Furet *et al.* 2010). Los bajos niveles de *F. prausnitzii* se han asociado repetidamente con una gama de trastornos intestinales, incluyendo síndrome del intestino irritable (SII), atopia, diabetes y enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tales como enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) (Sokol *et al.* 2009; Furet *et al.* 2010; Rajilic-Stojanovic *et al.* 2011; Candela *et al.* 2012; Willing *et al.* 2010). Estas observaciones consecuentes muestran que una concentración empobrecida de *F. prausnitzii* es una conclusión indeseable y, por lo tanto, cualquier tratamiento que pueda estimular selectivamente su proliferación probablemente valga la pena.

Los mecanismos por los que *F. prausnitzii* facilita sus efectos promotores de la salud se han atribuido a la producción de butirato y efectos antiinflamatorios. Un estudio con ratones por Sokol y colaboradores descubrió que el sobrenadante de *F. prausnitzii* o *F. prausnitzii* reducía la gravedad de la colitis inducida químicamente, promovía la síntesis de citocinas antiinflamatorias y mitigaba la producción de citocinas proinflamatorias, lo que sugiere que los efectos antiinflamatorios están mediados por metabolitos secretados (Sokol *et al.* 2008). Además, *F. prausnitzii* genera grandes cantidades de butirato, así como algo de lactato y formiato como resultado de la fermentación de carbohidratos (Duncan *et al.* 2002; Duncan *et al.* 2004).

El estreñimiento es una afección común que puede afectar significativamente a la calidad de vida de un individuo, con un deterioro que se compara al de enfermedades crónicas graves, tales como la diabetes y la artrosis. Se estima que hasta un 20 % de la población mundial padece esta afección, siendo las mujeres y los individuos mayores de 65 años los afectados con mayor frecuencia (Attaluri *et al.* 2011; Udani y Bloom 2013). Las complicaciones que pueden surgir del estreñimiento incluyen fisuras anales, prolapso rectal e impactación fecal. El esfuerzo para hacer pasar las heces puede dar lugar a hemorroides. En etapas posteriores del estreñimiento, el abdomen se puede distender, endurecer y volverse difusamente sensible. Los casos graves pueden presentar síntomas de obstrucción intestinal, por ejemplo, vómitos y dolor abdominal, así como encopresis, donde las heces blandas del intestino delgado eluden la masa de materia fecal impactada en el colon.

Es bien sabido que la alteración del equilibrio de la microbiota en el tubo digestivo puede cambiar la motilidad intestinal, dando como resultado estreñimiento (Husebye *et al.* 2001; Rhee *et al.* 2001). Además, los pacientes con estreñimiento intestinal crónico presentan un desequilibrio en la microbiota, caracterizado por una disminución relativa de bacterias beneficiosas y un incremento de bacterias y hongos potencialmente patógenos (Khalif *et al.* 2005). Dichos pacientes muestran un incremento significativo de los recuentos de *E. coli*, *S. aureus* y enterobacterias (Khalif *et al.* 2005).

Además, una progresión de la enfermedad más prolongada del estreñimiento crónico da lugar a mayores puntuaciones para los microorganismos indeseables y menores puntuaciones para los deseables (Khalif *et al.* 2005). En un estudio con niños a los que se les ha diagnosticado estreñimiento crónico, se descubrió disbiosis intestinal en las heces, con un incremento significativo de los recuentos de *Clostridium*, *Bacteroides* y *E. coli* (Zoppi *et al.* 1998). Un estudio particular ha descubierto una disminución significativa del recuento de las cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en las heces de individuos estreñidos; dicha disminución es hasta diez veces menor para el género de *Bifidobacterium* (Chassard *et al.* 2012).

Las opciones de intervención para el estreñimiento siguen siendo difíciles y complicadas, y muchos individuos no están satisfechos con los tratamientos y medicamentos actuales. Estas incluyen modificaciones higiénico-dietéticas y alimentarias, tales como un consumo incrementado de frutas y verduras, aporte complementario de fibra (metilcelulosa; glucomanano de konjac, psyllium), ingesta incrementada de líquidos y ejercicio, así como intervención farmacológica con laxantes emolientes, laxantes estimulantes y laxantes osmóticos (Attaluri *et al.* 2011; Leung *et al.* 2011; Liu 2011).

El uso rutinario de laxantes está contraindicado, ya que los pacientes pueden llegar a ser dependientes tras su uso. Se pueden usar enemas para proporcionar una forma de estimulación mecánica. Por otra parte, los enemas típicamente solo son útiles para las heces en el recto, no en el tubo intestinal. Se han puesto a disposición en el mercado una gama en incremento de productos herbarios y otros naturales (incluyendo aloe y ruibarbo (Udani y Bloom 2013)) publicitados para ayudar a la laxación. Aún, solo hay evidencia anecdótica con respecto a su eficacia y éxito para dar alivio al estreñimiento.

Por el contrario, es bien conocido que la fibra es importante para la digestión —la fibra soluble atrae agua, lo que ayuda a ralentizar la digestión, y la fibra insoluble añade volumen a las heces para ayudar a la laxación—. Las enzimas también ayudan a la digestión al descomponer los grandes compuestos alimenticios en fragmentos más pequeños y manejables. Por ejemplo, la amilasa descompone el almidón en azúcares simples y las proteasas descomponen las proteínas en aminoácidos. Sin embargo, los aportes complementarios de fibra y enzimas por sí solos son, en gran medida, ineficaces para el estreñimiento de tránsito lento (retardo prolongado en el tránsito de las heces a través del colon) y los trastornos de la defecación. Además, dicho aporte complementario puede tener efectos secundarios no deseados, tales como excesiva producción de gases e hinchazón incómoda.

El kiwi verde (por ejemplo, *Actinidia deliciosa* var. Hayward) se ha destacado como un producto eficaz en el área de la digestión, con varios estudios demostrando ahora su eficacia (Stonehouse *et al.* 2012). El consenso actual es que el efecto de laxación del kiwi verde parece deberse principalmente a su contenido de fibra alimenticia y actinidina (enzima) (Chang *et al.* 2010; Rush *et al.* 2002, Stonehouse *et al.* 2012, Drummond y Gearry 2013).

Por el contrario, el kiwi amarillo (por ejemplo, *Actinidia chinensis* var. Hort16A) no se asocia tradicionalmente con la laxación (Ferguson 2003; Rush 2002). Se ha señalado que el kiwi amarillo tiene poco/ningún contenido de actinidina y menos fibra alimenticia que el kiwi verde. Se ha investigado la variedad Hort16A de kiwi en cuanto a su efecto sobre la inmunidad (Hunter *et al.* 2012; Skinner 2012), con el argumento de que los reducidos o menores efectos laxantes del kiwi amarillo lo convierten en una elección ideal para promover naturalmente la inmunidad, en particular, en niños donde puede no ser deseable una laxación incrementada (Adaim 2010).

Dada la aparición de trastornos gastrointestinales en la población, hay una necesidad de obtener nuevas composiciones, en particular, composiciones derivadas de fuentes naturales, para restablecer y mantener la salud digestiva.

## Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención comprende una composición preparada a partir de kiwi amarillo secado, en la que el kiwi amarillo secado es un kiwi *Actinidia chinensis* Zesy002, para su uso en el tratamiento o prevención de uno o más síntomas de estreñimiento al mejorar una disminución de los niveles de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo de un sujeto.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición preparada a partir de kiwi amarillo secado, en la que el kiwi amarillo secado es un kiwi *Actinidia chinensis* Zesy002, para su uso en el tratamiento o prevención de uno o más síntomas de estreñimiento al incrementar los niveles de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo de un sujeto.

También se divulga un procedimiento de preparación de una composición de kiwi, que comprende:

- obtener kiwi amarillo que sea una variedad Gold3 o un derivado genético de la misma;
- extraer la piel del kiwi y triturar a un tamaño de tamiz menor de 1 mm; y
- secar el triturado y producir un polvo.

El procedimiento puede comprender además extraer las semillas del kiwi antes de la trituración.

El procedimiento puede comprender además triturar el kiwi para obtener un triturado con un valor Brix de 16 a 21°.

El procedimiento puede comprender además triturar el kiwi para obtener un triturado con una viscosidad de 11,0 a 13,0, o de 10,0 a 14,0, medida a 12,5° Brix, 20 °C.

- 5 El procedimiento puede comprender además liofilizar el triturado y molerlo para producir el polvo.
- El procedimiento puede comprender además enriquecer la composición en polifenoles.
- 10 El procedimiento puede comprender además añadir polifenoles a la composición.
- El procedimiento puede comprender además secar el triturado durante de 24 a 56 horas.
- El procedimiento puede comprender además liofilizar el triturado durante de 40 a 56 horas.
- 15 Se puede preparar una composición a partir de kiwi amarillo secado, en la que el kiwi amarillo secado sea un kiwi Gold3 o un derivado genético de la misma. El polvo se puede producir por un procedimiento de una cualquiera de las afirmaciones precedentes.
- 20 La composición se puede formular para su administración enteral.
- La composición se puede formular para su administración oral.
- La composición se puede formular como un comprimido o una cápsula.
- 25 La cápsula puede ser una cápsula de gelatina.
- El comprimido o cápsula se puede formular para comprender de 400 a 800 mg del polvo.
- De forma alternativa, la cápsula se puede formular para comprender de 100 a 1000 mg del polvo.
- 30 La composición se puede formular como líquido.
- El líquido se puede formular para comprender de 400 a 800 mg del polvo por unidad de dosificación.
- 35 La composición se puede formular como un gel o un sobre.
- La composición se puede formular en combinación con otra ayuda digestiva.
- La composición se puede formular en combinación con una o más composiciones prebióticas, probióticas o simbióticas.
- 40 La composición se puede formular en combinación con fibra y/o una enzima digestiva.
- La composición se puede complementar con polifenoles.
- 45 Se divulga un procedimiento de tratamiento o prevención del estreñimiento, o mantenimiento o mejora de la regularidad intestinal, que comprende:
- 50 administrar a un sujeto una composición de una cualquiera de las afirmaciones precedentes, tratando o previniendo, de este modo, el estreñimiento, o manteniendo o mejorando la regularidad intestinal, en el sujeto.
- La composición se puede administrar por vía enteral.
- La composición se puede administrar por vía oral o por vía rectal.
- 55 La composición se puede administrar como un comprimido, cápsula o líquido.
- La composición se puede administrar como un gel o un sobre.
- La cápsula puede ser una cápsula de gelatina.
- 60 La composición se puede administrar a una dosificación de 2000 a 4000 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.
- De forma alternativa, la dosificación puede ser de 250 a 2500 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.
- 65 La composición se puede coadministrar con otra ayuda digestiva.

- La composición se puede coadministrar con una o más composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas.
- 5 La composición se puede coadministrar con fibra y/o una enzima digestiva.
- La composición se puede complementar con polifenoles.
- 10 Se divulga un procedimiento de tratamiento o prevención del desequilibrio de la microbiota en el tubo digestivo, que comprende:
- administrar a un sujeto una composición de una cualquiera de las afirmaciones precedentes, tratando o previniendo, de este modo, el desequilibrio de la microbiota en el sujeto.
- 15 La composición se puede administrar por vía enteral.
- La composición se puede administrar por vía oral o por vía rectal.
- La composición se puede administrar como un comprimido, cápsula o líquido.
- 20 La composición se puede administrar como un gel o un sobre.
- La cápsula puede ser una cápsula de gelatina.
- 25 La composición se puede administrar a una dosificación de 2000 a 4000 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.
- De forma alternativa, la dosificación puede ser de 250 a 2500 mg de polvo por día, o un equivalente líquido del mismo.
- 30 La composición se puede coadministrar con otra ayuda digestiva.
- La composición se puede coadministrar con una o más composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas.
- La composición se puede coadministrar con fibra y/o una enzima digestiva.
- 35 La composición se puede complementar con polifenoles.
- Se divulga un procedimiento de mantenimiento o incremento de las bacterias beneficiosas en el tubo digestivo, que comprende:
- 40 administrar a un sujeto una composición de una cualquiera de las afirmaciones precedentes, manteniendo o incrementando, de este modo, las bacterias beneficiosas en el tubo digestivo en el sujeto.
- La composición se puede administrar por vía enteral.
- 45 La composición se puede administrar por vía oral o por vía rectal.
- La composición se puede administrar como un comprimido, cápsula o líquido.
- La composición se puede administrar como un gel o un sobre.
- 50 La cápsula puede ser una cápsula de gelatina.
- La composición se puede administrar a una dosificación de 2000 a 4000 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.
- 55 De forma alternativa, la dosificación puede ser de 250 a 2500 mg de polvo por día, o un equivalente líquido del mismo.
- La composición se puede coadministrar con otra ayuda digestiva.
- 60 La composición se puede coadministrar con una o más composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas.
- La composición se puede coadministrar con fibra y/o una enzima digestiva.
- La composición se puede complementar con polifenoles.
- 65 Las bacterias beneficiosas se pueden seleccionar del grupo de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas, Bifidobacterium*

spp., *Lactobacillus* spp., y del grupo de *Lachnospiraceae*.

Las bacterias beneficiosas se pueden seleccionar de: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium coccoides*, *Bacteriodes fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii* y *Ruminococcus flavefaciens*.

Se divulga un procedimiento de mantenimiento o incremento de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo, que comprende:

10 administrar a un sujeto una composición de una cualquiera de las afirmaciones precedentes, manteniendo o incrementando, de este modo, la *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo en el sujeto.

La composición se puede administrar por administración enteral, oral o rectal.

15 La composición se puede administrar como uno o más de un comprimido, cápsula, líquido, gel o sobre.

La cápsula puede ser una cápsula de gelatina.

20 La composición se puede administrar a una dosificación de 2000 a 4000 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.

La composición se puede administrar a una dosificación de 250 a 2500 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.

25 La composición se puede coadministrar con otra ayuda digestiva.

La composición se puede coadministrar con una o más composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas.

30 La composición se puede coadministrar con fibra y/o una enzima digestiva.

La composición se puede complementar con polifenoles.

El sujeto puede tener uno o más síntomas de inflamación.

35 El sujeto puede tener uno o más síntomas de: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer gastrointestinal, alergia, atopia o diabetes.

Se divulga un procedimiento de tratamiento o prevención del síndrome del intestino irritable o enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende:

40 administrar a un sujeto una composición de una cualquiera de los aspectos precedentes, tratando o previniendo, de este modo, el síndrome del intestino irritable o la enfermedad inflamatoria intestinal en el sujeto.

La composición se puede administrar por administración enteral, oral o rectal.

45 La composición se puede administrar como uno o más de un comprimido, cápsula, líquido, gel o sobre.

La cápsula puede ser una cápsula de gelatina.

50 La composición se puede administrar a una dosificación de 2000 a 4000 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.

La composición se puede administrar a una dosificación de 250 a 2500 mg de polvo por día, o un equivalente líquido de la misma.

55 La composición se puede coadministrar con otra ayuda digestiva.

La composición se puede coadministrar con una o más composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas.

60 La composición se puede coadministrar con fibra y/o una enzima digestiva.

La composición se puede complementar con polifenoles.

65 Se divulga el uso de la composición de una cualquiera de las afirmaciones precedentes para preparar un medicamento para:

- (i) tratar o prevenir el estreñimiento, o mantener o mejorar la regularidad intestinal, en un sujeto;
- (ii) tratar o prevenir un desequilibrio de la microbiota en un sujeto;
- (iii) mantener o incrementar las bacterias beneficiosas en el tubo digestivo de un sujeto;
- (iv) mantener o incrementando *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo de un sujeto; o
- (v) tratar o prevenir el síndrome del intestino irritable o la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto.

El breve resumen anterior describe ampliamente los rasgos característicos y ventajas técnicas de determinados modos de realización de la presente invención. Se describirán otras ventajas técnicas en la descripción detallada de la invención y ejemplos que siguen.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1: contenido de polifenoles del kiwi verde (Hayward) y amarillo (Gold3) en polvo antes y después de la digestión.

Figura 2: cambio del crecimiento de cepas bacterianas al exponer a agua y DMSO extractos de kiwi amarillo (Gold3) en polvo digerido.

Figura 3: efecto del kiwi amarillo (Gold3) en polvo en la producción de ácidos grasos de cadena corta *in vitro* usando un modelo de fermentación mixta.

Figura 4: esquema de tratamientos de ensayo, periodos de reposo y puntos de muestreo.

Figura 5A: mejora del índice de salud digestiva en participantes funcionalmente estreñidos después del tratamiento con GOLD (Gold3).

Figura 5B: diferencia neta en abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* en participantes funcionalmente estreñidos después del tratamiento con GOLD (Gold3)

Figura 5C: datos de PCR cuantitativa (transformados LOG.) que muestran la diferencia neta de los niveles de *Faecalibacterium prausnitzii* en participantes funcionalmente estreñidos después del tratamiento con GOLD (Gold3).

Figura 6: datos de qPCR en LightCycler® 480 que presentan grupos bacterianos como el número de copias del gen ARNr 16S/gramo de muestra fecal promedio calculado (fila superior, datos transformados LOG., fila inferior, naturales) y el error estándar de la media (EEM) como barras de error antes y después de cada periodo de tratamiento en el grupo sano.

Figura 7: datos de qPCR en LightCycler® 480 que presentan grupos bacterianos como el número de copias del gen ARNr 16S/gramo de muestra fecal promedio calculado (fila superior, datos transformados LOG., fila inferior, naturales) y el error estándar de la media (EEM) antes y después de cada periodo de tratamiento en el grupo funcionalmente estreñido.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

En cada caso, en las descripciones, modos de realización y ejemplos de la presente invención, los términos "que comprende", "que incluye", etc., se deben leer de forma expansiva, sin limitación. Por tanto, a menos que el contexto lo requiera claramente de otro modo, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprender", "que comprende" y similares se deben interpretar en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero sin limitarse a".

"Regularidad intestinal" significa tener deposiciones regulares, por ejemplo, diaria o semanalmente. Aunque la regularidad diferirá de persona a persona, el número esperado de deposiciones puede variar de al menos cuatro veces por semana a al menos una vez por día. Una "mejora" de la regularidad significa un incremento de al menos una deposición por semana.

El término "irregularidad intestinal" significa que la regularidad de las deposiciones se ha visto comprometida. Esto puede significar, por ejemplo, un periodo de tiempo incrementado entre deposiciones o una disminución del número esperado de deposiciones por día o por semana. Por ejemplo, una reducción de al menos una deposición por semana puede indicar una irregularidad intestinal.

Como se usa en el presente documento, "estreñimiento" significa tener uno o más síntomas de estar estreñido, por ejemplo, uno o más de: esfuerzo durante una deposición; heces duras o grumosas; sensación de obstrucción o bloqueo anorrectal; sensación de evacuación incompleta; maniobras manuales para facilitar la defecación; o tres o menos deposiciones en

una semana.

Una "ayuda digestiva" es una composición que ayuda a la digestión u otros aspectos del aparato digestivo, por ejemplo, fibra soluble e insoluble, enzimas digestivas, probióticos, prebióticos y simbióticos. Como ayudas digestivas se incluyen composiciones que comprenden uno o más de psyllium, metilcelulosa, glucomanano, magnesio, linaza, agropiro, jengibre, aloe (por ejemplo, zumo de aloe vera) y ruibarbo.

Una "enzima digestiva" es una enzima que ayuda con la función del aparato gastrointestinal. Se incluyen actinidina, amilasa, proteasa, lipasa, lactasa, maltasa, sacarasa y celulasa.

"Tubo digestivo" e "intestino" se refieren al aparato digestivo (es decir, aparato gastrointestinal) de un ser humano y otro animal. Esto incluye el esófago, el estómago, el intestino delgado, incluyendo el duodeno, el yeyuno y el íleon, el intestino grueso, incluyendo el ciego, el colon ascendente, transverso, descendente y sigmoide, y el recto. "Intestino" es un sinónimo del tracto intestinal.

Un "trastorno" del tubo digestivo incluye una enfermedad u otra afección que afecta al aparato digestivo (es decir, aparato gastrointestinal) que puede ser una afección aguda o crónica, tal como inflamación, estreñimiento, irregularidad intestinal, desequilibrio de la microbiota (por ejemplo, niveles reducidos de organismos beneficiosos, proporciones alteradas de organismos beneficiosos y/o niveles incrementados de organismos perjudiciales). Los trastornos particulares incluyen enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome del intestino irritable. En el presente documento se describen en detalle otros trastornos.

"Gold3" se refiere a una variedad particular de kiwi amarillo también conocida como 'Zesy002' y comercializada como kiwi ZESPRI® SUNGOLD. El 25 de junio de 2009 se realizó en Nueva Zelanda una solicitud de protección de variedades vegetales para Gold3 con el número de solicitud KIW042. El nombre botánico para el kiwi amarillo Gold3 es *Actinidia chinensis Planch.*

Un "derivado genético" de una variedad de kiwi amarillo (por ejemplo, la variedad Gold3) se refiere a la descendencia, portes u otros cultivares que se obtienen a partir de la planta progenitora del kiwi amarillo. Esto incluye la descendencia obtenida a partir de un cruce genético con el progenitor del kiwi amarillo, por ejemplo, prole F1 o prole F2. El término "derivado genético" se puede referir a la planta derivada, a la propia planta o a su fruto.

"Inflamación" se refiere a una afección caracterizada por uno o más de: vasodilatación, calor, enrojecimiento, dolor, hinchazón, edema, lesiones, fisuras, ulceraciones, extravasación leucocitaria y pérdida de función. Se incluyen tanto formas agudas como crónicas de inflamación, estas últimas incluyen trastornos inflamatorios, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias. Se incluye, en particular, enfermedad inflamatoria intestinal. Otros trastornos inflamatorios se describen en otras partes en este documento.

Como se señala en el presente documento, los términos "lío-filización" y "secado por congelación" se usan de forma sinónima. Se entenderá que los términos "secado por congelación"/"lío-filización" no excluyen el uso de mayores temperaturas (es decir, mayores que las temperaturas de congelación). Por ejemplo, se pueden usar mayores temperaturas para extraer la humedad residual durante la fase de secado secundario para los procedimientos de lío-filización/secado por congelación.

"Microbiota" como se usa en el presente documento se refiere a las poblaciones de microorganismos que viven en los tubos digestivos de los seres humanos y otros animales. Los términos sinónimos son "microflora" y "microbioma".

Un "desequilibrio de la microbiota" (también llamado "disbiosis") es una afección con la que se reduce el número de organismos beneficiosos en el aparato digestivo, se alteran una o más proporciones de organismos beneficiosos y/o se incrementa el número de organismos perjudiciales en el aparato digestivo. Los organismos beneficiosos pueden incluir, por ejemplo, bacterias productoras de ácido láctico y bacterias productoras de butirato. Los organismos beneficiosos particulares incluyen, pero no se limitan a: cepas de *Bifidobacterium*, cepas de *Bacteroidaceae*, tales como *Bacteriodes fragilis*, y también bacterias fecales, tales como las bacterias beneficiosas de grupo filogenético de *Clostridium leptum*, incluyendo *Faecalibacterium prausnitzii*. También se incluyen *Clostridium coccoides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii* y *Ruminococcus flavefaciens*. También se incluyen organismos beneficiosos de los grupos de *Bacteroides-Prevotella*, *Porphyromonas*, *Lachnospiraceae* y *Lactobacilli*. Los organismos perjudiciales pueden incluir, como ejemplos no limitantes, cepas de *Staphylococcus* y *Salmonella*, así como los miembros de los grupos *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* y *Fusobacteriaceae*.

Un "prebiótico" es una composición que incrementa el número y/o la actividad de organismos beneficiosos en el aparato digestivo. Típicamente, un prebiótico comprende componentes fermentables y produce cambios positivos (por ejemplo, niveles, actividades o proporciones mejorados) en las poblaciones de bacterias beneficiosas en la microbiota gastrointestinal. Esto incluye, por ejemplo, bacterias productoras de ácido láctico y/o bacterias productoras de butirato. Los ejemplos específicos de organismos beneficiosos incluyen cepas de *Bifidobacterium* y cepas de *Faecalibacterium*, incluyendo *Faecalibacterium prausnitzii*, y también cepas de *Bacteroidaceae*, tales como *Bacteriodes fragilis*. También se



incluyen *Clostridium coccooides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii* y *Ruminococcus flavefaciens*. También se incluyen los grupos de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Lachnospiraceae* y *Lactobacilli*, así como otros organismos descritos en el presente documento.

Un "probiótico" es una composición que comprende uno o más organismos beneficiosos que colonizan el aparato digestivo, incluyendo el colon, por ejemplo, bacterias productoras de ácido láctico y/o bacterias productoras de butirato. Los organismos beneficiosos particulares incluyen cepas de *Bifidobacterium* y cepas de *Faecalibacterium*, incluyendo *Faecalibacterium prausnitzii*, y también cepas de *Bacteroidaceae*, tales como *Bacteriodes fragilis*, así como otros organismos descritos en el presente documento.

Un "simbiótico" es una composición que combina uno o más agentes prebióticos y uno o más organismos probióticos.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede ser un animal humano o no humano, en particular, un mamífero, incluyendo ganado, ovejas, cabras, cerdos, caballos y otros animales de granja, incluyendo, así mismo, perros, gatos y otros animales domésticos.

"Tratar" como se usa en el presente documento significa reducir, mejorar o resolver un trastorno, por ejemplo un trastorno gastrointestinal, tal como una enfermedad u otra afección del aparato gastrointestinal. Un tratamiento dará como resultado la reducción, mejora o eliminación de uno o más síntomas del trastorno.

"Prevenir" como se usa en el presente documento significa detener o retardar la aparición de un trastorno, por ejemplo, un trastorno gastrointestinal, tal como una enfermedad u otra afección del aparato gastrointestinal. Una medida preventiva dará como resultado la detención o retardo de uno o más síntomas del trastorno, o una reducción de los síntomas si estos surgen.

#### Kiwi amarillo y bioactividad asociada

Gold3 es una nueva variedad de kiwi amarillo desarrollada por Zespri®, que se ha descubierto que tiene tolerancia a *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* (Psa, una enfermedad bacteriana de la vid del kiwi) y está reemplazando a la variedad Hort16A como la nueva variedad amarilla comercial de elección en Nueva Zelanda. La variedad Gold3 de kiwi es similar en composición nutricional a su predecesora, teniendo menos contenido de actinidina y fibra alimenticia que el kiwi verde (tabla 1).

**Tabla 1: contenido nutricional del kiwi entero**

Propiedades nutricionales promedio de las muestras recogidas en 2009/10 <sup>1</sup>				
Componente	Unidades	Kiwi amarillo ( <i>Actinidia chinensis</i> )		Kiwi verde ( <i>Actinidia deliciosa</i> )
		Gold3	Hort16A	Hayward
Vitamina C	mg/100 g	133	92	89
Vitamina E	UI/100 g	1,4	2,1	1,4
Fibra alimenticia soluble	g/100 g	2,1	2,2	3,6
Fibra alimenticia insoluble	g/100 g	<1	1,1	2,1
Betacaroteno	mg/100 g	0,016	0,025	0,023
Alfacaroteno	mg/100 g	<0,005	<0,005	<0,005
Azúcares totales	g/100 g	12,7	12,4	9,5
Ácido fólico	mg/100 g	21,4	24,6	29,9
Oxalato	Rafidios/g	585	1267	965
Actinidina	UF/100 g	88	3,4	334
Nitrógeno	mg/100 g	164	148	135
Fósforo	mg/100 g	25,3	23,8	26,8
Potasio	mg/100 g	327,5	305	335
Calcio	mg/100 g	23	31,8	35,3
Magnesio	mg/100 g	12,7	15,4	15,3
Azufre	mg/100 g	15,2	15,3	14,8

Hierro	mg/100 g	0,265	0,267	0,323
Boro	mg/100 g	0,333	0,385	0,33
Cobre	mg/100 g	0,106	0,131	0,095
Manganeso	mg/100 g	0,055	0,087	0,139
Cinc	mg/100 g	0,073	0,106	0,104
Sodio	mg/100 g	< 1	1,78	1,61

<sup>1</sup>Guía informativa sobre nuevas variedades en 2010 de Zespri®.

- 5 Dado que las variedades de kiwi amarillo contienen menores niveles de fibra y actinidina, los componentes considerados principalmente responsables de los efectos de laxación del kiwi verde, se esperaría que un producto derivado del kiwi amarillo tuviera un menor efecto de laxación que uno derivado del kiwi Hayward verde.
- 10 Sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto que el polvo derivado del kiwi Gold3 (GOLD) mejoraba la laxación en el mismo grado que el polvo derivado del kiwi Hayward verde (ACTAZIN™) en individuos sanos (véanse los ejemplos 5 y 6, a continuación en el presente documento). Estos resultados sugieren que otros componentes bioactivos del kiwi presentes en el Gold3 en polvo pueden tener un mayor impacto en el efecto de laxación observado de lo que dicta la convención actual. Por lo tanto, las composiciones son útiles para mantener o mejorar la regularidad intestinal y/o tratar o prevenir el estreñimiento.
- 15 Aunque sin desear ceñirse a la teoría, se postula que los polifenoles pueden ser ingredientes activos clave en las variedades de kiwi amarillo, en particular, en la variedad Gold3 de kiwi. Se postula que la eficacia observada en cuanto a la laxación puede ser atribuible a la combinación de la fibra, enzimas, carbohidratos prebióticos y polifenoles en la fruta.
- 20 Los polifenoles son compuestos naturales en las plantas, caracterizados por la presencia de una o más unidades fenólicas. Se cree que al menos algunos de los beneficios para la salud de los polifenoles surgen al estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas y al convertir las bacterias los polifenoles en otros compuestos bioactivos que se absorben en la circulación sanguínea y ejercen efectos tanto en el intestino como en otras partes en el cuerpo (Seeram 2014; Cardona *et al.* 2013).
- 25 Se estima que de un 90 a un 95 % de la ingesta de polifenoles totales se acumula en el colon, donde los compuestos fenólicos se someten al metabolismo por los microbios intestinales para dar metabolitos de bajo peso molecular. Estos metabolitos son absorbibles y pueden ser atribuibles a los efectos para la salud observados de los polifenoles (Cardona *et al.* 2013).
- 30 En base a los resultados mostrados en el presente documento, los autores de la invención creen que los polifenoles de las variedades de kiwi amarillo, por ejemplo, Gold3 o sus derivados, pueden tener la capacidad de actuar como prebióticos. Los investigadores en el campo han descrito los prebióticos como "ingredientes fermentados selectivamente que dan como resultado cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora gastrointestinal, confiriendo, por tanto, (un) beneficio(s) a la salud del huésped" (Gibson *et al.* 2010).
- 35 De forma notable, el kiwi amarillo tiene mayores niveles de polifenoles que el kiwi verde (véase, por ejemplo, Drummond 2013; véase también la tabla 5 en el presente documento). Además, los estudios *in vitro* de los autores de la invención han demostrado que el kiwi amarillo Gold3 en polvo digerido (digestión en la porción alta del tubo gastrointestinal simulada) tiene un perfil de polifenoles alterado en comparación con antes de la digestión (véase el ejemplo 2); sin embargo, se retiene el contenido fenólico global. Aunque el kiwi verde en polvo también tiene un perfil de polifenoles alterado después de la digestión, el contenido global se reduce por la digestión (véase el ejemplo 2).
- 40 A partir de esto, los autores de la invención concluyen que los polifenoles presentes en el kiwi amarillo Gold3 en polvo sobreviven a la digestión en el estómago mejor que los del kiwi verde en polvo. Esto significa que los polifenoles del kiwi amarillo, tales como los de la variedad Gold3, están disponibles para la biotransformación en diferentes compuestos fenólicos.
- 45 Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que el kiwi amarillo Gold3 tiene un perfil único rico en ácido clorogénico, E-cafeoil-3-glucósido, florizina, procianidina B2 y quercetina. Se cree que estos compuestos fenólicos permanecen 'no digeridos' y, por lo tanto, transitan hacia el colon, donde se metabolizan por la microbiota intestinal en metabolitos (derivados fenólicos). A continuación, estos derivados se pueden absorber y continuar interactuando en otras vías metabólicas y promover beneficios para la salud, incluyendo una laxación facilitada.
- 50 Se sabe que la vía de los fenilpropanoides produce la mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en plantas. Los fenilpropanoides controlan los sistemas de reparación, crecimiento y defensa (sistema inmunitario) de las plantas y su interacción con los microbios beneficiosos y depredadores beneficiosos (sistemas tróficos). Por tanto, es factible que los compuestos fenólicos en la variedad Gold3 puedan ser responsables tanto de la resistencia a plagas de la planta como
- 55

de los beneficios digestivos del polvo derivado de Gold3, como se divulga en el presente documento.

Los autores de la invención también han descubierto que el kiwi amarillo Gold3 en polvo contiene componentes resistentes a la digestión, que son conocidos por tener propiedades prebióticas (véase el ejemplo 4). Estos componentes ayudan a modular la microbiota intestinal y a estimular la producción de metabolitos, tales como ácidos grasos de cadena corta (AGCC; véase el ejemplo 4), a los que se les atribuyen diversos beneficios para la salud.

Además, los autores de la invención han descubierto que el kiwi amarillo Gold3 en polvo influye en el patrón de crecimiento de la microflora intestinal, estimulando un incremento de las bacterias beneficiosas en relación con las bacterias dañinas (véase el ejemplo 3). De forma notable, los autores de la invención también han observado un incremento significativo de la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en muestras fecales de pacientes estreñidos tratados con kiwi amarillo Gold3 en polvo (ejemplos 7 y 8). Este incremento de bacterias beneficiosas, incluyendo *F. prausnitzii*, se ha confirmado por análisis con PCR cuantitativa (ejemplos 9 y 10).

Este es un hallazgo significativo, ya que las concentraciones empobrecidas de *F. prausnitzii* se asocian con trastornos gastrointestinales y, en particular, afecciones inflamatorias del tubo gastrointestinal. Cabe señalar que los niveles reducidos de *F. prausnitzii* se han asociado, específicamente, con el síndrome del intestino irritable (SII) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), así como con otras enfermedades. Véanse, por ejemplo, Sokol *et al.* 2008; Sartor 2011. Véase también más adelante.

Por lo tanto, es evidente que el kiwi amarillo Gold3 y sus derivados genéticos se pueden usar en composiciones para: tratar o prevenir el estreñimiento, mantener o mejorar la regularidad intestinal, tratar o prevenir el desequilibrio de la microbiota, mantener o incrementar las bacterias beneficiosas en el tubo digestivo, mantener o incrementar *F. prausnitzii* en el tubo digestivo y/o tratar o prevenir el síndrome del intestino irritable o enfermedad inflamatoria intestinal. Se describen en detalle en el presente documento otros usos para la composición.

#### Procedimientos de producción de composiciones de kiwi

La presente divulgación se refiere, en general, a una composición preparada a partir de kiwi amarillo. En un aspecto particular, la composición se prepara a partir de *Actinidia chinensis*. Preferentemente, se usa la variedad Gold3 (también conocida como G3) de kiwi amarillo. De forma alternativa, se pueden usar uno o más derivados genéticos de la variedad de kiwi amarillo. Por ejemplo, puede ser deseable usar la prole F1 o F2 de un cruce genético que incluya la planta progenitora de la variedad de kiwi amarillo. De forma alternativa, se puede usar cualquier porte u otro cultivar obtenido a partir del progenitor.

La composición se puede preparar en forma pulverulenta, por ejemplo, un polvo liofilizado, o en cualquier otra forma farmacéutica adecuada. Puede ser deseable formular el polvo en comprimidos (incluyendo comprimidos de disolución rápida) o cápsulas (incluyendo cápsulas de liberación prolongada). Los comprimidos pueden ser comprimidos ranurados, comprimidos masticables, comprimidos efervescentes, comprimidos de disgregación oral o comprimidos para formar una suspensión. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina, incluyendo cápsulas de gelatina fabricadas por encapsulación de gelatina de único fragmento y encapsulación de gelatina de dos fragmentos. También se incluyen cápsulas sin gelatina, así como comprimidos oblongos. El polvo se puede proporcionar en forma de flujo libre o como una torta sólida. La composición se puede proporcionar como un polvo para formar una suspensión, polvo para formar una solución, gránulos orales a granel o polvo oral a granel. De forma alternativa, la composición se puede formular como un tónico, elixir, jarabe antitusígeno, concentrado, jarabe, solución, suspensión, emulsión, poción, triturado, pasta o como gotas. De forma alternativa, la composición se puede formular como una gelatina o gel. La composición se puede proporcionar en forma de sobre, por ejemplo, un sobre con polvos, o un sobre con gelatina o gel. También se incluyen formulaciones que comprenden tiras finas o que comprenden sólidos en una cápsula para mezclarse con alimentos o bebida. También son posibles otras fórmulas, como se describe a continuación en el presente documento.

Las composiciones se pueden preparar a partir de un triturado de kiwi amarillo obtenido a partir de una o más fuentes comerciales. Preferentemente, al triturado de kiwi amarillo se le han extraído tanto las semillas como la piel. También es preferente que el triturado se haya preparado con un tamaño de tamiz de aproximadamente 1 mm o menos. Es preferente además que el triturado tenga una viscosidad (medida a 12,5° Brix, 20 °C) de aproximadamente 12,0; o puede variar de 10,0 a 14,0; o de 11,0 a 13,0; o de 11,75 a 12,25; o de 11,8 a 12,2; o de 11,9 a 12,1; o puede ser de aproximadamente 11,0, aproximadamente 11,25, aproximadamente 11,7, aproximadamente 11,8, aproximadamente 11,9, aproximadamente 12,1, aproximadamente 12,2, aproximadamente 12,3 o aproximadamente 12,5.

El pH del triturado puede variar de 3,2 a 3,8; o de 3,0 a 4,0; o de 3,1 a 3,9; o puede ser de aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0. En algunas circunstancias, puede ser deseable ajustar el pH del triturado o el de la composición final para aproximarse a los niveles fisiológicos. En particular, puede ser útil obtener un intervalo de pH de 6,0 a 8,0; o de 6,5 a 7,5; o de 6,8 a 7,2; o un pH de aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4 o aproximadamente 7,5.

Las composiciones se pueden preparar por la tecnología de "reducción a pulpa suave" a la que se hace referencia en la patente de Nueva Zelanda n.º 235972 (que se incorpora por la presente por referencia), que se puede adaptar para producir un zumo de kiwi amarillo pulposo.

5 En las fases preparatorias iniciales, el kiwi amarillo se puede someter a un procedimiento de tratamiento anterior que pueda incluir las etapas bien conocidas de maduración, inspección, categorización y/o clasificación del kiwi. Con respecto a la maduración, es preferente usar kiwi amarillo maduro o madurado al producir las composiciones; sin embargo, es preferente evitar el material podrido o en descomposición.

10 La madurez se puede evaluar usando procedimientos ampliamente conocidos y usados en la técnica. La madurez se puede medir antes de cosechar o procesar el kiwi amarillo. En particular, la madurez se puede medir usando el sistema de Brix. El kiwi amarillo con un nivel de azúcar que varíe de 16 a 21° Brix; o de 14° a 23° Brix; o de 15° a 22° Brix; o de aproximadamente 14°, aproximadamente 15°, aproximadamente 16°, aproximadamente 17°, aproximadamente 18°, aproximadamente 19°, aproximadamente 20°, aproximadamente 21°, aproximadamente 22° o aproximadamente 23° Brix, puede ser indicativo de madurez.

15 El kiwi amarillo que supere este nivel de Brix puede estar madurado en exceso o fermentando y puede que no produzca una composición ideal. El kiwi con un nivel de Brix por debajo del ideal se puede madurar artificialmente antes de su uso. El tiempo que se deja en almacenamiento puede ser suficiente para lograr la maduración. Por ejemplo, el kiwi amarillo cosechado a aproximadamente 5° Brix se puede elevar a por encima de 10° Brix en 4-6 semanas en almacenamiento en frío a 0 °C. Esta fruta madurará para alcanzar 12° Brix o mayor tras su extracción del almacenamiento en frío. Durante la maduración también se producen otros cambios en la química de modo que el kiwi esté dentro del intervalo ideal de maduración para proporcionar un producto optimizado.

20 Como parte del procesamiento, el kiwi amarillo se puede esterilizar. La fruta se puede hacer pasar a través de un conjunto que tenga uno o más rodillos cepilladores para extraer cualquier materia extraña adherida. A continuación, se pueden emplear técnicas de lavado convencionales. Por ejemplo, es posible usar una serie de boquillas de pulverización para lavar el kiwi. Se pueden emplear aditivos de lavado que ayuden a limpiar o reducir el recuento de bacterias en el kiwi, de acuerdo con las regulaciones y requisitos locales. Por ejemplo, la fruta se puede lavar por un lavado con cloro y/o un lavado con agua impregnada con ozono, seguido de un enjuague con agua potable.

25 A continuación, el kiwi amarillo esterilizado se puede transportar a una tolva. Esta puede estar ahusada para formar un embudo para dirigir los kiwis uno por uno a un conjunto de corte. El conjunto de corte puede incluir un dispositivo de corte, tal como un láser acuático o similar, que tiene la ventaja de prevenir los daños a la semilla, de modo que la semilla del fruto no contamine la pulpa. Otros dispositivos de corte adecuados incluyen cuchillas circulares rotatorias, cuchillas oscilantes, dispositivos de corte por chorro de líquido, cuchillas de balanceo, etc.

30 El dispositivo de corte puede cortar el kiwi amarillo sustancialmente por la mitad, por ejemplo, a lo largo de su longitud. De forma alternativa, el dispositivo de corte se puede reemplazar por un dispositivo de aplastamiento suave que pueda romper la piel del kiwi. Preferentemente esto se hace sin provocar daños celulares significativos al kiwi. Por ejemplo, el kiwi amarillo se puede dirigir entre rodillos para dar como resultado la rotura de la piel del kiwi. En particular, el kiwi se puede reventar al hacer pasar la fruta a través de rodillos espaciados orientados hacia sí. Este procedimiento se puede usar para exprimir la fruta de modo que se rasgue la piel. El kiwi reventado permanece sustancialmente intacto pero fácilmente separable en fragmentos grandes. Se pueden emplear otros procedimientos de reventamiento.

35 Después de cortarse, los trozos de kiwi amarillo se pueden hacer pasar a través de un conjunto de prensado diseñado para separar la piel de la pulpa. El conjunto de prensado se puede adaptar para realizar un procedimiento de reducción a pulpa o machacado. Este procedimiento puede ser relativamente leve y delicado ("reducción a pulpa suave") en comparación con las técnicas de reducción a pulpa de fruta convencionales. Con una reducción a pulpa suave, no se produce disgregación ni lisis significativa de las células o componentes de la fruta. Preferentemente, solo una escasa proporción (en general, menor de un 5-10 %) de las semillas se fragmenta por este procedimiento. De los procedimientos de reducción a pulpa suave se excluyen los procedimientos de lisis química y/o enzimática, las técnicas térmicas, las técnicas dirigidas a la descomposición de las células y las técnicas mecánicas que implican una pulverización excesiva del material de la fruta.

40 El conjunto de prensado puede realizar la reducción a pulpa suave del kiwi amarillo al prensar los trozos de kiwi entre una prensa de doble cinta convergente. Las cintas de prensa pueden tener múltiples bucles que rotan alrededor de una serie de poleas. La distancia que separa las cintas de prensa puede disminuir en la dirección de desplazamiento del kiwi. De esta manera, se puede ejercer una fuerza incrementada sobre el kiwi a medida que se desplaza a lo largo de la longitud del conjunto de prensado. Esto puede producir la reducción a pulpa del kiwi sin daños significativos a las semillas. Esto, a su vez, previene que las semillas contaminen la pulpa.

45 La pulpa generada a partir del conjunto de prensado se puede dirigir a un procedimiento de cribado, para separar las semillas de la pulpa. En particular, la pulpa se puede separar de la semilla usando una técnica de cribado mecánico suave. Por ejemplo, se puede usar un finalizador de pulpa. Esto incluye un impulsor flexible rotatorio que se hace rotar dentro de una pantalla en conformación de cono que tiene aberturas de un tamaño predeterminado. El tamaño de las aberturas se

puede seleccionar para permitir que la pulpa y el zumo del kiwi pasen a través de la criba mientras se retiene una porción sustancial, si no la totalidad, de las semillas dentro de la cavidad interior definida por la criba.

Puede ser preferente usar una pasta en lugar de un triturado de kiwi amarillo. Se puede preparar una pasta de kiwi como un concentrado. Por ejemplo, la fruta se puede calentar durante varias horas, colar y reducir a una forma espesa concentrada. La fruta se puede calentar después de extraer la piel o después del procedimiento de reducción a pulpa o trituración. La fruta se puede calentar gradualmente y, a continuación, mantener caliente a una temperatura moderada, con mezclado. Tras espesarse, la pasta se puede esparcir en una lámina plana o transferir a un envase, por ejemplo, una bolsa, tubo, tarro, botella u otro recipiente. La pasta se puede transferir de forma aséptica, de modo que sea adecuada para el consumo humano. La pasta de kiwi se produce preferentemente a partir de kiwi amarillo madurado. Preferentemente, la pasta se prepara a partir de fruta reducida a pulpa. La pasta puede ser una preparación suave y puede comprender un concentrado de aproximadamente 40° Brix; o de 30° a 50° Brix; o de 35° a 45° Brix; o aproximadamente 35°, aproximadamente 36°, aproximadamente 37°, aproximadamente 38°, aproximadamente 39°, aproximadamente 41°, aproximadamente 42°, aproximadamente 43°, aproximadamente 44° o aproximadamente 45° Brix.

A continuación, la pulpa (por ejemplo, en forma de pasta o triturado) se puede procesar por una etapa de congelación. Esto se puede seguir de o usar junto con una etapa de secado. De forma alternativa, la pulpa se seca y procesa en un polvo sin una etapa de congelación intermedia. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos que impliquen secado en tambor. En el procedimiento de secado en tambor, un triturado o pasta se puede secar a temperaturas relativamente bajas sobre tambores rotatorios de alta capacidad que produzcan láminas de producto secado en tambor. Se puede usar un aditivo para acelerar o de otro modo ayudar al procedimiento de secado. Por ejemplo, se pueden utilizar almidón de guisante u otras ayudas de secado. A continuación, el producto secado se puede moler hasta obtener una forma pulverulenta o en copos acabada. De forma ventajosa, se pueden usar técnicas de secado en tambor para producir una composición secada que retenga sus componentes clave, por ejemplo, compuestos fenólicos, y se pueda reconstituir fácilmente usando líquido. Por ejemplo, los productos secados en tambor se pueden preparar para que sean solubles en agua fría. Como otras alternativas, se pueden usar secado en cinta o secado por convección. Dichos procedimientos de secado son ampliamente conocidos y usados en el campo.

Si se usa congelación, es preferente congelar la pulpa lo antes posible después de que se produzca para mantener la frescura. Sin embargo, la congelación se puede llevar a cabo dentro de las 24 o 48 horas, según sea necesario. Las metodologías de congelación son bien conocidas y no se necesitan describir en detalle significativo en el presente documento. La congelación rápida es, en particular, preferente. La pulpa se puede congelar en balas de tamaño estándar, que se usan para recoger la pulpa fresca después del procesamiento. La pulpa se puede almacenar congelada (por ejemplo, a -18 °C) hasta que se requiera para fabricar la composición.

La pulpa congelada se puede secar por congelación, es decir, liofilizar. Las técnicas de secado por congelación son ampliamente conocidas y comúnmente usadas. El ciclo de secado por congelación puede ser de aproximadamente 48 horas; o varía de 40 a 56 horas; o de 12 a 36 horas; o de 36 a 60 horas; o de aproximadamente 40 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 50 horas, aproximadamente 52 horas o aproximadamente 54 horas. Se puede usar un ciclo de secado por congelación más largo, por ejemplo, de al menos 48 horas ("secado por congelación delicada"), para retener la máxima actividad. El procedimiento se puede llevar a cabo de modo que se evite la formación de agua y se minimice el contenido de humedad durante el procesamiento.

Puede ser deseable usar un procedimiento de liofilización particular para obtener el producto secado. Por ejemplo, se puede usar un programa de secado por liofilización como parte de un sistema de secado automatizado. El procedimiento de liofilización puede incluir múltiples etapas de secado, por ejemplo, con incrementos y reducciones progresivos de la temperatura. Preferentemente, se usa una configuración de secado primario para la sublimación, seguida de una o más configuraciones de secado secundario que se usan para extraer la humedad residual. En ejemplos particulares, la temperatura máxima del procedimiento de liofilización no supera los 70 °C. En otros ejemplos, la temperatura del procedimiento de liofilización varía entre -10 °C y 70 °C. En otro ejemplo, se utilizan hasta 48 horas de liofilización.

El producto secado resultante, a continuación, se puede moler en un polvo que, a continuación, se puede utilizar como sea apropiado. Los procedimientos de molienda son bien conocidos y ampliamente usados en la técnica. Se pueden usar tamaños de malla estándar para producir el polvo, por ejemplo, se pueden usar tamaños de malla US 20, US 23, US 30, US 35, US 40, US 45 o US 50. El tamaño de tamiz para el polvo puede variar de 1,0 a 0,3 mm; o de 0,84 a 0,4 mm; o de 0,71 a 0,5 mm; o puede ser de aproximadamente 1,0 mm, aproximadamente 0,84 mm, aproximadamente 0,71 mm, aproximadamente 0,59 mm, aproximadamente 0,5 mm, aproximadamente 0,47 mm, aproximadamente 0,465 mm, aproximadamente 0,437 mm, aproximadamente 0,4 mm, aproximadamente 0,355 mm o aproximadamente 0,3 mm.

Para garantizar una degradación mínima de los ingredientes del kiwi, el procedimiento de preparación se puede realizar a una temperatura menor de 40 °C. Por ejemplo, el procedimiento se puede realizar a una temperatura que varíe de -4 °C a 40 °C; o de -1 °C a 10 °C; o de 1 °C a 6 °C; o a aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C o 6 °C. Estas temperaturas se pueden mantener durante todo el procedimiento de preparación, incluyendo el almacenamiento de la fruta entera, antes de abrirse y durante el procedimiento de reducción a pulpa/trituración. Para obtener resultados óptimos, estas temperaturas se mantienen al menos desde el momento en que se abre la fruta. El uso de estas temperaturas evita

la oxidación de la fruta y el uso de agentes reductores. En determinadas circunstancias, puede ser posible obtener la certificación orgánica.

El procedimiento de procesamiento se realiza preferentemente de modo que se prevenga o al menos se minimice cualquier daño o efecto sobre el material activo del kiwi amarillo. Para garantizar unos procedimientos de producción óptimos, las composiciones resultantes se pueden supervisar en cuanto a su actividad, por ejemplo, en cuanto al contenido de polifenoles. Se puede esperar que la composición contenga al menos los siguientes compuestos polifenólicos: ácido clorogénico, E-cafeoil-3-glucósido, ácido neoclorogénico, florizina, procianidina B2 y quercetina-ramnósido. También pueden estar presentes: catequina, epicatequina, E-cafeoil-4-glucósido y quercetina-rutinósido. A continuación en el presente documento se señalan los niveles para estos polifenoles. Los ensayos para polifenoles son bien conocidos en la técnica y también se describen a continuación. En particular, es posible medir los equivalentes de ácido gálico (GAE) para determinar el contenido de polifenoles totales. Por ejemplo, el procedimiento de Folin-Ciocalteu (que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu, también llamado reactivo de fenol de Folin o reactivo de Folin-Denis) se puede usar para ensayos colorimétricos *in vitro* de compuestos fenólicos (Singleton *et al.* 1999).

De forma alternativa o adicionalmente, las composiciones se pueden someter a prueba para determinar la estimulación del crecimiento de organismos beneficiosos, por ejemplo, *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*, o para determinar los niveles incrementados de ácidos grasos de cadena corta, por ejemplo, acetato, butirato y/o propionato. Estos niveles de crecimiento y niveles de ácidos orgánicos se señalan a continuación en el presente documento. Los ensayos correspondientes son ampliamente conocidos y también se describen en detalle en el presente documento. Preferentemente, las actividades señaladas en la estimulación del crecimiento bacteriano y los niveles de ácidos orgánicos, y el contenido de polifenoles señalado todavía están presentes tras la digestión de la composición, por ejemplo, como se somete a ensayo por digestión *in vitro*. Los ensayos de digestión *in vitro* se pueden utilizar como se describe por los autores de la invención en el presente documento. Otros ensayos *in vitro* son conocidos y usados en la técnica (véase, por ejemplo, Kaur *et al.* 2010).

En algunas circunstancias, puede ser posible usar un derivado genético de la planta de kiwi amarillo (por ejemplo, la planta de Gold3) para obtener las composiciones. Se espera que una composición obtenida a partir de dicho derivado comparta una o más de las características de las composiciones obtenidas a partir de la planta de kiwi amarillo. Los rasgos característicos ejemplares incluyen: niveles de polifenoles y perfiles de polifenoles, niveles de actinidina, niveles de fibra, niveles de vitaminas, estimulación del crecimiento de organismos beneficiosos y potenciación de los niveles de ácidos orgánicos, como se señala anteriormente y se divulga en detalle en el presente documento.

Con respecto a la propia fruta, se espera que el kiwi obtenido a partir de un derivado genético comparta una composición similar a la del progenitor del kiwi amarillo. Por ejemplo, el contenido de vitamina C de la fruta puede ser de 100 a 150 mg; o de 90 a 200 mg; o de 80 a 220 mg; o de aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, o aproximadamente 180 mg, por 100 g de fruta. El contenido de actinidina de la fruta puede ser de 60 a 110 UF; o de 70 a 100 UF; o de 80 a 90 UF; o de aproximadamente 60 UF, aproximadamente 70 UF, aproximadamente 80 UF, aproximadamente 90 UF, aproximadamente 100 UF, aproximadamente 110 UF o aproximadamente 120 UF, por 100 g de fruta. El contenido de polifenoles totales de la fruta puede ser de 250 a 450 mg de GAE; o de 200 a 800 mg de GAE; o de 300 a 600 mg de GAE; o de 270 a 430 mg de GAE; o de 280 a 420 mg de GAE; o de 290 a 410 mg de GAE; o de 300 a 400 mg de GAE; o de 310 a 390 mg de GAE; o de 320 a 380 mg de GAE, por 100 g de fruta.

### Composiciones que comprenden kiwi amarillo

Los autores de la invención han descubierto que el kiwi amarillo Gold3 en polvo incluye ingredientes beneficiosos que son útiles para mantener la salud del aparato digestivo, así como para tratar y prevenir problemas digestivos y/o trastornos gastrointestinales. Se demostró por los autores de la invención que el kiwi amarillo Gold3 en polvo fue, en particular, eficaz para mejorar la regularidad intestinal. El Gold3 en polvo también fue eficaz para estimular el crecimiento de bacterias beneficiosas en relación con las bacterias dañinas y generar incrementos de *F. prausnitzii*, específicamente.

Como tales, las composiciones de kiwi amarillo se pueden usar para promover o mejorar la salud intestinal global y/o para tratar o prevenir diversas enfermedades u otras afecciones del tubo digestivo, incluyendo inflamación, estreñimiento, desequilibrio de la microbiota, síndrome del intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal. Además, las composiciones se pueden usar para mantener o mejorar la regularidad intestinal y mantener o incrementar las bacterias beneficiosas en el tubo digestivo, incluyendo *F. prausnitzii*.

El kiwi amarillo en polvo se puede encapsular, comprimir o añadir o incorporar en otros productos. Se engloban, en particular, fórmulas de liberación retardada, fórmulas de liberación prolongada, así como fórmulas de disgregación rápida. Se engloban específicamente las cápsulas de gelatina, así como los sobres y los comprimidos masticables. Adicionalmente se incluyen fórmulas de combinación, que incluyen el polvo mezclado con otros agentes beneficiosos, por ejemplo, uno o más probióticos, prebióticos, simbióticos u otras ayudas digestivas. De forma alternativa, el polvo se puede reconstituir como un líquido, por ejemplo, un concentrado, jarabe, suspensión o tónico para su administración oral, o como una composición de enema o clisma para su administración rectal. Los supositorios rectales también están englobados.

Preferentemente, el kiwi amarillo secado en polvo resultante se encapsula, y cada cápsula contiene aproximadamente 500 mg o aproximadamente 600 mg del polvo secado; o varía de 50 a 650 mg; de 150 a 850 mg; o de 200 a 800 mg; de 300 a 700 mg; o de 550 a 750 mg; o aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 575 mg, aproximadamente 590 mg, aproximadamente 610 mg, aproximadamente 625 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 675 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, o aproximadamente 850 mg, del polvo secado.

En determinadas circunstancias, puede ser deseable aislar o enriquecer los polifenoles del kiwi amarillo. En particular, puede ser ventajoso usar el kiwi amarillo para obtener composiciones enriquecidas en polifenoles, concentrados fenólicos o composiciones que comprendan compuestos fenólicos aislados. Por ejemplo, las composiciones se pueden enriquecer en polifenoles de modo que su concentración se incremente en relación con los demás componentes del kiwi amarillo, por ejemplo, fibra, azúcares y/o proteínas. Las composiciones pueden incluir polifenoles que se han aislado (por ejemplo, purificado) de los otros componentes del kiwi amarillo.

Los procedimientos de enriquecimiento y extracción de polifenoles son ampliamente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sun-Waterhouse *et al.* 2009; Eidenberger *et al.* 2014). Preferentemente, la composición resultante tiene al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces la cantidad de polifenoles en comparación con la composición preparada sin etapas de aislamiento o enriquecimiento en polifenoles. Las composiciones enriquecidas en polifenoles, los concentrados fenólicos y las composiciones que comprenden compuestos fenólicos aislados se pueden secar como un polvo y usar de acuerdo con la presente divulgación. Dicho polvo se puede encapsular, y cada cápsula puede contener aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, o aproximadamente 350 mg, o aproximadamente 400 mg, de polvo; o varía de 100 mg a 200 mg; o de 100 a 300 mg; o de 200 a 400 mg de polvo.

La forma farmacéutica puede contener excipientes, por ejemplo, uno o más antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, disgregantes, saborizantes, colorantes, edulcorantes, lubricantes, deslizantes, agentes de flujo, agentes antiaglomerantes, sorbentes o conservantes. Los excipientes útiles incluyen, pero no se limitan a: estearina, estearato de magnesio y ácido esteárico; sacáridos y sus derivados, por ejemplo, disacáridos: sacarosa, lactosa; polisacáridos y sus derivados, por ejemplo, almidones, celulosa o celulosa modificada, tal como celulosa microcristalina y éteres de celulosa, tales como hidroxipropilcelulosa; alditos, tales como isomalt, xilitol, sorbitol y maltitol; proteínas, tales como gelatina; polímeros sintéticos, tales como polivinilpirrolidona, polietilenglicol; ácidos grasos, ceras, goma laca, plásticos y fibras vegetales, por ejemplo, zeína, proteína del maíz; hidroxipropilmetilcelulosa; polímeros reticulados, por ejemplo, polivinilpirrolidona reticulada (crospovidona) y carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa de sodio); glicolato sódico de almidón; dióxido de silicio, sílice pirógena, talco y carbonato de magnesio.

Se espera que las composiciones de kiwi amarillo incluyan diversos componentes, por ejemplo, carbohidratos, fibra alimenticia, polifenoles y actinidina. Puede haber de 10 a 20 mg de carbohidratos; de 0,5 a 5,5 mg de fibra alimenticia; de 0,1 a 0,5 mg de polifenoles conforme a GAE; y de 100 a 500 UA de actinidina, por 25 mg de polvo. Por ejemplo, puede haber aproximadamente 18 mg de carbohidratos, aproximadamente 3,0 mg de fibra alimenticia, aproximadamente 0,28 mg de polifenoles conforme a GAE y aproximadamente 230 UA de actinidina, por 25 mg de polvo.

Las composiciones de kiwi amarillo pueden incluir polifenoles particulares como componentes activos. Los polifenoles de la composición todavía pueden estar presentes tras la digestión de la composición, por ejemplo, digestión *in vitro*, como se describe en detalle en el presente documento. Por ejemplo, tras la digestión, el contenido de ácido clorogénico de la composición puede ser de al menos 40 µg/g, al menos 45 µg/g, al menos 50 µg/g, o al menos 55 µg/g; o de 40 a 60 µg/g; o de 45 a 55 µg/g, en base al peso seco. El contenido de E-cafeoil-3-glucósido de la composición puede ser de al menos 45 µg/g, al menos 50 µg/g, al menos 55 µg/g, al menos 60 µg/g, al menos 65, al menos 70 µg/g, o al menos 75 µg/g; o de 40 a 80 µg/g; o de 50 a 70 µg/g, en base al peso seco. El contenido de epicatequina de la composición puede ser de al menos 6 µg/g, al menos 7 µg/g, al menos 8 µg/g, al menos 9 µg/g, al menos 10 µg/g, al menos 11 µg/g, al menos 12 µg/g, al menos 13 µg/g, o al menos 14 µg/g; o de 8 a 12 µg/g; o de 9 a 11 µg/g, en base al peso seco. El contenido de ácido neoclorogénico de la composición puede ser de al menos 15 µg/g, al menos 18 µg/g, al menos 20 µg/g, al menos 22 µg/g, al menos 25, al menos 30 µg/g, o al menos 35 µg/g; o de 10 a 30 µg/g; o de 15 a 25 µg/g, en base al peso seco.

Tras la digestión, el contenido de florizina de las composiciones de kiwi amarillo puede ser de al menos 45 µg/g, al menos 50 µg/g, al menos 55 µg/g, al menos 60 µg/g, al menos 65, al menos 70 µg/g, o al menos 75 µg/g; o de 40 a 80 µg/g; o de 50 a 70 µg/g, en base al peso seco. El contenido de procianidina B2 puede ser de al menos 15 µg/g, al menos 20 µg/g, al menos 25 µg/g, al menos 30, al menos 35 µg/g, al menos 40 µg/g, o al menos 45 µg/g; o de 20 a 40 µg/g; o de 25 a 35 µg/g, en base al peso seco. El contenido de quercetina-ramnósido de la composición puede ser de al menos 15 µg/g, al menos 18 µg/g, al menos 20 µg/g, al menos 22 µg/g, al menos 25, al menos 30 µg/g, o al menos 35 µg/g; o de 10 a 30 µg/g; o de 15 a 25 µg/g, en base al peso seco.

Tras la digestión, el contenido de catequina de las composiciones de kiwi amarillo puede ser de al menos 0,5 µg/g, al menos 1 µg/g, al menos 2 µg/g o al menos 3 µg/g; o de 1 a 4 µg/g; o de 2 a 3 µg/g, en base al peso seco. El contenido de

E-cafeoil-4-glucósido de la composición puede ser de al menos 3 µg/g, al menos 4 µg/g, al menos 5 µg/g, al menos 6 µg/g, al menos 7 µg/g, al menos 8 µg/g, o al menos 9 µg/g; o de 4 a 8 µg/g; o de 5 a 7 µg/g, en base al peso seco. El contenido de quercetina-rutinósido de la composición puede ser de al menos 1 µg/g, al menos 2 µg/g, al menos 3 µg/g, al menos 4 µg/g, o al menos 5 µg/g; o de 1 a 5 µg/g; o de 2 a 4 µg/g, en base al peso seco.

En ausencia de digestión, las composiciones de kiwi amarillo pueden incluir un contenido de polifenoles totales de desde 1000 a 1200 mg de GAE; o de 900 a 1300 mg de GAE; o de 800 a 1400 mg de GAE por 100 g. El contenido de E-cafeoil-3-glucósido puede ser de 60 a 120 µg/g; o de 80 a 100 µg/g; o de 90 a 110 µg/g; o de aproximadamente 80 µg/g, aproximadamente 90 µg/g, aproximadamente 100 µg/g, aproximadamente 110 µg/g, aproximadamente 115 µg/g o aproximadamente 120 µg/g, en base al peso seco. El contenido de epicatequina puede ser de 20 a 60 µg/g; o de 30 a 50 µg/g; o de aproximadamente 20 µg/g, aproximadamente 30 µg/g, aproximadamente 40 µg/g, aproximadamente 45 µg/g, aproximadamente 50 µg/g, o aproximadamente 60 µg/g, en base al peso seco. El contenido de ácido neoclorogénico puede ser de 20 a 60 µg/g; o de 30 a 50 µg/g; o de aproximadamente 20 µg/g, aproximadamente 30 µg/g, aproximadamente 39 µg/g, aproximadamente 40 µg/g, aproximadamente 41 µg/g, aproximadamente 50 µg/g, o aproximadamente 60 µg/g, en base al peso seco. El contenido de procianidina B2 puede ser de 40 a 120 µg/g; o de 50 a 100 µg/g; o de 65 a 90 µg/g; o de 60 a 80 µg/g; o de aproximadamente 40 µg/g, o aproximadamente 50 µg/g, o aproximadamente 60 µg/g, o aproximadamente 70 µg/g, o aproximadamente 75 µg/g, o aproximadamente 80 µg/g, o aproximadamente 90 µg/g, o aproximadamente 100 µg/g, en base al peso seco.

Las composiciones de kiwi amarillo también pueden incluir fibra como componente activo. El contenido total de fibra puede ser de un 12,4 a un 12,7 %, en base al peso seco; o de un 12,0 a un 13,0 %; o de un 10 a un 15 %; o de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 11 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 13 %, aproximadamente un 14 %, o aproximadamente un 15 %, en base al peso seco. El contenido de fibra soluble puede ser de un 3,4 a un 3,5 % en base al peso seco; o de un 3,0 a un 4,0 %; o de un 3,2 a un 3,8 %; o de aproximadamente un 3,0 %, aproximadamente un 3,1 %, aproximadamente un 3,2 %, aproximadamente un 3,3 %, aproximadamente un 3,4 %, aproximadamente un 3,5 %, aproximadamente un 3,6 %, aproximadamente un 3,7 %, aproximadamente un 3,8 %, aproximadamente un 3,9 %, o aproximadamente un 4,0 %, en base al peso seco. El contenido de fibra insoluble puede ser de un 8,9 a un 9,3 %, en base al peso seco; o de un 8,0 a un 10,0 %; o de un 8,5 a un 9,5 %; o de aproximadamente un 8,0 %, aproximadamente un 8,5 %, aproximadamente un 9,0 %, aproximadamente un 9,5 %, o aproximadamente un 10,0 %, en base al peso seco.

Las composiciones de kiwi amarillo también pueden incluir diversos azúcares, incluyendo azúcares neutros y ácidos urónicos. Los polisacáridos pécticos están específicamente incluidos en las composiciones divulgadas. Con respecto a los azúcares neutros, las composiciones pueden incluir una o más de: ramnosa, arabinosa, galactosa y glucosa.

Las composiciones de kiwi amarillo pueden incluir además la enzima actinidina. Los niveles de actinidina pueden ser de 8000 a 11.000 UA; o de 6000 a 16.000 UA; de 7000 a 11.000 UA; o de 8000 a 10.000 UA; o de aproximadamente 8000 UA, aproximadamente 9000 UA, aproximadamente 10.000 UA, aproximadamente 11.000 UA o aproximadamente 15.000 UA, por gramo. Los procedimientos para medir el nivel de actinidina son ampliamente conocidos y usados en la técnica. Véanse, por ejemplo, Drummond 2013 y Kaur *et al.* 2010. Por ejemplo, es posible medir la digestión en N-α-CBZ-lys-p-nitrofenol (Z-lys-pNp; Sigma Aldrich Pty Ltd), por ejemplo, a 25 °C (es decir, 77 °F), para determinar los niveles/actividad de actinidina (Boland y Hardman 1972). Las medidas se pueden expresar como UA/g o UA/mg para la composición. De forma alternativa, es posible medir los niveles de actinidina usando ensayos fluorescentes para evaluar la actividad de la cisteína proteasa (Nieuwenhuizen *et al.* 2012; Maddumage 2013). En particular, se pueden usar los sustratos fluorescentes Z-FRAMC(benciloxycarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina), H-D-Ala-Leu-Lys-AMC o Bz-Arg-AMC (Feinchemikalien AG). Estas medidas se pueden expresar como UF/g o UF/mg para la composición.

Se espera que las composiciones de kiwi amarillo sean activas para estimular el crecimiento de organismos entéricos beneficiosos (por ejemplo, bacterias beneficiosas), tales como los miembros de los grupos de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, así como determinados miembros del grupo de *Clostridiales*, incluyendo *Faecalibacterium prausnitzii*, como se demuestra en el presente documento. Otros organismos beneficiosos también pueden mostrar un crecimiento incrementado, por ejemplo, cepas de *Erysipelotrichales* y *Bacteroidales*. También se incluyen organismos beneficiosos que incluyen *Clostridium coccoides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii* y *Ruminococcus flavefaciens*. También se incluyen organismos beneficiosos dentro de los grupos de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* y *Lachnospiraceae*, así como otros organismos descritos en el presente documento.

La composición de kiwi amarillo (por ejemplo, 25 mg de polvo, que se puede diluir a de 0,3 a 0,5 mg/ml de polvo) puede incrementar el crecimiento de una o más cepas de *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium* (por ejemplo, comenzando con 1000 millones de ufc) en al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 % o al menos un 110 %. Por ejemplo, se pueden usar 25 mg de polvo añadidos a 1000 millones de ufc de (un) organismo(s) probiótico(s) para obtener una tasa de crecimiento mayor de un 50 %, en relación con el control, que se ha normalizado a un 0 %. Dichos incrementos todavía se pueden observar tras la digestión de la composición, por ejemplo, digestión *in vitro*, como se describe en detalle en el presente documento. Preferentemente, no hay incrementos concomitantes en los organismos entéricos perjudiciales (por ejemplo, bacterias dañinas), tales como las cepas de *Salmonella* y/o *Staphylococcus*. En algunos casos puede ser posible lograr disminuciones en uno o más organismos perjudiciales.



Las composiciones de kiwi amarillo también pueden ser activas para estimular el crecimiento de bacterias fecales, incluyendo bacterias *Clostridiales*, tales como las del grupo filogenético de *Clostridium leptum*, y, en particular, cepas de *Faecalibacterium*, incluyendo *Faecalibacterium prausnitzii*. Los incrementos de la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* pueden ser de al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, o al menos un 200 %; o de un 20 % a un 200 %; o de un 50 % a un 150 %; o de un 70 % a un 100 %, en sujetos, por ejemplo, sujetos estreñidos, tras el tratamiento con el kiwi amarillo en polvo.

Las composiciones de kiwi amarillo muestran actividad para incrementar los niveles de ácidos grasos de cadena corta. En particular, la composición (por ejemplo, 10 mg de polvo) puede incrementar los niveles de uno o más de acetato, butirato y propionato en al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 18 %, al menos un 20 %, al menos un 22 %, al menos un 25 %, al menos un 28 % o al menos un 30 %. Dichos incrementos todavía se pueden observar tras la digestión de la composición, por ejemplo, digestión *in vitro*, como se describe en detalle en el presente documento.

#### Procedimientos de uso de las composiciones de kiwi

Como se señala anteriormente, las composiciones de kiwi amarillo se pueden usar para promover o mejorar la salud intestinal global y/o para tratar o prevenir diversas afecciones del tubo digestivo, incluyendo inflamación, estreñimiento, desequilibrio de la microbiota, síndrome del intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal. Además, las composiciones se pueden usar para mantener o mejorar la regularidad intestinal y para mantener o incrementar las bacterias beneficiosas en el tubo digestivo, incluyendo *F. prausnitzii*.

El estreñimiento se puede provocar por un trastorno de la función intestinal o un problema estructural, y puede tener uno o más síntomas de: deposiciones reducidas, deposiciones incompletas y asistidas, esfuerzo, forma de heces duras o grumosas, hinchazón, flatulencia, dolor abdominal y dependencia de laxantes. Las causas comunes de estreñimiento incluyen: ingesta de agua inadecuada; fibra inadecuada en la dieta; una interrupción de la alimentación regular o rutina; actividad o ejercicio inadecuado; consumo de grandes cantidades de productos lácteos; estrés; evitación de las deposiciones (por ejemplo, debido al dolor); uso excesivo de laxantes o laxantes emolientes; hipotiroidismo; afecciones neurológicas, tales como enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple; medicamentos antiácidos que contienen calcio o aluminio; medicamentos (especialmente medicamentos para el dolor, tales como opiáceos, antidepresivos o complementos de hierro); depresión; trastornos de la conducta alimentaria; síndrome del intestino irritable; embarazo; cáncer de colon; y falta de función nerviosa y muscular en el intestino.

La etiología de los desequilibrios de la microbiota (por ejemplo, disminuciones de organismos beneficiosos, proporciones alteradas de organismos beneficiosos y/o incrementos de organismos perjudiciales) es compleja y aún se debe dilucidar completamente. Los desequilibrios se pueden provocar por determinados medicamentos, tales como antibióticos, trastornos del tubo digestivo o insuficiencias alimenticias. Un desequilibrio de la microbiota intestinal se puede manifestar como uno o más síntomas de: diarrea, en particular, diarrea asociada a antibióticos, heces líquidas, estreñimiento y/o hinchazón.

Los desequilibrios de la microbiota están correlacionados con diversos trastornos del aparato gastrointestinal, así como otros trastornos. En particular, un desequilibrio en la microbiota se puede asociar con enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, celiaquía, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enterocolitis necrotizante, inflamación intestinal, infecciones entéricas, carcinogénesis, incluyendo carcinomas gástricos, carcinomas colorrectales, colelitiasis, endotoxemia, enfermedad hepática, tal como cirrosis, y encefalopatía hepática.

Los desequilibrios microbianos en el tubo digestivo están asociados con una serie de diferentes enfermedades, incluyendo:

Trastorno	Observaciones	Aparato/órgano afectado	Referencias
Enfermedad de Crohn	Disminución de la diversidad - <i>F. prausnitzii</i> reducida	TGI	(Fujimoto <i>et al.</i> 2013; Willing <i>et al.</i> 2010)
Colitis ulcerosa	Disminución de la diversidad - <i>A. muciniphila</i> y <i>F. prausnitzii</i> reducidas	TGI	(Lepage <i>et al.</i> 2011; Sokol <i>et al.</i> 2009)
Síndrome del intestino irritable	<i>Clostridium</i> , grupo IX, incrementada, <i>Bacteroides</i> spp. disminuida	TGI	(Jeffery <i>et al.</i> 2012; Maccaferri <i>et al.</i> 2012)
Cáncer del TGI	Disminución de la diversidad, variación de <i>Bacteroides</i> spp., <i>Fusobacteria</i> spp. incrementadas, <i>F. prausnitzii</i> reducida	TGI	(Chen <i>et al.</i> 2012; Wang <i>et al.</i> 2012)
Alergia/atopia	Disminución de la diversidad, Enterobacteriaceae incrementada, <i>A. muciniphila</i> y <i>F. prausnitzii</i> reducidas	Sistémico	(Abrahamsson <i>et al.</i> 2012; Candela <i>et al.</i> 2012)
Celiaquía	Composición alterada, esp. en el intestino delgado. Menos <i>Lactobacilli</i> y <i>Bifidobacteria</i>	TGI	(de Sousa Moraes <i>et al.</i> 2014; Kalliomaki <i>et al.</i> 2012)

<b>Diabetes</b>	<i>Bifidobacterium</i> spp. y <i>F. prausnitzii</i> reducidas	Sistémico	(Furet <i>et al.</i> 2010; Wu <i>et al.</i> 2010)
<b>Obesidad</b>	Incremento de la proporción de <i>Firmicutes</i> con respecto <i>Bacteroidetes</i>	Sistémico	(Ley <i>et al.</i> 2006; Tumbaugh <i>et al.</i> 2008)
<b>Autismo</b>	<i>Sutterella</i> spp. incrementada, <i>A. muciniphila</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp. disminuidas	Cerebro	(Wang <i>et al.</i> 2011; Williams <i>et al.</i> 2012)
<b>Ateroesclerosis<sup>1</sup></b>	Participación de enterotipo de <i>Veillonella</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. y <i>Prevotella</i>	Arterias	(Koeth <i>et al.</i> 2013; Koren <i>et al.</i> 2011)
<b>Depresión y ansiedad<sup>1</sup></b>	Cambios de la microbiota intestinal en conjunto y <i>Bifidobacterium</i> spp. disminuida	Cerebro	(Desbonnet <i>et al.</i> 2008; Neufeld <i>et al.</i> 2011)
<b>Cólico del lactante</b>	<i>Proteobacteria</i> incrementadas y <i>bifidobacteria</i> y <i>lactobacilli</i> reducidas	TGI	(de Weerth <i>et al.</i> 2013; Savino <i>et al.</i> 2007)
<b>Esclerosis múltiple<sup>1</sup></b>	Cambios de la microbiota intestinal en conjunto y presencia de <i>Clostridium perfringens</i> , tipo B	Cerebro	(Lee <i>et al.</i> 2011; Rumah <i>et al.</i> 2013)
<b>Enfermedad de Parkinson<sup>1</sup></b>	<i>Prevotellaceae</i> disminuida y <i>Clostridium</i> spp. incrementada	Cerebro	(Murata <i>et al.</i> 2013; Scheperjans <i>et al.</i> 2014)
<b>Artritis reumatoide<sup>1</sup></b>	Cambios de la microbiota intestinal en conjunto y <i>Bacteroides</i> spp. disminuida	Sistémico	(Abdollahi-Roodsaz <i>et al.</i> 2008; Vaahtovuori <i>et al.</i> 2008)

<sup>1</sup>Evidencia preliminar del vínculo entre la microbiota colónica y estos trastornos. TGI, tubo gastrointestinal. Tabla modificada desde de Vos y de Vos 2012.

La inflamación del tubo digestivo se puede asociar con diversas afecciones, incluyendo glositis atrófica, queilitis angular, granulomatosis orofacial, esofagitis, gastritis, incluyendo gastritis atrófica, estenosis pilórica, colitis, ileitis, enfermedad de Crohn, celiaquía, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, lesiones, fisuras y diversas úlceras, incluyendo úlceras de la boca, esófago, estómago e intestinos, y específicamente incluyendo colitis ulcerosa. La inflamación también se puede asociar con organismos perjudiciales, tales como organismos bacterianos, protozoarios y/o víricos, incluyendo los grupos/organismos de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Proteobacteria*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium varium*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, rotavirus, norovirus, adenovirus, astrovirus y virus del sarampión. En determinadas circunstancias, la inflamación resultar de una lesión, medicación o cirugía.

Las composiciones de kiwi amarillo se usan para tratar o prevenir la inflamación gastrointestinal, estreñimiento, irregularidad intestinal, desequilibrio de la microbiota, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal u otras afecciones descritas en el presente documento. Como dosificaciones ejemplares, las composiciones se pueden administrar de 250 a 2500 mg; de 500 a 5000 mg; de 1000 a 4000 mg; o de 1500 a 4500 mg; o de 2000 a 3000 mg; o a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 2000 mg, aproximadamente 2200 mg, aproximadamente 2300 mg, aproximadamente 2400 mg, aproximadamente 2500 mg, aproximadamente 2600 mg, aproximadamente 2700 mg, aproximadamente 2800 mg, aproximadamente 2900 mg, aproximadamente 3000 mg, aproximadamente 3200 mg, aproximadamente 3500 mg, aproximadamente 3600 mg, aproximadamente 4000 mg, aproximadamente 4200 mg, aproximadamente 4800 mg, aproximadamente 5000 mg, aproximadamente 5400 mg, aproximadamente 6000 mg, o aproximadamente 6600 mg, de kiwi amarillo en polvo por día, o dosificación equivalente si se usa una forma líquida. La administración se puede llevar a cabo vez al día, dos veces al día o tres veces al día. La administración se puede realizar con alimentos o antes de una comida. La dosificación y forma farmacéutica apropiadas se determinarán fácilmente por un experto en la técnica.

Se pueden usar diversas vías de administración para las composiciones de kiwi amarillo, incluyendo administración enteral, administración oral y administración rectal. La administración oral puede ser por comprimido, cápsula, sobre, gotas, elixir, jarabe, antitusígeno, solución, emulsión, suspensión, poción, triturado, pasta, jarabe, gelatina, gel, tónico u otros medios conocidos. La administración enteral puede ser por sonda duodenal o sonda gástrica, incluyendo sonda nasogástrica. La administración rectal puede ser por enema, supositorio u otro medio adecuado. En la técnica son conocidos diferentes medios de administración que se pueden utilizar por un experto en la técnica. Las composiciones no están limitadas a una forma particular de administración.

Las composiciones se pueden coadministrar con uno o más organismos probióticos. Por ejemplo, la composición de kiwi amarillo se puede formular como una forma farmacéutica combinada con uno o más probióticos. De forma alternativa, la composición de kiwi amarillo se puede administrar como una forma farmacéutica separada junto con uno o más probióticos. Los organismos probióticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: *Bacillus coagulans*, por ejemplo, cepas GBI-30 y 6086; *Bifidobacterium longum*, por ejemplo, subesp. *infantis* 35624; *Lactobacillus acidophilus*, por ejemplo, cepas NCFM y CL1285; *Lactobacillus paracasei*, por ejemplo, cepas St11 y NCC2461; *Lactobacillus johnsonii*, por ejemplo, cepas La1 y NCC533; *Lactobacillus LC1*; *Lactobacillus plantarum*, por ejemplo, cepas 299v y HEAL 9; *Lactobacillus reuteri*, por

ejemplo, cepas ATCC 55730, SD2112, Protectis (DSM 17938, cepa hija de ATCC 55730), Prodentis (DSM 17938/ATCC 55730 y ATCC PTA 5289 en combinación) y RC-14®; *Saccharomyces boulardii*; *Lactobacillus rhamnosus*, por ejemplo, una cepa GR-1®; *Lactobacillus casei*, por ejemplo, una cepa LBC80R; *Lactobacillus bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*; y *Lactobacillus bifidus*. Otros organismos que pueden ser útiles como probióticos incluyen cepas de *Faecalibacterium*, incluyendo *Faecalibacterium prausnitzii*, y también cepas de *Bacteroidaceae*, tales como *Bacteriodesfragilis*.

Las composiciones de kiwi amarillo se pueden coadministrar con uno o más agentes prebióticos, por ejemplo, como una forma farmacéutica combinada o como formas farmacéuticas separadas. Como se ha identificado previamente, los agentes prebióticos están compuestos de fibra no digerible o compuestos fermentables que pasan a través de la porción alta del tubo digestivo y estimulan el crecimiento y/o actividad de los organismos benéficos que colonizan el intestino grueso actuando como sustrato para ellos.

Estos agentes pueden ser prebióticos de cadena corta, de cadena larga o de espectro completo. Los prebióticos de cadena corta incluyen de 2 a 8 enlaces por molécula de sacárido. Los prebióticos de cadena larga incluyen de 9 a más de 60 enlaces por molécula de sacárido. Los prebióticos de espectro completo incluyen una gama completa de longitudes de enlaces moleculares, de 2 a más de 60 enlaces por molécula de sacárido. Los agentes prebióticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: oligofructosa, inulina, inulina enriquecida en oligofructosa, fructooligosacáridos, xilooligosacáridos, polidextrosa, galactooligosacáridos, trans-galactooligosacáridos, mananoligosacáridos, lactulosa, tagatosa y almidón.

En base a los resultados mostrados en el presente documento, se cree que los polifenoles presentes en las composiciones divulgadas pueden actuar como agentes prebióticos. Por tanto, puede ser útil añadir uno o más compuestos fenólicos a las composiciones, para complementar la actividad prebiótica en las mismas. Los compuestos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: derivados fenólicos, tales como ácido fenólico y flavonoides, tales como ligninas, proantocianidinas, antocianinas, antocianidinas, isoflavonas, catequinas, taninos, quercetina, naringenina y hesperidina. Se incluyen, en particular, los compuestos fenólicos extraídos de uno o más de: té, cacao, vino, soja, feijoa, frutas cítricas, manzanas, uvas, bayas y kiwis, en particular, kiwis amarillos, incluyendo Hort16 y Gold3. Los compuestos fenólicos específicos del kiwi amarillo Gold3 incluyen, pero no se limitan a: catequina, ácido clorogénico, E-cafeoil-3-glucósido, E-cafeoil-4-glucósido, epicatequina, ácido neoclorogénico, florizina, procianidina B1 y B2, quercetina-ramnósido y quercetina-rutinósido.

Las composiciones se pueden coadministrar con uno o más agentes simbióticos (prebióticos y probióticos combinados). Por ejemplo, el kiwi amarillo en polvo se puede formular como una forma farmacéutica combinada con uno o más simbióticos. De forma alternativa, el kiwi amarillo se puede administrar como una forma farmacéutica separada junto con uno o más simbióticos. Como ejemplos, se pueden combinar *Bifidobacteria* o *Lactobacilli* con fructooligosacáridos o inulinas o galactooligosacáridos. Las combinaciones simbióticas particulares incluyen, pero no se limitan a: *Bifidobacteria* y fructooligosacáridos; *Lactobacillus rhamnosus*, por ejemplo, una cepa GG e inulinas.

Las composiciones se pueden coadministrar con fibra y/o enzimas digestivas. Por ejemplo, el kiwi amarillo en polvo se puede formular como una forma farmacéutica combinada con una o más composiciones que comprendan fibra y/o enzimas digestivas. De forma alternativa, el kiwi amarillo en polvo se puede formular y administrar como una forma farmacéutica separada con una o más composiciones que comprendan fibra y/o enzimas digestivas. Las composiciones de fibra ejemplares incluyen composiciones de fibra soluble y/o insoluble, por ejemplo, composiciones que incluyen uno o más de dextrina de trigo, polícarbófilo de calcio, psyllium, inulina, metilcelulosa, glucomanano, lino, linaza, agropiro, acacia senegal y ruibarbo. Las enzimas digestivas ejemplares incluyen, pero no se limitan a: actinidina, proteasa, lipasa, amilasa, celulosa, pancreatina, pepsina, bromelina, papaína, tripsina y quimotripsina. También se pueden usar combinaciones de enzimas digestivas, por ejemplo, combinaciones de proteasa, lipasa y amilasa, incluyendo aquellas con o sin actinidina añadida.

Las composiciones de kiwi amarillo se pueden coadministrar con uno o más agentes antiinflamatorios y/o agentes antimicrobianos. De particular interés es el uso de la composición como complemento prebiótico durante y/o tras el tratamiento con antibiótico. Por ejemplo, el kiwi amarillo en polvo se puede formular como una forma farmacéutica combinada con uno o más agentes antiinflamatorios/antimicrobianos. De forma alternativa, el kiwi amarillo se puede administrar como una forma farmacéutica separada junto con uno o más agentes antiinflamatorios/antimicrobianos. Los agentes antiinflamatorios/antimicrobianos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aminosalicilatos, por ejemplo, mesalazina (por ejemplo, Pentasa®) y sulfasalazina (por ejemplo, Salazopyrin®), corticoesteroides, por ejemplo, budesonida (por ejemplo, Entocort®) y acetato de hidrocortisona (por ejemplo, Colifoam®), y también incluyen azatioprina (por ejemplo, Azasan®), Imuran®, mercaptopurina (por ejemplo, Purinethol®, Purixan™), ciclosporina (por ejemplo, Gengraf®, Neoral®, Sandimmune®), infliximab (por ejemplo, Remicade®), adalimumab (por ejemplo, Humira®), golimumab (por ejemplo, Simponi®), metotrexato (por ejemplo, Rheumatrex™, Methoblastin™), natalizumab (por ejemplo, Tysabri™), vedolizumab (por ejemplo, Entyvio™), ustekinumab (por ejemplo, Stelara®) y antibióticos, incluyendo metronidazol (por ejemplo, Flagyl®) y ciprofloxacino (por ejemplo, Cipro®, Ciplox™).

## Ejemplos

Los ejemplos descritos en el presente documento se proporcionan con el propósito de ilustrar modos de realización

específicos de la invención y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera.

#### Ejemplo 1: preparación de kiwi en polvo

5 El triturado de kiwi amarillo congelado (Frozen Gold Kiwifruit Puree Single Strength (sin semillas)) se obtuvo a partir de Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, Nueva Zelanda. El triturado se preparó a partir de un 100 % de kiwi amarillo (*Actinidia chinensis* G3) de Nueva Zelanda cultivado con respecto a los estándares de exportación de Zespri® y clasificado a mano. El triturado se produjo por procedimientos de fabricación para extraer la piel y las semillas para dar un triturado suave y rico.

10 La especificación del producto del triturado de kiwi amarillo congelado es como sigue:

15 El color es kiwi amarillo, siendo normal alguna variación de color. El sabor es el típico del kiwi amarillo maduro. La textura es suave y sin semillas. El triturado no tiene ninguna cantidad de fruta podrida ni fermentada, ni cuerpos extraños, y no contiene ninguna *E. coli.* detectable. El valor Brix es de 16 a 21°. La viscosidad (a 12,5° Brix, 20 °C) es de aproximadamente 12,0, pero puede variar cuando la fruta se mantiene a lo largo de una temporada. El pH es de 3,2 a 3,8. El tamaño de tamiz es < 1 mm. El producto se conserva congelado a -18 °C hasta su uso.

20 Además, el triturado de kiwi verde congelado (Frozen Green Kiwifruit Puree Single Strength (sin semillas)) se obtuvo a partir de Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, Nueva Zelanda. El triturado se preparó a partir de un 100 % de kiwi verde (*Actinidia deliciosa*, variedad Hayward) de Nueva Zelanda cultivado con respecto a los estándares de exportación de Zespri® y clasificado a mano. El triturado se produjo por procedimientos de fabricación para extraer la piel y las semillas para dar un triturado suave y rico.

25 La especificación del producto del triturado de kiwi verde congelado es como sigue:

30 El color es kiwi verde, siendo normal alguna variación de color. El sabor es el típico del kiwi verde maduro. La textura es suave y sin semillas. El triturado no tiene ninguna cantidad de fruta podrida ni fermentada, ni cuerpos extraños, y no contiene ninguna *E. coli.* detectable. El valor Brix es de 13 a 18°. La viscosidad (a 12,5° Brix, 20 °C) es de aproximadamente 12,0, pero puede variar cuando la fruta se mantiene a lo largo de una temporada. El pH es de 3,2 a 3,8. El tamaño de tamiz es < 1 mm. El producto se conserva congelado a -18 °C hasta su uso.

El procedimiento para obtener el kiwi en polvo fue como sigue:

- 35 1) El triturado de Gold3 congelado se adquirió de Kiwifruit Processing Company Ltd, Tauranga, Nueva Zelanda.
- 2) El triturado congelado se liofilizó (se secó por congelación). El procedimiento de liofilización típicamente se realizaba durante hasta aproximadamente 48 horas, a temperaturas que no superaban los 70 °C. A continuación, el material secado resultante se molía a través de una malla US 20 para producir polvo que fluía libremente.
- 40 3) El mismo procedimiento se usó para obtener kiwi verde en polvo.

#### Ejemplo 2: medición de polifenoles para el kiwi en polvo

45 Se analizaron los perfiles de polifenoles de kiwi verde y amarillo en polvo. Se preparó kiwi verde (Hayward) y amarillo (Gold3) liofilizado (secado por congelación) en polvo de acuerdo con el ejemplo 1.

50 Los polvos se digirieron usando un modelo de porción alta del tubo gastrointestinal *in vitro* como se describe en Monro *et al.* 2010. En resumen, se añadieron 20 ml de agua y 5 ml de solución salina al 20 % a 5 g de muestras a pH 2,5 antes de agitarse en vórtex. A continuación, se añadió 1 ml de pepsina al 1 % en ácido clorhídrico 0,05 M, seguido de una incubación de 30 minutos a 37 °C con mezclado lento y constante (220 rpm). Las muestras se ajustaron a pH 6,5, seguido de la adición de 5 ml de extracto biliar al 2,5 % obtenido a partir de Sigma Aldrich® y 1 ml de pancreatina al 5 % en cloruro de sodio (NaCl) al 3 %.

55 A continuación, las muestras se agitaron en vórtex y se incubaron a 37 °C con mezclado lento y constante (220 rpm) durante 2 horas. A continuación, las muestras digeridas se transfirieron a bolsas de diálisis (MWCO de 500 Da, obtenidas a partir de Thermofisher Scientific) y se dializaron en NaCl 10 mM a 4 °C durante la noche, seguido de un cambio en el líquido de diálisis y otras 2 horas a 2 °C, lo que representaba la absorción en el intestino delgado. Las muestras se almacenaron a -80°C y, a continuación, se secaron por congelación.

60 Las muestras digeridas antes y después de los polvos verde y amarillo secados por congelación (100 mg) se extrajeron con 5 ml de etanol/agua/ácido fórmico (80:20:1). La mezcla de extracción se sometió a ultrasonidos durante 30 minutos y, a continuación, se almacenó durante la noche. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad para extraer partículas y se diluyeron 2 veces antes del análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). Los detalles se proporcionan en la tabla 2, a continuación.

65

**Tabla 2: análisis por CL-EM de polvos de kiwi digeridos antes y después**

CLEM	Dionex Ultimate® 3000 Rapid Separation LC con espectrómetro de masas micrOTOF QII
Columna	Zorbax™ SB-C18, 2,1 m × 100 mm, 1,8 µm
Flujo de fase móvil	350 µl/min
Disolventes	A = acetonitrilo al 100 % B = ácido fórmico al 0,2 %
Gradiente	Un 10 % de A, un 90 % de B, 0 - 0,5 min Lineal con respecto a un 50 % de A, un 50 % B, 0,5 -18 min Lineal con respecto a un 100 % de A, 18 - 30 min Mantenido a un 100 % de A durante 30 - 40 min Lineal con respecto a un 10 % de A, 90 % de B, 40 - 40,2 min
Volumen de inyección	2 µl
Parámetros de EM	Temperatura de N <sub>2</sub> de secado: 200 °C Flujo de N <sub>2</sub> de secado: 8 l/min N <sub>2</sub> en nebulizador: 1,5 bar Intervalo de masa: 100 - 1500 Da Tasa de adquisición: 2 barridos/s

Las concentraciones de compuestos se calcularon usando curvas de calibración a partir de patrones auténticos.

Como se muestra en la figura 1, el Gold3 en polvo digerido (digestión en la porción alta del tubo gastrointestinal simulada) tiene un perfil de polifenoles alterado en comparación con antes de la digestión (figura 1); sin embargo, se retiene el contenido fenólico global. En particular, se observó un contenido de polifenoles de 269 µg/g antes de la digestión frente a un contenido de fenoles de 264 µg/g después de la digestión para el Gold3 en polvo (figura 1; total combinado para compuestos fenólicos sometidos a prueba). El kiwi verde en polvo también muestra un perfil de polifenoles alterado después de la digestión, pero el contenido global se reduce por la digestión (figura 1). Para el kiwi verde en polvo, el contenido de polifenoles global fue de 258 µg/g antes de la digestión frente a 153 µg/g después de la digestión (figura 1; total combinado para compuestos fenólicos sometidos a prueba).

### Ejemplo 3: ensayos microbianos de alto rendimiento para kiwi en polvo

El kiwi amarillo Gold3 en polvo se obtuvo a partir de una fórmula en pasta (preparada por Cedenco Foods, Nueva Zelanda), que se secó en tambor con almidón de guisante (14,28:1 en peso húmedo). Se digirió *in vitro* una muestra (5 g) del polvo usando un modelo de porción alta del tubo gastrointestinal como se describe en el ejemplo 2.

A continuación, el material digerido se solubilizó en agua o bien dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración uniforme de 100 mg/ml. A continuación, las muestras se diluyeron 100 veces con agua desionizada estéril para reducir el DMSO a una concentración manejable para prevenir la lisis bacteriana. Los 'extractos' en agua y DMSO se añadieron a pocillos de ensayos microbianos de alto rendimiento hasta una concentración final de 1,0 mg/ml.

Los organismos usados en el estudio incluyeron los probióticos Nissle 1917 de *Escherichia coli*, HN001 de *Lactobacillus rhamnosus* (DR20), HN019 de *Bifidobacterium lactis* (DR10), y la patógena *Salmonella enterica*, serovariedad Typhimurium ATCC 1772, y ATCC 25932 de *Staphylococcus aureus*.

Se usó un bioensayo de crecimiento en microplacas de noventa y seis pocillos que medía la densidad óptica (DO) como se describe en Rosendale *et al.* 2008 para este trabajo. Se calculó el cambio del crecimiento ( $\Delta$ crecimiento) y se usó para representar la magnitud del efecto. Esto se calculó convirtiendo la OD a un porcentaje de la OD de control y, a continuación, restando 100, normalizando eficazmente el crecimiento del control a un valor de referencia de cero.

Se usó una cepa de bacteria por microplaca y cada extracto se analizó por cuadruplicado por microplaca en un intervalo de concentraciones (0, 0,0124, 0,037, 0,111, 0,333, 1 mg/ml). Las microplacas se inocularon con un volumen igual (50 µl) de inóculo bacteriano y la DO se midió de inmediato a una longitud de onda de 595 nm con un lector de placas (FLUOstar Optima®) para determinar el valor de crecimiento en blanco/cero. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, a continuación, se determinó la DO para medir el crecimiento de los cultivos.

Los resultados demostraron que el Gold3 amarillo en polvo promovió el crecimiento de cepas de *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*, aunque no efectuó un cambio significativo del número de bacterias patógenas frente al control (figura 2).

### Ejemplo 4: modelo de fermentación mixta para someter a prueba el kiwi en polvo

El kiwi amarillo Gold3 en polvo se obtuvo a partir de una fórmula en pasta (preparada por Cedenco Foods, Nueva Zelanda), que se secó en tambor con almidón de guisante (14,28:1 en peso húmedo). Se digirió una muestra (5 g) de polvo de

acuerdo con el ejemplo 2. La muestra digerida se solubilizó en agua hasta una concentración final de 10 mg/ml.

Se recogieron muestras fecales recién evacuadas de tres voluntarios humanos sanos. El polvo amarillo digerido se incubó en un tubo de ensayo inoculado con microbiota mixta de un único donante fecal, y se repitió para cada uno de los tres donantes. Los tubos de Hungate que contenían medio de fermentación reducido anteriormente (9 ml) bajo dióxido de carbono se complementaron con 1 ml de la muestra o control y se inocularon con 1 ml de una suspensión fecal al 10 % (p/v). Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación orbital delicada (150 rpm). Se extrajeron periódicamente submuestras (0, 5, 10, 24, 48 h) con una jeringa y una aguja de calibre 22 a través de la membrana de goma para prevenir la exposición de la muestra a la atmósfera.

Las muestras extraídas de los tubos de fermentación se recogieron en tubos Eppendorf® de 1,5 ml y se centrifugaron de inmediato a 13.000 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes libres de células y partículas se recogieron en tubos Eppendorf® nuevos y se congelaron a - 80 °C hasta que se requirieran.

El sobrenadante se descongeló y se diluyó 1:4 en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M con 2-etilbutirato (concentración final de 5 mM) como patrón interno. A continuación, la muestra se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante (0,25 ml) se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,125 ml), se añadió éter dietílico (0,5 ml), a continuación, se agitó en vórtex y se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos (4 °C). La fase de éter dietílico superior se recogió, se secó con sulfato de magnesio y se derivatizó con *N-terc*-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida con *terc*-butildimetilclorosilano al 1 % calentando a 80 °C durante 20 minutos.

Las concentraciones de los metabolitos de ácidos orgánicos microbianos en las muestras de fermentación se cuantificaron por cromatografía de gases (CG) según la tabla 3 a continuación.

**Tabla 3: análisis por CG de metabolitos de ácidos orgánicos**

CG	Shimadzu GC-17A con detector de ionización de llama (FID)
Columna	10 m × 0,53 mm de DI × 2,65 µm
Gas portador	Helio
Caudal	37 ml/min
Presión	7 kPa, en incremento hasta 15 kPa a 0,8 kPa/h Mantener durante 4 min
Programa de temperatura	70 °C en incremento hasta 80 °C a 10°C/min Incrementar a 255 °C a 20 °C/min Mantener durante 5 min
Temperatura del inyector y detector	260 °C
Volumen de inyección	1 µl, sin división

Se analizaron mezclas patrón de ácidos orgánicos de concentración conocida junto con las muestras y se usaron para crear curvas patrón con áreas de pico relativas estandarizadas a la respuesta de 2-etilbutirato. Los resultados se expresaron como µmol de ácido orgánico/ml de fermento.

Como se muestra en la figura 3, la presencia del kiwi amarillo Gold3 en polvo promovió un incremento de la producción de ácido orgánico, en particular, después de las primeras 12 horas de exposición. Dado el incremento observado, esto indica que los componentes fermentables no digeribles (carbohidratos y polifenoles) en el polvo amarillo se descompusieron y usaron como sustrato de crecimiento y generación de energía. Esto es consecuente con la acción como prebiótico.

#### **Ejemplo 5: ensayo clínico para someter a prueba el kiwi amarillo Gold3 en polvo para mejorar la regularidad**

##### **Visión general del protocolo clínico**

El estudio se diseñó como un ensayo con grupos cruzados, aleatorizado, con enmascaramiento doble y comparativo con placebo, en el que los participantes consumieron cuatro intervenciones diferentes durante 4 semanas cada una, con un periodo de reposo de 2 semanas entre cada intervención. En la figura 4 se muestra una vista esquemática del diseño del ensayo.

##### **Participantes en el ensayo clínico**

Se incluyeron dos grupos de participantes a través de anuncios en periódicos y en la radio, la comunidad, el consejo sanitario del distrito local, la Universidad de Canterbury (Christchurch, Nueva Zelanda), la Universidad de Lincoln (Lincoln, Nueva Zelanda), boletines, carteles en los centro de atención primaria y a través de la base de datos existente de participantes anteriores.

Se incluyeron veintinueve participantes totales de cincuenta y un voluntarios totales. Los participantes se dividieron en dos cohortes: cohorte 1 ("sanos"): aquellos participantes sin síntomas clínicos de estreñimiento; y cohorte 2 ("estreñidos funcionalmente"): aquellos participantes clasificados como que tienen estreñimiento funcional C3 en base a los criterios de Roma III.

Criterios de Roma III:

1) deben incluir dos o más de los siguientes: a) esfuerzo durante al menos un 25 % de las defecaciones; b) heces grumosas o duras en al menos un 25 % de las defecaciones; c) sensación de obstrucción o bloqueo anorrectal durante al menos un 25 % de las defecaciones; d) sensación de evacuación incompleta durante al menos un 25 % de las defecaciones; e) maniobras manuales para facilitar al menos un 25 % de las defecaciones; f) tres o menos defecaciones por semana;

2) las heces sueltas rara vez están presentes sin el uso de laxantes; y

3) criterios insuficientes para el síndrome del intestino irritable.

Los criterios de inclusión fueron: edad 18-60 años; límites de IMC entre 19 y 30 kg/m<sup>2</sup>; glucemia en ayunas por debajo de 5,6 mmol/l; se requería que los sujetos estuvieran dispuestos a mantener su ingesta de alimentos y bebidas habitual (excepto la sustitución de los alimentos del estudio con productos similares) y su patrón de actividad física a lo largo del periodo de estudio; se pidió a los sujetos que excluyeran los complementos con alto contenido en fibra, tales como Metamucil®, Benefibre® y Phloe™, así como abstenerse de comer kiwi fresco durante el periodo de estudio; se pidió a los participantes que evitaran los desplazamientos al extranjero durante el periodo del estudio debido al impacto que esto podría tener en la alimentación.

Los criterios de exclusión fueron: presencia de síntomas de alarma gastrointestinales (incluyendo sangre en heces, diarrea frecuente, dolor abdominal persistente); personas que hacen dieta o siguen una alimentación crudivegana, o muy rica en fibra; gastroparesia o intolerancia a la lactosa; cirugía para pérdida de peso (banda gástrica o derivación gástrica); mujeres embarazadas; trastornos renales, hepáticos, endocrinos, cardíacos, pulmonares, pancreáticos, neurológicos, hematológicos o biliares clínicamente significativos; y alergia o sensibilidad conocida al kiwi.

El grupo "sano" estaba compuesto de participantes que no tenían síntomas clínicos de estreñimiento. El grupo "funcionalmente estreñido" (FE) se seleccionó en base a los criterios de Roma III (Drossman 2006) como que tenía estreñimiento funcional C3. Se incluyeron veinte participantes (2 hombres y 18 mujeres) en el grupo sano. La edad promedio fue de 38 años (intervalo 23-56 años) y el índice de masa corporal promedio fue de 23 kg/m<sup>2</sup> (intervalo 19-29 kg/m<sup>2</sup>). Se incluyeron nueve participantes (1 hombre y 8 mujeres) en el grupo FE. La edad promedio fue de 44 años (intervalo 38-54 años) y el índice de masa corporal promedio fue de 25 kg/m<sup>2</sup> (intervalo 21-29 kg/m<sup>2</sup>). Véase también la tabla 6 a continuación.

Diecinueve de los veinte participantes del grupo sano completaron el estudio. Una participante mujer se retiró por motivos personales. Los nueve participantes del grupo FE completaron el estudio. El orden en el que los participantes se asignaron a su intervención fue aleatorio por un bioestadístico usando un diseño en cuadrados latinos de Williams y números aleatorios generados por ordenador. Tras la finalización de los análisis, se desenmascaró el estudio para revelar el orden de intervención. Se obtuvo la aprobación ética del Human Disability and Ethics Committee de Nueva Zelanda bajo revisión agilizada (número de solicitud 12/STH/72/AM01) y se registró en el Registro de Ensayos Clínicos de Australia y Nueva Zelanda. Número de registro ACTRN: 12612001270808.

#### Procedimientos de pruebas clínicas

Las intervenciones se administraron en cápsulas de 4 × 600 mg suministradas por Anagenix Limited (Wellington, Nueva Zelanda) preparadas para parecer idénticas para preservar el enmascaramiento de la intervención (tabla 4).

**Tabla 4: descripción de la composición de la intervención**

Intervención	Tratamiento	Dosis	Administración: cápsulas/día
ACTAZIN™ L	Kiwi verde en polvo	600 mg	1 × ACTAZIN™ + 3 × placebo
ACTAZIN™ H	Kiwi verde en polvo	2400 mg	4 × ACTAZIN™
GOLD	Kiwi amarillo en polvo (G3)	2400 mg	4 × GOLD
Placebo	Isomalt de color verde (E102, E142)	2400 mg	4 × placebo

**Tabla 5: información nutricional de las intervenciones usadas, ACTAZIN™ y GOLD**

Información nutricional (por 100 g)	GOLD	ACTAZIN™
Energía, kJ	1420	1435
Proteína, g	3,9	3,4
Grasa, total, g	1,8	3,0
- Saturada, g	0,34	0,75
- Insaturada, g	1,4	2,4
- Monoinsaturada, g	<0,10	0,53
- Poliinsaturada, g	1,4	1,8
Carbohidrato, g	71	67
- Azúcares, totales, g	58	46
- Sacarosa, g	<0,05	<0,05
- Glucosa, g	27	21
- Fructosa, g	31	25
- Lactosa, g	<0,05	<0,05
- Maltosa, g	<0,05	<0,05
Fibra alimenticia, g	12	16
Sodio, mg	18	13
Polifenoles totales, mg de GAE	1100	900
Actinidina, UA/g	9100	40700

Todos los participantes consumieron cuatro combinaciones de intervenciones diferentes: placebo (isomalt de color verde) (2400 mg/día), ACTAZIN™ L (600 mg/día), ACTAZIN™ H (2400 mg/día) y GOLD (2400 mg/día) durante 28 d cada intervención, con un periodo de reposo de 14 d entre cada fase de tratamiento.

5

Se formularon ACTAZIN™ L (dosis baja, kiwi verde) y ACTAZIN™ H (dosis alta, kiwi verde) a partir de kiwi verde *Actinidia deliciosa* 'Hayward' procesado en frío y se formuló GOLD a partir de kiwi de carne amarilla *Actinidia chinensis* 'Zesy002' Gold3 procesado en frío. Véase el ejemplo 1.

10

Al principio y al final de cada periodo de intervención de 4 semanas, se pidió a los participantes que proporcionaran una muestra fecal. Se eligió un periodo de reposo de 2 semanas para permitir suficiente tiempo para retornar los hábitos intestinales al punto de referencia para los parámetros medidos (ecología microbiana, metabolitos microbianos).

15

Al principio y al final de cada periodo de intervención, también se pidió a los participantes que proporcionaran una muestra fecal y que completaran el cuestionario de síntomas del síndrome del intestino irritable (SII) de Birmingham (Johnston *et al.* 2010), así como un cuestionario de calidad de vida específico para el SII (Patrick *et al.* 1998) relacionado con el bienestar.

20

Cada día, desde el punto de referencia hasta el final del estudio, los participantes registraron diversos parámetros en los diarios proporcionados. Estos parámetros incluían: 1) número de deposiciones; 2) deposiciones incompletas y asistidas; 3) esfuerzo; 4) forma de heces como se determina por la escala de heces de Bristol; 5) hinchazón; 6) flatulencia; 7) dolor abdominal; 8) uso de laxantes.

25

Los datos se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) en GenStat (v. 16, 2013, VSNi Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido). Los datos de las dos cohortes se analizaron por separado. Los resultados de cada periodo de observación se analizaron como un diseño de bloques completo, con el participante y el participante × fase como bloques, y la fase (1, 2, 3 o 4) e intervención (incluyendo el periodo de reposo) como factores. Los datos del periodo de reposo medios se usaron como referencia para los propósitos del análisis estadístico. Se inspeccionaron los residuos para garantizar que se cumplieran los supuestos del ANOVA; cuando fue necesario, los datos se transformaron log. para estabilizar la varianza.

30

Se realizó un análisis de subgrupos *a posteriori* en la cohorte sana usando la prueba Q de Cochran para comparar aquellos participantes que respondían a cada intervención (es decir, con una elevación de al menos una deposición por semana durante el periodo de reposo precedente). A continuación, los participantes se clasificaron como pacientes que respondían favorablemente (mostraron una respuesta a al menos una de las intervenciones sin placebo) o pacientes que no respondían favorablemente; los datos de los participantes del subgrupo de pacientes que respondían favorablemente (de 14 de 19 participantes (74 %)) se analizaron usando ANOVA.

35

El resultado del estudio principal fue un incremento significativo de la frecuencia de las heces.



**Ejemplo 6: resultados del tratamiento sobre la mejora de la regularidad**

Los datos demográficos de los participantes se muestran en la tabla 6. El cumplimiento dentro de las cohortes sanas y funcionalmente estreñidas fue de un 98 %  $\pm$  9 y de un 99 %  $\pm$  8, respectivamente.

**Tabla 6: datos demográficos de los participantes en el estudio**

Características de referencia	Sano	Funcionalmente estreñido
N	20	9
Hombres	2	1
Mujeres	18	8
Edad en años (media $\pm$ DE)	38 $\pm$ 11	44 $\pm$ 6
Edad (intervalo)	23 - 56	38 - 54
Peso en kg (media $\pm$ DE)	68 $\pm$ 13	67 $\pm$ 8
Peso (intervalo)	47 - 101	53 - 79
IMC en kg/m <sup>2</sup> (media $\pm$ DE)	23 $\pm$ 3	25 $\pm$ 2
IMC (intervalo)	19 - 29	21 - 29
Cumplimiento (%)	98 $\pm$ 9	99 $\pm$ 8
IMC: Índice de masa corporal; DE: desviación estándar		

Los resultados de este estudio se resumen en las tablas 7 y 8.

En la cohorte sana ( $n = 19$ ), se observaron diferencias significativas entre las intervenciones y el periodo de reposo para el número de deposiciones diarias ( $p = 0,002$ ), puntuación de heces de Bristol ( $p = 0,036$ ), esfuerzo ( $p = 0,044$ ) y flatulencia ( $p = 0,007$ ). El número de deposiciones diarias para las intervenciones con ACTAZIN-H y GOLD fue significativamente mayor ( $p = 0,014$  y  $p = 0,009$ , respectivamente) en comparación con el periodo de reposo, con un incremento aproximado de 0,8 deposiciones por semana con cada intervención. Tabla 7.

En el subgrupo de pacientes que respondían favorablemente ( $n = 14$ ), el consumo de ACTAZIN-L, ACTAZIN-H y GOLD dio como resultado un incremento significativo de las deposiciones diarias ( $p = 0,005$ ,  $p < 0,001$ , y  $p = 0,001$ , respectivamente) en comparación con el periodo de reposo. Tabla 7.

El consumo de las intervenciones durante 28 días, en general, se toleró bien y no se reportaron acontecimientos adversos graves ni efectos ( $p < 0,05$ ) en los parámetros de bienestar registrados en los cuestionarios diarios, excepto por la flatulencia autoinformada, que fue mayor en el grupo de cohorte sana con ACTAZIN-H ( $p = 0,007$ ). Tabla 7.

En los individuos con estreñimiento funcional ( $n = 9$ ), las intervenciones alimenticias no incrementaron significativamente la frecuencia de las deposiciones en comparación con el periodo de reposo. Tabla 8. Esto se atribuyó al pequeño tamaño de muestra del estudio, lo que tiene limitaciones en su capacidad estadística para detectar diferencias significativas en la frecuencia de las heces. Sin embargo, el grupo funcionalmente estreñido mostró una mejora global de los parámetros digestivos y una supresión de otros síntomas de estreñimiento.

En el grupo funcionalmente estreñido se observó una mejora integral del índice de salud digestiva. Figura 5A. Ocho de cada nueve participantes funcionalmente estreñidos mostraron una mejora de los parámetros de salud gastrointestinal, calculados a partir de la suma del cambio promedio desde el periodo de reposo para: esfuerzo, evacuación incompleta, maniobras manuales, hinchazón, gases, uso de laxantes y dolor. Figura 5A. La puntuación de cada parámetro se obtuvo a partir de los diarios de los participantes.

Un incremento de más de una deposición por semana en una población sintomática se considera una magnitud de efecto clínicamente significativa (Food and Drug Administration 2012), y potencialmente mejoraría los síntomas de quienes padecen estreñimiento leve u ocasional. ACTAZIN™ y GOLD, que se derivan del kiwi verde (Hayward) y amarillo (Gold3), han demostrado este grado de eficacia en una población sana. En particular, se observó un incremento de aproximadamente 1,5 deposiciones por semana cada una en el subgrupo de pacientes que respondían favorablemente de cohortes sanas en comparación con el periodo de reposo.

En resumen, este estudio demostró que ACTAZIN™ y GOLD mejoraban la regularidad y laxación sin afectar a la forma de las heces en la cohorte sana. Para el grupo funcionalmente estreñido, GOLD mejoró los parámetros digestivos globales y alivió los síntomas clave del estreñimiento, incluyendo esfuerzo, evacuación incompleta, maniobras manuales, hinchazón, gases, uso de laxantes y dolor.

**Tabla 7: resultados del análisis de varianza para los cuestionarios de diarios, de síntomas del SII de Birmingham y de calidad de vida para el SII en la cohorte sana**

Cohorte sana (n = 19)	Medias		Valor de P con análisis de varianza		Valores de P a posteriori, periodo de reposo frente a intervención					
	Placebo	ACTAZIN-L	ACTAZIN-H	GOLD	Periodo de reposo frente a promedio de tratamientos (1 dif.)	Diferencias de tratamiento (3 dif.)				
							Placebo	ACTAZIN-L	ACTAZIN-H	GOLD
Cuestionario de diarios										
Número de deposiciones diarias	1,12	1,16	1,19	1,20	1,08	0,002	0,918	0,377	0,060	0,009
Escala de heces de Bristol	3,61	3,52	3,61	3,62	3,42	0,036	0,806	0,134	0,421	0,113
Cepa	0,22	0,22	0,24	0,22	0,28	0,044	0,349	0,157	0,150	0,166
Evacuación incompleta	0,14	0,14	0,13	0,17	0,18	0,137	0,432	0,310	0,306	0,699
Hinchazón	0,17	0,15	0,13	0,16	0,14	0,497	0,490	0,223	0,757	0,503
Flatulencia	0,60	0,64	0,67	0,64	0,58	0,007	0,572	0,511	0,073	0,075
Maniobras manuales	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01	0,860	0,339	0,247	0,637	0,234
Laxantes	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,786	0,703	0,156	0,494	0,475
Dolor abdominal	0,12	0,11	0,05	0,08	0,08	0,339	0,375	0,021	0,083	0,980
Cuestionario de síntomas del SII de Birmingham										
Estreñimiento	1,73	1,94	1,45	2,06	2,23	0,093	0,243	0,218	0,471	0,672
Diarrea	1,22	1,32	1,43	2,06	1,11	0,222	0,881	0,691	0,428	0,514
Dolor	1,57	1,11	0,69	2,06	1,10	0,707	0,100	0,037	0,957	0,202
SII: cuestionario de calidad de vida										
Disforia	8,61	8,38	8,33	8,38	8,38	0,891	0,272	0,134	0,958	0,441
Interferencia con la actividad	7,39	7,68	7,93	8,38	7,65	0,743	0,604	0,186	0,858	0,235
Imagen corporal	4,41	4,67	4,45	8,38	4,69	0,114	0,592	0,202	0,915	0,121
Preocupación por la salud	3,61	3,46	3,60	8,38	3,67	0,067	0,907	0,646	0,138	0,030
Evitación de alimentos	3,87	4,25	4,42	8,38	4,22	0,855	0,063	0,128	0,889	0,896

(continuación)

SII: cuestionario de calidad de vida													
Reacción social	4,26	4,27	4,33	4,16	4,35	0,074	0,323	0,299	0,316	0,823	0,023		
Relaciones sexuales	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-		
Relaciones	3,09	3,27	3,43	3,05	3,24	0,676	0,058	0,149	0,788	0,064	0,068		
Pacientes que responden favorablemente (n = 14)													
Número de deposiciones diarias	1,27	1,35	1,39	1,38	1,18	<0,001	0,999	0,117	0,005	<0,001	0,001		

**Tabla 8: resultados del análisis de varianza para los cuestionarios de diarios, de síntomas del SII de Birmingham y de calidad de vida para el SII en la cohorte FE**

	Valores de <i>p</i> con ANOVA										DMS		Diferencia de los valores de <i>p</i> del periodo de reposo frente a las intervenciones							
	Periodo de reposo frente a promedio de intervenciones					Diferencia entre intervenciones					Periodo de reposo frente a intervención		Intervención frente a ACTAZIN- ACTAZIN-Placebo							
	ACTAZIN					GOLD					diarios	s		n		diarios	L		diarios	
	Placebo	ACTAZIN-L	-H	GOLD	reposito	reposito	reposito	reposito	reposito	reposito		reposito	reposito	reposito	reposito		reposito	reposito		reposito
<b>Cuestionario de diarios</b>																				
Número de deposiciones diarias	0,96	0,92	0,88	0,99	0,93	0,999	0,840	0,840	0,36	0,46	120 %	127 %	0,813	0,894	0,479	0,546				
Escala de heces de Bristol	3,00	2,93	2,82	2,92	2,78	0,210	0,215	0,215	0,36	0,46	0,223	0,396	0,799	0,437						
Cepa	0,55	0,43	0,38	0,41	0,49	0,321	0,527	0,527	0,15	0,20	0,433	0,462	0,147	0,305						
Evacuación incompleta	0,52	0,40	0,41	0,39	0,41	0,720	0,671	0,671	0,14	0,18	0,155	0,852	0,957	0,749						
Hinchazón	0,09	0,14	0,12	0,14	0,12	0,836	0,533	0,533	0,05	0,06	0,199	0,313	0,958	0,461						
Gases	0,46	0,32	0,49	0,23	0,43	0,254	0,228	0,228	0,16	0,20	0,667	0,158	0,474	0,015						
Maniobras manuales	0,93	0,94	0,81	0,84	0,87	0,609	0,115	0,115	0,08	0,10	0,132	0,072	0,140	0,535						
Laxantes	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,615	0,967	0,967	0,01	0,02	0,795	0,354	0,673	0,706						
Dolor abdominal	0,27	0,12	0,15	0,12	0,17	0,961	0,639	0,639	0,09	0,12	0,023	0,316	0,813	0,323						
<b>Cuestionario de síntomas del SII de Birmingham</b>																				
Estreñimiento	6,06	5,63	6,21	4,10	6,19	0,189	0,251	0,251	1,72	2,22	0,872	0,510	0,982	0,018						
Diarrea	1,58	1,95	2,20	2,10	2,01	0,873	0,761	0,761	1,15	1,48	0,441	0,908	0,738	0,872						
Dolor	3,08	1,97	2,17	1,42	2,86	<b>0,022</b>	0,571	0,571	0,96	1,24	0,642	0,070	0,156	<b>0,004</b>						
<b>SII: cuestionario de calidad de vida</b>																				
Disforia	12,30	11,94	11,12	11,39	11,98	0,363	0,705	0,705	1,05	1,36	0,533	0,931	0,106	0,262						
Interferencia con la actividad	11,53	11,29	10,68	10,51	11,03	0,924	0,981	0,981	0,96	1,24	0,296	0,582	0,459	0,276						
Imagen corporal	8,37	8,51	8,23	7,69	8,81	<b>0,012</b>	0,887	0,887	0,77	0,99	0,250	0,431	0,132	<b>0,005</b>						

(continuación)

SII: cuestionario de calidad de vida													
Preocupación por la salud	5,74	6,45	6,24	6,24	6,61	<b>0,039</b>	0,325	0,69	0,89	<b>0,014</b>	0,636	0,277	0,281
Evitación de alimentos	6,01	6,81	5,87	6,05	5,99	0,536	0,881	1,03	1,33	0,975	0,116	0,817	0,905
Reacción social	6,80	7,03	6,72	6,91	6,78	0,583	0,352	0,50	0,64	0,929	0,326	0,808	0,610
Relaciones sexuales	2,94	3,00	2,63	2,93	2,60	<b>0,015</b>	0,230	0,36	0,46	0,060	<b>0,028</b>	0,830	0,070
Relaciones	4,68	4,97	4,25	4,59	4,76	0,449	0,930	0,60	0,78	0,775	0,475	0,090	0,571
DMS: diferencia mínima significativa entre dos medias a nivel de un 5 %.													

## Ejemplo 7: ensayo clínico para evaluar los efectos del kiwi amarillo Gold3 en polvo en las poblaciones microbianas colónicas

### Visión general

El estudio de intervención en seres humanos descrito en el ejemplo 5 se usó para averiguar el efecto de los complementos derivados del kiwi sobre la composición y el metabolismo microbiano colónico. Como se describe, dos complementos derivados del kiwi, ACTAZIN™, de carne verde (*Actinidia deliciosa* 'Hayward'), y GOLD, de carne amarilla (*Actinidia chinensis* 'Zesy002' Gold3) (Anagenix Ltd, Wellington, Nueva Zelanda), se usaron como intervenciones alimenticias en el ensayo. Estas cápsulas eran complementos alimenticios procesados en frío formulados para mantener la integridad de los compuestos del kiwi innatos. La preparación se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 1 anterior.

Se evaluaron los resultados para los complementos de kiwi ACTAZIN™ (2400 mg y 600 mg) y GOLD (2400 mg). Los especialistas en ensayos clínicos se incluyeron en un grupo sano de 19 participantes y un grupo funcionalmente estreñido de 9 participantes, cada uno de ellos consumió todos los tratamientos y un placebo durante 4 semanas de una manera con grupos cruzados aleatorizada en intercalación con periodos de reposo de 2 semanas. La modificación de la composición de la microbiota colónica se determinó por secuenciación del gen ARNr 16S y los productos finales metabólicos se midieron usando cromatografía de gases.

En el grupo funcionalmente estreñido, se observó que la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* se incrementó significativamente ( $P = 0,024$ ) de un 3,4 % a un 7,0 % tras el aporte complementario de GOLD. Menores proporciones *F. prausnitzii* a menudo se asocian con trastornos gastrointestinales; especialmente aquellos con una patología inflamatoria. El descubrimiento de que el aporte complementario de GOLD incrementaba la abundancia de *F. prausnitzii* ofrece una estrategia para corregir la disbiosis de la microbiota colónica, ya que *F. prausnitzii* es un productor de butirato clave y también se ha demostrado que ejerce efectos antiinflamatorios.

### Extracción de ADN, PCR y secuenciación del gen ARNr 16S

Todas las muestras fecales se enviaron en hielo seco a Plant & Food Research, Palmerston North, donde se recibieron y almacenaron a -20 °C. Se pesaron doscientos cincuenta miligramos de cada muestra en un microtubo estéril y se extrajo el ADN de cada muestra usando el MO-BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EE. UU., n.º 12888).

Se efectuó una PCR para amplificar las regiones variables V3-V4 del gen ARNr 16S (posición 341-805 en el gen ARNr de *Escherichia coli*) usando el cebador directo Bakt\_341F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG (SEQ ID NO: 1) y el cebador inverso Bakt\_805R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA TCC (SEQ ID NO: 2) Herlemann *et al.* 2000; W=A/T, H=A/C/T, V=G/C/A, N=G/A/T/C). La secuencia de cebador mostrada en negrita se usó para unirse a la región del amplicón de interés y el resto del cebador se usó para unirse a los adaptadores de índice Illumina®.

Cada PCR se realizó en un volumen total de 50 µl que consistía en 25 µl de mezcla maestra HotStarTaq® (QIAGEN, Melbourne, Australia), 1 µl de ADN molde o control negativo (H<sub>2</sub>O estéril) y 12 µl de cada uno de los cebadores directo e inverso a una concentración final de 0,1 µM. Las condiciones de PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 95 °C durante 15 min, seguida de treinta ciclos de desnaturalización de 30 s a 95 °C, hibridación de 30 s a 55 °C, extensión de 30 s a 72 °C y finalización con una etapa de extensión de 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR se purificaron en columna usando el kit de purificación PCR QIAquick (QIAGEN, Melbourne, Australia), se cuantificaron usando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technologies™) y se enviaron a New Zealand Genomics Ltd (NZGL), Massey Genome Service (MGS), Nueva Zelanda (NZ). En NZGL, se realizó la segunda etapa de PCR, se comprobaron por CC de colección los amplicones, se diluyó y se agrupó. A continuación, las colecciones se cargaron en el instrumento Illumina® MiSeq en tres tandas de extremos emparejados (EE) de 2 × 250 pb.

### Bioinformática

Los datos de secuenciación de Illumina® MiSeq se analizaron por el programa informático Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME), versión 1.8.0; (Caporaso *et al.* 2010). Para ensamblar las lecturas de extremos emparejados en una única secuencia continua, se usó PANDASeq con parámetros de al menos 40 pb de superposición, un mínimo de longitud de 350 pb y un máximo de longitud de 500 pb (Masella *et al.* 2012). Las supuestas quimeras se filtraron de las secuencias y las lecturas se agruparon en unidades taxonómicas operativas (UTO) en base a un valor umbral de identidad de un 97 % usando USEARCH y UCLUST (Edgar 2010). Se tomó una submuestra del total de lecturas para permitir un procesamiento más rápido de las muestras y normalizar a aproximadamente 15 000 lecturas por muestra, lo que es suficiente para la asignación filogenética y taxonómica (Caporaso *et al.* 2011; Schloss *et al.* 2012).

La alineación de las secuencias se llevó a cabo usando PyNAST (Caporaso *et al.* 2010) con referencia a la base de datos de referencia principal de Greengenes (versión 13\_8) (DeSantis *et al.* 2006). La asignación taxonómica se realizó usando

el clasificador bayesiano ingenuo RDP (Wang *et al.* 2007). Los grupos sanos y FE se analizaron por separado y se determinó el efecto de cada uno de los cuatro tratamientos sobre la composición de la comunidad microbiana comparando la abundancia promedio de cada género bacteriano después de cada tratamiento (más de un 1 % de abundancia en al menos una de las ocho muestras) con el valor promedio antes del tratamiento.

## Cuantificación de ácidos orgánicos por CG

Se pesó una porción de 500-1000 mg de cada muestra fecal en un tubo limpio y se diluyó 1:10 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se incluyó el patrón interno (butirato de etilo) para dar una concentración final de 5 mM. Los ácidos orgánicos se cuantificaron por CG usando un procedimiento modificado como se describe previamente (Richardson *et al.* 1989).

El análisis se realizó en un sistema de cromatógrafo de gases Shimadzu (GC-17A, Kioto, Japón) equipado con un detector de ionización de llama y dotado de una columna HP-1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El instrumento se controló y los cromatogramas se adquirieron usando el programa informático de GC Solution Chromatography Data System (Shimadzu, versión 2.3). Las curvas patrón se prepararon siguiendo el análisis de soluciones patrón de los ácidos fórmico, acético, propiónico, isobutírico, butírico, láctico, succínico, isovalérico, valérico, heptanoico y hexanoico. Las concentraciones de ácidos orgánicos se expresaron como  $\mu\text{mol/g}$  de heces.

## Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo en R Studio usando el paquete stats (R Studio 2012). Se realizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas entre la taxonomía a nivel de género y diferencias significativas entre las concentraciones de ácidos orgánicos antes y después de cada tratamiento. Un valor de  $P$  menor de 0,05 se consideró significativo después de corregir las múltiples comparaciones usando el procedimiento de tasa de descubrimiento falso (TDF) en la función `p.adjust` en R Studio (Benjamini y Hochberg 1995).

## Ejemplo 8: resultados del tratamiento sobre poblaciones colónicas microbianas

### Secuenciación del gen ARNr 16S

Se llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento para regiones variables del gen ARNr 16S, amplificado a partir de ADN bacteriano derivado de muestras fecales. Esto dio como resultado 26,3 millones de lecturas. Después del filtrado de calidad, la extracción de quimeras y el submuestreo, se obtuvieron un total de 3,72 millones de lecturas a un promedio de 14879 (14139 mínimo-14999 máximo) secuencias por muestra.

En todas las muestras, se observaron 218 filotipos a nivel de especie con un umbral de identidad de secuencia del 97 %. En el grupo sano, se incrementó significativamente Clostridiales después del aporte complementario de GOLD de un 5,0 % a un 7,6 % ( $P = 0,042$ ) (tabla 9). En el grupo FE, *Faecalibacterium prausnitzii* se incrementó significativamente después del tratamiento con GOLD de un 3,4 % a un 7,0 % ( $P = 0,024$ ), un incremento de dos veces, mientras que *Dorea* spp. se incrementó de un 0,9 % a un 1,4 % ( $P = 0,008$ ) después del tratamiento con ACTAZIN™ H (tabla 10). Para el grupo FE, *Ruminococcus* spp. disminuyó de un 9,9 % a un 5,6 % ( $P = 0,024$ ) después del periodo de tratamiento con placebo (tabla 10).

De los nueve participantes que consumieron GOLD en el grupo FE, ocho registraron un incremento de *F. prausnitzii* neto, observándose solo una reducción ligeramente escasa (figura 5B). Al comparar los grupos sano y FE, muchos de los géneros observados fueron significativamente diferentes entre los grupos, siendo el más notable *Bacteroides* spp. y *Ruminococcaceae*, que fueron significativamente mayores en el grupo sano, y *Akkermansia* spp., que estaba significativamente elevado en el grupo FE.

### Producción de ácidos orgánicos

En este estudio no se detectaron lactato, formiato ni isovalerato en muestras fecales. El hexanoato disminuyó significativamente de concentración de 0,6  $\mu\text{mol/g}$  a 0,2  $\mu\text{mol/g}$  ( $P = 0,030$ ) después del tratamiento con GOLD en el grupo sano (tabla 11). El succinato disminuyó significativamente de concentración de 2,3  $\mu\text{mol/g}$  a 1,7  $\mu\text{mol/g}$  ( $P = 0,040$ ) después del tratamiento con placebo en el grupo FE (tabla 12). No hubo ninguna otra alteración significativa con respecto a las concentraciones de ácidos orgánicos en ninguno de los tratamientos. Las diferencias cuantitativas entre antes y después de cada tratamiento fueron, en general, modestas, excepto por acetato, que se incrementó o disminuyó en hasta 13  $\mu\text{mol/g}$  después de algunos tratamientos.

**Tabla 9: abundancia relativa de grupos bacterianos prevalentes en respuesta a tratamientos en el grupo sano**

	Placebo		GOLD		ACTAZIN™ L		ACTAZIN™ H	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
<i>Bacteroides</i>	18,8 ± 4,0	18,0 ± 3,2	23,1 ± 4,6	22,0 ± 4,2	16,7 ± 3,1	18,4 ± 3,9	19,4 ± 3,2	18,1 ± 3,8

<i>Ruminococcaceae</i> <sup>1</sup>	16,3 ± 2,4	19,6 ± 3,0	17,4 ± 2,3	17,8 ± 2,5	19,9 ± 2,5	22,2 ± 3,8	18,4 ± 2,6	19,9 ± 3,3
<i>Lachnospiraceae</i> <sup>1</sup>	10,8 ± 1,3	11,0 ± 1,5	11,9 ± 1,9	9,5 ± 1,3	11,6 ± 1,6	9,3 ± 1,7	11,6 ± 1,6	11,0 ± 1,4
<i>Faecalibacterium</i>	7,0 ± 1,5	5,7 ± 1,0	7,2 ± 1,6	5,3 ± 0,9	6,3 ± 1,6	4,6 ± 0,8	6,7 ± 1,1	6,5 ± 1,6
<i>Clostridiales</i> <sup>1</sup>	5,9 ± 0,9	5,7 ± 1,0	5,0 ± 0,9	<b>7,6 ± 1,1*</b>	5,9 ± 0,7	5,0 ± 1,1	6,6 ± 1,2	5,6 ± 0,9
<i>Coprococcus</i>	6,6 ± 1,0	5,5 ± 0,8	5,9 ± 1,1	5,1 ± 0,7	5,4 ± 0,8	5,2 ± 0,8	5,1 ± 0,8	4,9 ± 0,8
<i>Blautia</i>	5,8 ± 0,9	4,7 ± 1,0	4,3 ± 0,6	4,8 ± 1,0	4,7 ± 0,7	6,3 ± 1,7	4,8 ± 1,1	6,1 ± 1,8
<i>Ruminococcus</i>	4,9 ± 1,0	6,6 ± 1,6	4,2 ± 0,6	4,4 ± 1,0	6,4 ± 1,0	7,2 ± 1,3	4,1 ± 0,8	5,6 ± 1,2
<i>Rikenellaceae</i> <sup>1</sup>	2,8 ± 0,9	2,7 ± 0,7	2,7 ± 0,7	2,9 ± 1,0	2,8 ± 1,0	2,5 ± 0,9	3,0 ± 0,6	3,5 ± 0,8
<i>Bifidobacterium</i>	3,0 ± 1,0	2,3 ± 0,6	2,5 ± 1,2	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,4	3,5 ± 1,1	2,7 ± 0,9	2,6 ± 0,8
<i>Bacteroidales</i> <sup>1</sup>	2,2 ± 1,0	2,2 ± 0,8	2,0 ± 0,9	1,9 ± 0,8	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3	2,6 ± 1,1	1,7 ± 0,6
<i>Lachnospira</i>	1,6 ± 0,5	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,8 ± 0,5	1,3 ± 0,4
<i>Parabacteroides</i>	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,8 ± 0,6	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,3
<i>Collinsella</i>	1,8 ± 0,7	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,3
<i>Akkermansia</i>	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,7	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,3
<i>Oscillospira</i>	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,5	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2
<i>Prevotella</i>	1,5 ± 0,7	2,6 ± 1,8	0,8 ± 0,4	2,1 ± 1,5	2,5 ± 1,33	0,7 ± 0,3	0,9 ± 0,5	1,6 ± 0,9
<i>Dorea</i>	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2
<i>Clostridiaceae</i> <sup>1</sup>	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3
Sin asignar	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Datos de secuenciación de Illumina® MiSeq que presentan géneros que están presentes en una abundancia mayor del uno por ciento en al menos una muestra. Los datos son los valores promedio calculados para todos los participantes ± error estándar de la media (EEM) antes y después de cada periodo de tratamiento. \*  $P \leq 0,05$ : significativamente diferente en comparación con el tratamiento anterior en base a la prueba de rangos con signo de Wilcoxon después de la corrección de la tasa de descubrimiento falso para múltiples comparaciones. <sup>1</sup> Algunas bacterias solo se pueden clasificar hasta el nivel de orden o familia.

**Tabla 10: abundancia relativa de grupos bacterianos prevalentes en respuesta a tratamientos en el grupo funcionalmente estreñido**

	Placebo		GOLD		ACTAZIN™ L		ACTAZIN™ H	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
<i>Ruminococcaceae</i> <sup>1</sup>	17,2 ± 2,3	19,9 ± 2,9	17,1 ± 3,8	16,3 ± 2,1	17,9 ± 2,6	15,0 ± 2,3	16,5 ± 3,1	18,8 ± 2,1
<i>Bacteroides</i>	12,6 ± 3,1	14,4 ± 2,2	14,2 ± 2,6	15,5 ± 2,6	13,9 ± 2,2	12,2 ± 2,5	14,0 ± 2,9	16,3 ± 3,1
<i>Lachnospiraceae</i> <sup>1</sup>	11,4 ± 1,6	8,0 ± 2,3	10,0 ± 2,5	13,9 ± 3,3	10,8 ± 3,1	11,0 ± 2,3	11,7 ± 2,5	8,7 ± 2,2
<i>Faecalibacterium</i>	7,9 ± 2,8	5,8 ± 2,1	3,4 ± 1,0	<b>7,0 ± 1,1*</b>	4,9 ± 1,7	5,0 ± 1,4	7,7 ± 2,1	3,1 ± 1,0
<i>Clostridiales</i> <sup>1</sup>	4,8 ± 0,6	6,8 ± 1,7	6,4 ± 1,3	5,5 ± 1,1	6,4 ± 1,2	6,7 ± 1,7	6,0 ± 1,4	7,5 ± 1,8
<i>Coprococcus</i>	6,5 ± 1,4	6,1 ± 1,1	6,7 ± 1,7	6,6 ± 1,4	6,9 ± 1,4	8,6 ± 1,2	6,0 ± 1,2	7,1 ± 1,9
<i>Blautia</i>	6,6 ± 1,8	3,5 ± 0,9	7,1 ± 2,0	6,0 ± 1,5	6,9 ± 1,5	7,5 ± 1,8	5,9 ± 2,1	5,4 ± 1,3
<i>Ruminococcus</i>	9,9 ± 2,6	5,6 ± 1,0*	6,4 ± 1,4	5,5 ± 0,7	6,2 ± 2,0	7,4 ± 1,5	5,5 ± 1,1	7,2 ± 1,3
<i>Bifidobacterium</i>	2,6 ± 1,3	2,6 ± 1,0	3,5 ± 1,5	2,6 ± 1,0	2,7 ± 1,5	2,7 ± 0,9	4,0 ± 1,6	1,8 ± 0,8
<i>Akkermansia</i>	2,7 ± 1,7	4,8 ± 2,0	5,0 ± 1,8	2,6 ± 1,0	3,3 ± 1,1	3,3 ± 1,5	3,6 ± 1,0	5,6 ± 2,3
<i>Rikenellaceae</i> <sup>1</sup>	2,3 ± 0,6	3,1 ± 0,6	3,9 ± 1,2	2,4 ± 0,5	4,0 ± 1,1	3,9 ± 1,3	2,6 ± 0,7	3,2 ± 0,9
<i>Christensenellaceae</i> <sup>1</sup>	1,0 ± 0,6	1,5 ± 0,6	2,2 ± 1,4	1,1 ± 0,6	1,8 ± 0,8	1,4 ± 0,6	2,3 ± 1,6	2,2 ± 1,3
<i>Prevotella</i>	1,8 ± 1,1	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,5	2,0 ± 1,1	0,2 ± 0,1
<i>Collinsella</i>	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,7	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,3
Sin asignar	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,1
<i>Parabacteroides</i>	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,3
<i>Oscillospira</i>	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3
<i>Lachnospira</i>	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,4	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,9	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,6	0,5 ± 0,1
<i>Dorea</i>	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,3*
<i>Coriobacteriaceae</i> <sup>1</sup>	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4
<i>Barnesiellaceae</i> <sup>1</sup>	0,9 ± 0,3	4,0 ± 2,4	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,5	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,3



<i>Clostridiaceae</i> <sup>1</sup>	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
------------------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Datos de secuenciación de Illumina MiSeq que presentan géneros que están presentes en una abundancia mayor del uno por ciento en al menos una muestra. Los datos son los valores promedio calculados para todos los participantes ± error estándar de la media (EEM) antes y después de cada periodo de tratamiento. \*  $P \leq 0,05$ : significativamente diferente en comparación con el tratamiento anterior en base a la prueba de rangos con signo de Wilcoxon después de la corrección de la tasa de descubrimiento falso para múltiples comparaciones. <sup>1</sup> Algunas bacterias solo se pueden clasificar hasta el nivel de orden o familia.

**Tabla 11: concentraciones de ácidos orgánicos en muestras fecales en respuesta a los cuatro tratamientos en el grupo sano**

	Media antes	EEM antes	Media después	EEM después	Valor de p	Diferencia
<b>Placebo</b>						
Acetato	36,7	5,8	43,2	5,2	1,00	6,5
Butirato	10,5	2,4	13,9	2,6	0,28	3,4
Heptanoato	0,0	0,0	0,0	0,0	0,84	0,0
Hexanoato	0,4	0,2	0,6	0,2	0,58	0,2
Isobutirato	0,6	0,2	0,8	0,2	0,82	0,2
Propionato	7,8	1,7	10,6	2,3	0,74	2,8
Succinato	1,6	0,6	1,0	0,1	0,48	-0,6
Valerato	1,5	0,2	2,0	0,3	0,34	0,5
<b>GOLD</b>						
Acetato	43,7	5,5	31,4	4,8	0,05	-12,3
Butirato	14,2	3,0	9,5	2,7	0,18	-4,7
Heptanoato	0,1	0,1	0,0	0,0	0,20	-0,1
Hexanoato	0,6	0,2	0,2	0,1	0,03*	-0,4
Isobutirato	0,6	0,2	0,4	0,1	0,92	-0,2
Propionato	7,0	1,4	6,0	1,4	0,96	-1,0
Succinato	1,5	0,6	0,9	0,1	1,00	-0,6
Valerato	1,6	0,2	1,3	0,1	0,30	-0,3
<b>ACTAZIN™ L</b>						
Acetato	42,8	5,9	44,0	6,1	1,00	1,2
Butirato	15,3	2,2	13,5	2,2	1,00	-1,8
Heptanoato	0,1	0,1	0,0	0,0	1,00	-0,1
Hexanoato	0,7	0,3	0,8	0,3	1,00	0,1
Isobutirato	0,8	0,3	0,7	0,2	1,00	-0,1
Propionato	8,9	1,3	9,9	1,5	1,00	1,0
Succinato	2,2	0,8	1,1	0,2	0,52	-1,1
Valerato	1,7	0,3	1,8	0,2	1,00	0,1
<b>ACTAZIN™ H</b>						
Acetato	45,2	6,7	32,8	5,0	0,32	-12,4
Butirato	11,9	2,5	10,0	2,4	0,70	-1,9
Heptanoato	0,0	0,0	0,0	0,0	1,00	0,0
Hexanoato	0,3	0,1	0,4	0,2	1,00	0,1
Isobutirato	0,7	0,2	0,5	0,1	0,76	-0,2
Propionato	8,5	1,1	7,7	1,7	1,00	-0,8
Succinato	2,7	1,6	1,1	0,2	1,00	-1,6
Valerato	1,5	0,2	1,5	0,2	1,00	0,0

Niveles medidos por cromatografía de gases (CG), expresados en  $\mu\text{mol/g}$  de heces. La diferencia indica si se observó un incremento neto (valores positivos) o una disminución neta (valores negativos) después de los tratamientos. \*  $P \leq 0,05$ : significativamente diferente en comparación con el tratamiento anterior en base a la prueba de rangos con signo de Wilcoxon después de la corrección de la tasa de descubrimiento falso para múltiples comparaciones.

**Tabla 12: concentraciones de ácidos orgánicos en muestras fecales en respuesta a los cuatro tratamientos en el grupo funcionalmente estreñido**

	Media antes	EEM antes	Media después	EEM después	Valor de <i>p</i>	Diferencia
<b>Placebo</b>						
Acetato	33,7	7,2	34,7	3,9	1,00	1,0
Butirato	7,0	2,5	5,9	2,1	1,00	-1,1
Heptanoato	0,0	0,0	0,2	0,2	1,00	0,2
Hexanoato	0,2	0,1	0,2	0,1	1,00	0,0
Isobutirato	1,2	0,3	1,5	0,3	1,00	0,3
Propionato	8,5	1,5	9,0	1,4	1,00	0,5
Succinato	2,3	0,3	1,7	0,2	0,04*	-0,6
Valerato	1,4	0,3	1,5	0,3	1,00	0,1
<b>GOLD</b>						
Acetato	40,5	8,7	39,1	7,4	1,00	-1,4
Butirato	8,3	3,8	8,5	2,3	1,00	0,2
Heptanoato	0,0	0,0	0,0	0,0	0,22	0,0
Hexanoato	0,1	0,1	0,4	0,2	0,56	0,3
Isobutirato	1,0	0,3	1,5	0,2	0,72	0,5
Propionato	9,2	2,1	10,4	2,2	1,00	1,2
Succinato	1,7	0,2	1,8	0,2	1,00	0,1
Valerato	1,4	0,3	1,8	0,3	1,00	0,4
<b>ACTAZIN™ L</b>						
Acetato	35,2	5,4	44,7	10,2	1,00	9,5
Butirato	9,4	2,4	10,3	3,1	1,00	0,9
Heptanoato	0,1	0,0	0,1	0,1	1,00	0,0
Hexanoato	0,3	0,2	0,7	0,5	1,00	0,4
Isobutirato	1,6	0,3	1,6	0,3	1,00	0,0
Propionato	9,2	1,7	10,5	2,1	1,00	1,3
Succinato	1,8	0,1	1,7	0,1	0,60	-0,1
Valerato	1,9	0,3	2,0	0,3	1,00	0,1
<b>ACTAZIN™ H</b>						
Acetato	46,0	10,0	32,3	4,2	0,72	-13,7
Butirato	9,5	3,7	4,0	1,2	1,00	-5,5
Heptanoato	0,2	0,2	0,0	0,0	0,28	-0,2
Hexanoato	0,3	0,2	0,1	0,0	0,40	-0,2
Isobutirato	1,2	0,4	1,4	0,3	0,72	0,2
Propionato	10,8	3,2	7,5	1,0	1,00	-3,3
Succinato	2,0	0,2	1,9	0,2	1,00	-0,1
Valerato	1,4	0,4	1,3	0,2	1,00	-0,1

Niveles medidos por cromatografía de gases (CG), expresados en  $\mu\text{mol/g}$  de heces. La diferencia indica si se observó un incremento neto (valores positivos) o una disminución neta (valores negativos) después de los tratamientos. \*  $P \leq 0,05$ : significativamente diferente en comparación con el tratamiento anterior en base a la prueba de rangos con signo de Wilcoxon después de la corrección de la tasa de descubrimiento falso para múltiples comparaciones.

## 5 Análisis

Se determinó que varios grupos bacterianos estaban significativamente alterados en abundancia después del consumo de complementos derivados del kiwi. Se incrementó *Clostridiales* en un 2,6 % después del aporte complementario de GOLD (Gold3) en el grupo sano, aunque las implicaciones de este incremento todavía están bajo investigación. La abundancia relativa de *F. prausnitzii* se elevó significativamente (3,6 %) en el grupo FE después de un periodo de 4 semanas de aporte complementario con GOLD basado en kiwi amarillo.

De forma notable, *F. prausnitzii* es un conocido productor de butirato. El butirato es la fuente de energía preferente para

las células epiteliales colónicas y desempeña un papel en el alivio de la inflamación, así como en la mitigación de la carcinogénesis, la colonización patógena y la agresión oxidativa (Hamer *et al.* 2008; Macfarlane y Macfarlane 2011). En un reciente estudio, se demostró que la administración de una bacteria productora de butirato, *Clostridium tyrobutyricum*, protegía a los ratones de la colitis inducida por dextrano-sulfato de sodio (Hudcovic *et al.* 2012). Por lo tanto, incrementar la cantidad de *F. prausnitzii* en el colon puede ayudar a mitigar los síntomas de los trastornos gastrointestinales, a través de la producción de butirato elevada.

Como el tubo gastrointestinal humano consiste en aproximadamente  $10^{14}$  células microbianas (Egert *et al.* 2006) y la abundancia de *F. prausnitzii* es de aproximadamente un 5 % (Miquel *et al.* 2013), esto equivale a una concentración de aproximadamente cinco billones de células de *F. prausnitzii*, que pueden ejercer un efecto apreciable sobre las actividades microbianas y el metabolismo. El presente estudio mostró una proporción total de un 5,6 % de abundancia de *F. prausnitzii* de todas las muestras en el grupo FE (el promedio tomado a través de todas las muestras en el grupo FE, incluyendo todos los tratamientos y periodos de reposo), mientras que se observó un 6,1 % en el grupo sano. Las muestras de los participantes en el grupo FE antes de la administración del aporte complementario de GOLD tenían una abundancia relativamente baja de *F. prausnitzii* de un 3,4 %, que se incrementó dos veces hasta un 7,0 % después del tratamiento con GOLD. En el grupo sano se observó una disminución de un 7,2 % a un 5,3 %, lo que podría deberse a los niveles ya altos en el punto de referencia. Esto se ha observado en otros estudios, donde la concentración de referencia de un grupo bacteriano tiene una carga sustancial sobre la magnitud del efecto observado en respuesta a una intervención alimenticia (Kolida *et al.* 2007; Tuohy *et al.* 2001).

Hubo escasas diferencias entre los ácidos orgánicos después de los tratamientos que se podrían atribuir al uso de muestras fecales como una representación para la determinación *in situ* de la composición y concentración de ácidos orgánicos. Las concentraciones de ácidos orgánicos disminuyen distalmente en el intestino grueso, lo que se debe a la fermentación secundaria, la absorción en la circulación sanguínea y/o la utilización de ácidos orgánicos (en particular, butirato) por los colonocitos (Bach *et al.* 2000). Por lo tanto, la medición de ácidos orgánicos en muestras fecales puede subestimar en gran medida la concentración *in situ* de ácidos orgánicos (Millet *et al.* 2010).

El butirato fue ligeramente mayor en las muestras fecales de los participantes en el grupo FE, lo que está en línea con la abundancia de *F. prausnitzii* incrementada. No se detectaron lactato, formiato ni isovalerato en las muestras fecales de ninguno de los grupos en el estudio. Normalmente no se detecta lactato en altas concentraciones en muestras fecales de individuos sanos, ya que es un intermedio en muchas redes metabólicas y se consume por los miembros de la microbiota como parte del metabolismo normal (Duncan *et al.* 2004; Belenguer *et al.* 2011). El formiato también actúa como intermedio y se puede convertir en metano, dióxido de carbono y agua, además de producirse solo en la fase inicial de la fermentación, normalmente en el colon proximal (Pryde *et al.* 2002; Huda-Faujan *et al.* 2010).

*F. prausnitzii* está bien caracterizada en términos de sus capacidades metabólicas y perfil de fermentación, a pesar de ser una bacteria sensible al oxígeno que es difícil de cultivar en el laboratorio (Duncan *et al.* 2002). A pesar de su dominio numérico en el intestino y naturaleza productora de butirato, *F. prausnitzii* aún no se ha utilizado para mejorar la salud digestiva. Dado que se observa una abundancia empobrecida de *F. prausnitzii* en muchos trastornos gastrointestinales, se ha propuesto que *F. prausnitzii* se podría formular como probiótico y administrar a quienes padecen el SII o la EI (Sokol *et al.* 2008; Sartor 2011). Sin embargo, este trabajo todavía está en curso. La sensibilidad al oxígeno de *F. prausnitzii* complica su formulación como componente para composiciones probióticas.

El complemento derivado del kiwi amarillo, GOLD, proporciona un medio para estimular selectivamente la proliferación del comensal *F. prausnitzii*, y, por lo tanto, se considera, en particular, útil para los trastornos gastrointestinales relacionados con la inflamación. En conclusión, GOLD ha mejorado la disbiosis por *F. prausnitzii* empobrecida en participantes funcionalmente estreñidos. Como tal, el kiwi amarillo Gold3 en polvo se usa para restablecer la microbiota a un estado sano con beneficios antiinflamatorios y mayores concentraciones de butirato *in situ*.

## Ejemplo 9: análisis con qPCR del microbioma para el ensayo clínico en seres humanos

### Sumario

Este estudio investigó el impacto de los complementos de kiwi ACTAZIN™ (2400 mg) y GOLD (2400 mg) sobre las concentraciones microbianas fecales en un estudio de intervención en seres humanos, así como experimentos de fermentación *in vitro*. El objetivo fue determinar el efecto de las intervenciones basadas en kiwi sobre la composición microbiana de las muestras. La modificación de la composición de la microbiota colónica se determinó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa ultrarrápida (qPCR), que complementa los datos de secuenciación del gen ARNr 16S existentes obtenidos previamente. Véanse los ejemplos 7 y 8 anteriormente.

La qPCR ultrarrápida es un procedimiento común usado para investigar la ecología microbiana del tubo gastrointestinal. Se ha usado en numerosos estudios y puede dar una indicación cuantitativa de los números microbianos. La cuantificación se llevó a cabo en el instrumento LightCycler® 480 de Roche. Además de las bacterias totales, los grupos bacterianos individuales cuantificados fueron el grupo de *Clostridium coccoides*, el grupo de , *Lachnospiraceae*, *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* y *Faecalibacterium prausnitzii*. Los grupos bacterianos anteriores también se cuantificaron para el trabajo de fermentación *in vitro* con la excepción de *Lactobacilli*, que se sometió a prueba

previamente.

En el grupo funcionalmente estreñido, la concentración de *F. prausnitzii* se incrementó tras el aporte complementario de GOLD, pero apenas llegó a ser estadísticamente significativo. Menores proporciones *F. prausnitzii* a menudo se asocian con trastornos gastrointestinales; especialmente aquellos con una patología inflamatoria. El descubrimiento de que el aporte complementario de GOLD incrementaba las concentraciones de *F. prausnitzii* concurre con el significativo incremento de la abundancia descubierto en los datos de secuenciación y proporciona respaldo para los efectos prebióticos del consumo de GOLD.

## Antecedentes

Se ha demostrado que el kiwi verde mejora aspectos de la salud gastrointestinal, incluyendo la alteración de la ecología microbiana del entorno colónico (Blatchford *et al.* 2015a; Blatchford *et al.* 2015b; Parkar *et al.* 2012). Se cree que estos beneficios derivan de los niveles inherentes de carbohidratos resistentes a la digestión (CRD), polifenoles y vitamina C (Chan *et al.* 2007; Ferguson y Ferguson 2003). Los beneficios del kiwi amarillo no se han establecido claramente. Este estudio detalla experimentos realizados usando muestras del ensayo clínico en seres humano existente (descrito en el ejemplo 5). El ensayo con grupos cruzados, aleatorizado, con enmascaramiento doble y comparativo con placebo examinó el papel de dos ingredientes derivados del kiwi, ACTAZIN™ (kiwi verde) y GOLD (kiwi amarillo Gold3), sobre la salud digestiva.

Los criterios de valoración principales medidos en el ensayo original fueron la frecuencia de las heces, forma de heces y las puntuaciones de calidad de vida. Véanse los ejemplos 5 y 6. Los criterios de valoración secundarios incluyeron la medición de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y también la medición de cambios de las abundancias relativas de las poblaciones microbianas fecales usando la secuenciación del gen ARNr 16S. El análisis por secuenciación del gen ARNr 16S proporcionó una visión global de la ecología microbiana de las muestras (en forma de porcentajes de abundancia relativa), pero no resultados cuantitativos. Véanse los ejemplos 7 y 8 anteriormente.

Por lo tanto, las siguientes muestras de ADN obtenidas a partir del ensayo original se usaron para el ensayo actual: muestras antes y después de la intervención con 2400 mg de GOLD ( $n = 52$ ), muestras antes y después de la intervención con 2400 mg de ACTAZIN™ ( $n = 52$ ) y muestras con placebo ( $n = 52$ ). Estas muestras se usaron para determinar la concentración de grupos bacterianos seleccionados usando qPCR, que proporciona una medida cuantitativa de las concentraciones bacterianas dentro de una muestra.

## Materiales y procedimientos

Como se detalla en el ejemplo 5, el diseño del estudio fue un ensayo con grupos cruzados, aleatorizado, con enmascaramiento doble y comparativo con placebo, en el que los participantes consumieron cuatro tratamientos diferentes durante cuatro semanas, con un periodo de reposo de dos semanas entre cada tratamiento. Las intervenciones se administraron en cápsulas de 4 × 600 mg formuladas para parecer iguales para mantener el enmascaramiento del tratamiento, como se muestra en la tabla 13, a continuación. Véase también el ejemplo 5. Como se describe, los ingredientes pulverulentos se prepararon a partir de kiwi verde y amarillo de Nueva Zelanda, respectivamente. Véanse los ejemplos 1 y 5.

**Tabla 13: descripción de la composición de la intervención**

Intervención	Composición	Dosis	Administración (cápsulas)/día
ACTAZIN	Kiwi verde en polvo	2400 mg	4 x ACTAZIN™
GOLD	Kiwi amarillo en polvo	2400 mg	4 x GOLD
PLACEBO	Isomalt de color verde (E102, E142)	2400 mg	4 x placebo

Se usaron bacterias seleccionadas como géneros representativos para cada uno de los siete grupos bacterianos evaluados (tabla 14). Todas las cepas aisladas se cultivaron de forma anaeróbica a 37 °C durante la noche usando tubos de Hungate sellados con tapones de goma de butilo, a menos que se indique de otro modo. Todos los medios se obtuvieron a partir de Oxoid (Adelaida, Australia), a menos que se indique de otro modo.

Se cultivó *Lactobacillus reuteri* (DPC 16) en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS); se cultivó *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20082) en caldo MRS complementado con un 0,05 % (p/v) de clorhidrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich); se cultivó *Roseburia intestinalis* (DSM 14610) en medio de bacterias ruminales (DSMZ Medium 330); se cultivó *Lachnospira multipara* (ATCC 19207) en medio RM02 complementado con líquido ruminal filtrado (Leahy *et al.* 2010); se cultivó *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) en caldo anaeróbico Wilkins-Chalgren complementado con un 0,05 % (p/v) de clorhidrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich) durante 2 días; se cultivó *Faecalibacterium prausnitzii* (DSM 17677) en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) complementado con un 0,5 % (p/v) de extracto de levadura, un 0,0005 % (p/v) de hemina (Sigma-Aldrich), un 0,0005 % (p/v) de vitamina K (Sigma-Aldrich) y un 0,2 % de clorhidrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich); se cultivó *Escherichia coli* (Nissle) en caldo de soja triptico (TSB) a 37 °C de forma aeróbica.

Tabla 14: tabla de cebadores usados: diseño basado en secuencias de ADNr 16S

Bacterias objetivo	Patrón bacteriano	Secuencia de cebador (5' → 3')	Temp. de hibridación (°C)	Tiempo de hibridación (s)	Referencia
Bacterias totales	Nissle de <i>Escherichia coli</i>	Dir.: SEQ ID NO:3 TCCTACGGGAGGCAGCAGT Inv.: SEQ ID NO:4 GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60	60	(Nadkarni et al. 2002)
Bifidobacteria	DSM 20082 de <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Dir.: SEQ ID NO:5 GGGTGGTAATGCCGGATG Inv.: SEQ ID NO:6 CCACCGTTACACCGGGAA	66	45	(Kok et al. 1996)
Lactobacilli	DPC16 de <i>Lactobacillus reuteri</i>	Dir.: SEQ ID NO:7 CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA Inv.: SEQ ID NO:8 CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG	60	30	(Fu et al. 2006)
Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas	ATCC 25285 de <i>Bacteroides fragilis</i>	Dir.: SEQ ID NO:9 GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT Inv.: SEQ ID NO: 10 CGGATGTAAGGGCCGTGC	63	20	(Rinttila et al. 2004)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	DSM 17677 de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Dir.: SEQ ID NO:11 GGAGGAAGAAGGTCTTCGG Inv.: SEQ ID NO:12 AATTCGCTACCTCTGCACT	60	20	(Ramirez-Farias et al. 2009)
Grupo de <i>C. coccoides</i>	DSM 14610 de <i>Roseburia intestinalis</i>	Dir.: SEQ ID NO:13 AAATGACGGTACCTGACTAA Inv.: SEQ ID NO:14 CTTTGAGTTTCATTCTTGCAGAA	50	30	(Matsuki et al. 2002)
Lachnospiraceae	ATCC 19207 de <i>Lachnospira multipara</i>	Dir.: SEQ ID NO:15 GACGGTACCTGACTAAGAAGC Inv.: SEQ ID NO:16 AGTTTCATTCTTGCAGAACGT	63	30	(Paturi et al. 2014)

La especificidad de cada cepa patrón para los cebadores se evaluó usando análisis *en silicio* en el programa informático SnapGene® ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)). La densidad celular se determinó usando un hemocitómetro Neubauer y los cultivos se diluyeron o concentraron según se requería a  $1,0 \times 10^8$  o  $1,0 \times 10^9$  células/ml. A continuación, se extrajo el ADN usando el kit de aislamiento de ADN MO-BIO PowerSoil® (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EE. UU. n.º 12888). Se construyeron curvas patrón usando series de dilución de las cepas bacterianas representativas de cada grupo. Las muestras y los patrones se procesaron por triplicado por cuantificación absoluta en el instrumento de PCR ultrarrápida LightCycler® 480 de Roche. Se usó la química de detección de Roche SYBR Green I Master Mix (04707516001) para detectar la amplificación de ADN bicatenario. El volumen de reacción total fue de 20 µl, que consistía en 10 µl de mezcla maestra SyBr Green I, 4 µl de cebador directo (concentrado 5X a 2,5 µM), 4 µl de cebador inverso (concentrado 5X a 2,5 µM) y 2 µl de molde de ADN o agua esterilizada (sin control de molde).

Cada tanda de qPCR incluía un ciclo de activación (95 °C) durante 5 min, 32-40 ciclos de tanda (incluyendo la etapa de desnaturalización a 95 °C (30 s), la etapa de hibridación como en la tabla 14 y la etapa de extensión a 72 °C durante 1 min) y un ciclo de curva de fusión (de 60 a 95 °C a 0,1 °C por segundo con adquisición de fluorescencia continua) seguido de un ciclo de enfriamiento a 40 °C. El ciclo de indentificación de Tf de la curva de fusión posibilitó la diferenciación entre el producto objetivo y el producto bicatenario no específico, tal como los dímeros de cebadores. Los cebadores se diluyeron en agua de calidad para PCR a una concentración de 2,5 µM. A continuación, se diluyó 1:5 para obtener una solución concentrada 0,5 µM en la reacción PCR.

Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo en R usando el paquete stats (R Development Core Team 2008). Se realizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas antes y después de cada tratamiento. Para las fermentaciones *in vitro*, se determinaron diferencias significativas comparando el tiempo 0 con los demás puntos de tiempo. Un valor de *P* menor de 0,05 se consideró significativo después de corregir las múltiples comparaciones usando el procedimiento de tasa de descubrimiento falso (TDF) en la función *p.adjust* en R Studio (Benjamini y Hochberg 1995).

#### Ejemplo 10: resultados del análisis con qPCR del microbioma para el ensayo clínico en seres humanos

Los resultados de los datos de qPCR reflejan un perfil microbiano relativamente estable a lo largo del tiempo para cada grupo bacteriano evaluado. Se observaron incrementos o disminuciones moderadas después de cada tratamiento. La tabla 15 representa datos de qPCR en LightCycler® 480 que presentan grupos bacterianos como el número de copias del gen ARNr 16S/gramo de muestra fecal promedio calculado (transformado LOG.) y el error estándar de la media (EEM) antes y después de cada periodo de tratamiento en el grupo sano. La tabla 16 representa datos de qPCR en LightCycler® 480 que presentan grupos bacterianos como el número de copias del gen ARNr 16S/gramo de muestra fecal promedio calculado (transformado LOG.) y el error estándar de la media (EEM) antes y después de cada periodo de tratamiento en el grupo funcionalmente estreñido.

Como se muestra en la tabla 15 y la figura 6, en el grupo sano después del tratamiento con GOLD, se observaron incrementos moderados de las bacterias totales, los grupos de *C. coccoides*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, mientras que la concentración de *F. prausnitzii* permaneció constante. Con el aporte complementario de ACTAZIN™, se observaron ligeras disminuciones de las bacterias totales, los grupos de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* y *F. prausnitzii*, mientras que el grupo de *C. coccoides* permaneció constante y el grupo de *Lachnospiraceae* se incrementó ligeramente. El tratamiento con placebo registró concentraciones elevadas de bacterias totales y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* y pequeñas disminuciones de las concentraciones de los grupos de *C. coccoides*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* y *F. prausnitzii*.

Como se muestra en la tabla 16 y la figura 7, en el grupo funcionalmente estreñido después del tratamiento con GOLD, se observaron incrementos moderados de las bacterias totales, los grupos de *Clostridium coccoides*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* y *Lactobacilli*, y una escasa disminución de *Bifidobacterium* spp. La concentración de *F. prausnitzii* se incrementó la que más, de log 7,03 a 7,45, lo que casi alcanzó la significación (*P* = 0,0503) y concurre con una elevación similar informada en los datos de secuenciación del gen ARNr 16S. El incremento de los números reales es de 231,9 millones de copias del gen ARNr 16S, lo que es un incremento de un 179 % después del tratamiento con GOLD. Después del tratamiento con ACTAZIN™ se observaron disminuciones en todos los grupos bacterianos. Ocho de cada nueve participantes funcionalmente estreñidos mostraron un incremento de los niveles de *F. prausnitzii* tras el tratamiento con GOLD. Véase la figura 5C. El tratamiento con placebo registró concentraciones elevadas en todos los grupos bacterianos excepto por *Lachnospiraceae*, que permaneció constante.

**Tabla 15: Datos de qPCR en LightCycler® 480 para el grupo sano**

	GOLD					
	media antes	EEM antes	media después	EEM después	valor de <i>p</i>	valor de <i>p</i> con tdf
Bacterias totales	9,63	0,17	9,77	0,09	0,99	1,00

Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	8,91	0,21	9,03	0,15	0,84	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,42	0,18	7,53	0,12	0,81	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	7,44	0,17	7,59	0,13	0,44	0,88
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,59	0,14	7,63	0,13	0,95	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,36	0,23	6,42	0,19	0,99	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,87	0,18	6,87	0,13	0,72	1,00
ACTAZIN™						
Bacterias totales	9,79	0,09	9,69	0,17	0,98	1,00
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	8,79	0,11	8,79	0,22	0,56	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,51	0,08	7,52	0,12	0,91	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	7,6	0,1	7,43	0,16	0,60	1,00
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,53	0,07	7,44	0,14	0,91	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,49	0,18	6,41	0,24	0,90	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,97	0,12	6,78	0,21	0,31	0,62
Placebo						
Bacterias totales	9,71	0,17	9,74	0,1	0,82	1,00
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	8,98	0,22	8,87	0,19	0,35	0,70
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,56	0,2	7,47	0,15	0,51	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	7,47	0,18	7,56	0,14	0,87	1,00
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,62	0,19	7,6	0,13	0,66	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,59	0,22	6,55	0,18	0,56	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6,91	0,21	6,83	0,17	0,60	1,00

**Tabla 16: Datos de qPCR en LightCycler® 480 para el grupo funcionalmente estreñido**

	GOLD					
	media antes	EEM antes	media después	EEM después	valor de <i>p</i>	valor de <i>p</i> con tdf
Bacterias totales	10,01	0,09	10,21	0,07	0,16	0,32
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	9,35	0,17	9,5	0,16	0,86	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,85	0,11	7,96	0,11	1,00	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	7,65	0,15	7,88	0,15	0,22	0,44
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,64	0,11	7,79	0,07	0,49	0,98
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,76	0,3	6,64	0,35	0,80	1,00
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7,03	0,16	7,45	0,13	0,05	0,10
ACTAZIN™						
Bacterias totales	10,13	0,15	9,98	0,11	0,34	0,68
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	9,11	0,2	8,93	0,19	0,60	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,78	0,19	7,56	0,17	0,55	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	7,82	0,17	7,5	0,13	0,16	0,32
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,75	0,15	7,67	0,12	0,73	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,95	0,15	6,43	0,27	0,22	0,44
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7,19	0,29	6,86	0,2	0,33	0,66
Placebo						
Bacterias totales	9,96	0,16	10,08	0,12	0,49	0,98
Grupo de <i>Clostridium coccoides</i>	9,23	0,2	9,35	0,17	0,60	1,00
Grupo de <i>Lachnospiraceae</i>	7,8	0,17	7,8	0,17	1,00	1,00
Grupo de <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i>	7,65	0,24	7,84	0,15	0,49	0,98
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,24	0,1	7,29	0,12	0,93	1,00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,53	0,32	6,93	0,26	0,26	0,52
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7,12	0,29	7,16	0,26	0,73	1,00

Las figuras 6 y 7 presentan gráficamente los datos de concentración bacteriana tanto en las formas de datos transformados logarítmicamente como naturales para los grupos sanos y funcionalmente estreñidos, respectivamente. La visualización de los datos en esta forma destaca cuán estable es la composición de la microbiota fecal a lo largo del tiempo.

Cabe señalar que las bacterias en el grupo de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* constituye una colección considerable de degradadores principales en la comunidad colónica humana. Desempeñan un papel importante en el acceso a los carbohidratos no absorbidos usando mecanismos de fagocitación especializados. Los principales entre estos son degradadores de celulosa, almidón, inulina y xilano, tales como *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus* y *Bacteroides cellulosilyticus* (Flint *et al.* 2008; Walker *et al.* 2008). *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinovorans*, *Ruminococcus bromii* y *Ruminococcus flavefaciens* también son degradadores principales clave que son miembros del grupo de *C. coccoides* (Kurakawa *et al.* 2015).

El grupo de *C. coccoides* constituye el subgrupo bacteriano más grande en el colon, constituyendo típicamente un 25-60 % de la abundancia bacteriana total (Hold *et al.* 2002) y se compone de una gran proporción de productores de butirato (Louis y Flint 2009). Dos microorganismos principales con estatus probiótico probado son *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*. Las *Bifidobacteria* a menudo se han asociado con una microbiota sana y son productoras de acetato, lo que puede tener efectos beneficiosos sobre la salud del huésped. *Lactobacilli* consisten en un grupo de bacterias comensales de ácido láctico que se han explotado durante siglos en la producción de productos lácteos y se han estudiado en cientos de ensayos con respecto a su eficacia probiótica (Reid 1999).

El incremento de la concentración de *F. prausnitzii* estuvo a punto de ser significativa ( $P = 0,0503$ ) después del periodo de 4 semanas de aporte complementario con GOLD basado en kiwi amarillo Gold3. *F. prausnitzii* es una de las especies más pobladas en el tubo gastrointestinal humano, observándose típicamente en más de un 5 % de la proporción total de la microbiota colónica de adultos sanos (Miquel *et al.* 2013). Los miembros del filo Firmicutes, *F. prausnitzii*, son habitantes comensales del intestino grueso humano, con propiedades antiinflamatorias demostradas *in vivo* (Furet *et al.* 2010; Sokol *et al.* 2009). *F. prausnitzii* generan butirato como resultado de la fermentación de carbohidratos, así como lactato y formiato (Duncan *et al.* 2002; Duncan *et al.* 2004). El butirato es la fuente de energía preferente para las células epiteliales colónicas y desempeña un papel en el alivio de la inflamación, así como en la mitigación de la carcinogénesis, la colonización patógena y la agresión oxidativa (Hamer *et al.* 2008; Macfarlane y Macfarlane 2011). GOLD estimula selectivamente la proliferación del comensal *F. prausnitzii* y, por lo tanto, se puede considerar útil para los trastornos gastrointestinales relacionados con la inflamación.

En resumen, los datos de qPCR confirman los datos de abundancia relativa microbiana y muestran que el complemento derivado del kiwi amarillo Gold3 ha incrementado la concentración de *F. prausnitzii* en participantes funcionalmente estreñidos. Esto demuestra un resultado beneficioso, ya que se sabe que *F. prausnitzii* crece en el intestino grueso y genera butirato, que tiene funciones protectoras/beneficios para la salud en el intestino.

Estos resultados se consideran significativos, dado que *F. prausnitzii* es altamente sensible al oxígeno (Rigottier-Gois 2013) y, por lo tanto, complica su formulación y almacenamiento como agente probiótico. Por lo tanto, las composiciones de kiwi amarillo de la invención proporcionan un medio eficiente y eficaz para incrementar los niveles de *F. prausnitzii*, que, de otro modo, serían difíciles de modular.

La invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.



## Referencias

- 5 Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F, van den Berg WB 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 118(1): 205-16.
- Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC 2012. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 129(2): 434-40, 440 e1-2.
- 10 Adaim A. 2010. Investigating the effect of gold kiwifruit consumption on the incidence and symptoms of upper respiratory tract infections in preschool children: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters of Sciences in Human Nutrition and Human Health, Massey University, Auckland, New Zealy.
- 15 Attaluri A, Donahoe R, Valestin J, Brown K, Rao SSC 2011. Randomised clinical trial: dried plums (prunes) vs. psyllium for constipation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 33(7): 822-828.
- Bach Knudsen KE, Jørgensen H, Canibe N. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. *The British Journal of Nutrition*. 2000; 84: 449-58.
- 20 Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307: 1915-20.
- 25 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*. 1995; 57: 289-300.
- Belenguer A, Holtrop G, Duncan SH, Anderson SE, Calder AG, Flint HJ, *et al*. Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol*. 2011; 77: 107-19.
- 30 Bentley-Hewitt KL, Blatchford PA, Parkar SG, Ansell J, Pernthaner A. Digested and fermented green kiwifruit increases human beta-defensin 1 and 2 production in vitro. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012; 67: 208-14.
- 35 Blatchford P, Bentley-Hewitt KL, Stoklosinski H, McGhie T, Gearry R, Gibson G, Ansell J 2015a. In vitro characterisation of the fermentation profile and prebiotic capacity of gold-fleshed kiwifruit. *Benef Microbes*, páginas 1-12. Publicado en línea con el DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0006>.
- 40 Blatchford P, Stoklosinski H, Walton G, Swann J, Gibson G, Gearry R, Ansell J 2015b. Kiwifruit fermentation drives positive gut microbial and metabolic changes irrespective of initial microbiota composition. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6(1): 37-45.
- Boland, M.J., Hardman, M.J. 1972. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS Letters*, 27(2): 282-284.
- 45 Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, *et al*. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 16050-5.
- 50 Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13: 790-801.
- Candela M, Rampelli S, Turróni S, Severgnini M, Consolandi C, De Bellis G, *et al*. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiology*. 2012; 12: 95.
- 55 Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*. 2010; 26: 266-7.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010; 7: 335-6.
- 60 Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, *et al*. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108, suppl. 1: 4516-22.
- 65 Cardona F, Andres-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 1415-1422.

- Chan AO, Leung G, Tong T, Wong NY. Increasing dietary fiber intake in terms of kiwifruit improves constipation in Chinese patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2007; 13: 4771-5.
- 5 Chang C, Lin T, Lu Y, Liu T, Liu J. 2010. Kiwifruit improves bowel function in patients with irritable bowel syndrome with constipation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 19(4): 451-457.
- Chassard, C, Dapoigny, M, Scott, KP, Crouzet, L, Del'homme, C, Marquet, P, Martin, JC, Pickering, G, Ardid, D, Eschaliere, A, Dubray, C, Flint, HJ y Bernalier-Donadille, A. 2012. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35: 828-838.
- 10 Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C 2012. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One* 7(6): e39743.
- 15 DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 5069-72.
- de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, Gouveia Peluzio Mdo C 2014. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical Microbiology Reviews* 27(3): 482-9.
- 20 de Vos WM, de Vos EA 2012. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition Reviews* 70, suppl. 1: S45-56.
- de Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos WM 2013. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics* 131(2): e550-8.
- 25 Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research* 43(2): 164-74.
- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1377-90.
- 30 Drummond L. 2013. The composition and nutritional value of kiwifruit. *Advances in Food and Nutrition Research* 68: 33-57.
- Drummond L, Gearry RB. 2013. Kiwifruit modulation of gastrointestinal motility. *Advances in Food and Nutrition Research* 35 68: 219-232.
- Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52: 2141-6.
- 40 Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-using bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 5810-7.
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2460-1.
- 45 Egert M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Venema K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*. 2006; 14: 86-91.
- Eidenberger T, Selg M, Fuerst S, Krennhuber K. 2014. In-vitro inhibition of human lipase PS by polyphenols from kiwi fruit. *Journal of Food Research*. 3(4): 71-77.
- 50 Ferguson AR, Ferguson LR. Are kiwifruit really good for you? In: Huang HW, editor. *Proceedings of the Fifth International Symposium on Kiwifruit*. 2003. 131-8.
- 55 Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* 6(2): 121-31.
- Fu CJ, Carter JN, Li Y, Porter JH, Kerley MS 2006. Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Letters in Applied Microbiology* 42(5): 490-494.
- 60 Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A 2013. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 28(4): 613-9.
- 65 Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, *et al.* Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010; 59: 3049-

57.

Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Sulnier D, Loh G, MacFarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickmann R, Lenoir-Wijnkoop I, Walker C, Buddington R. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7: 1-19.

Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes*. 2014; 5: 3-17.

Gostner A, Blaut M, Schäffer V, Kozianowski G, Theis S, Klingenberg M, *et al.* Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 2006; 95: 40-50.

Guidance for industry: irritable bowel syndrome - clinical evaluation of drugs for treatment. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM205269.pdf>

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 27: 104-19.

Hazenberg MP, van de Merwe JP, Pena AS, Pennock-Schroder AM, van Lieshout LM. Antibodies to *Coprococcus comes* in sera of patients with Crohn's disease. Isolation and purification of the agglutinating antigen tested with an ELISA technique. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*. 1987; 23: 143-8.

Herlemann DPR, Labrenz M, Juergens K, Bertilsson S, Wanek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME Journal*. 2011; 5: 1571-9.

Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 39(1): 33-9.

Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, *et al.* The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *The Open Biochemistry Journal*. 2010; 4: 53-8.

Hudcovic T, Kolinska J, Klepetar J, Stepankova R, Rezanka T, Srutkova D, *et al.* Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012; 167: 356-65.

Husebye E, Hellström PM, Sundler F, Chen J y Midtvedt T. 2001. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: G368-G380.

Hunter DC, Skinner MA, Wolber FM, Booth CL, Loh JMS, Wohlers M, Stevenson LM, Kruger MC. 2012. Consumption of gold kiwifruit reduces severity and duration of selected upper respiratory tract infection symptoms and increases plasma vitamin C concentration in healthy older adults. *British Journal of Nutrition* 108: 1235- 1245.

Jeffery IB, O'Toole PW, Ohman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, Simren M 2012. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61(7): 997-1006.

Kalliomaki M, Satokari R, Lahteenoja H, Vahamiko S, Gronlund J, Routi T, Salminen S 2012. Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54(6): 727-32.

L Kaur, SM Rutherford, PJ Moughan, L Drummond y MJ Boland. 2010. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an in vitro digestion model, *J. Agric. Food Chem.* 58 (8): 5074-5080.

Khalif IL, Quigley EMM, Konovitch EA y Maximova ID. 2005. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Digestive and Liver Disease* 37: 838-849.

Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* 19(5): 576-85.

Kok RG, DeWaal A, Schut F, Welling GW, Weenk G, Hellingwerf KJ 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology* 62(10): 3668-3672.

- Kolida S, Gibson GR. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, 137(11): 2503S-2506S.
- 5 Kolida S, Meyer D, Gibson GR. A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007; 61: 1189-95.
- Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Backhed F 2011. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, suppl. 1: 4592-8.
- 10 Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Kubota H, Takada T, Kado Y, Asahara T, Takahashi T, Nomoto K 2015. Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* group in the Japanese population, as demonstrated by reverse transcription-quantitative PCR. *PLoS One* 10(5): e0126226.
- 15 Leahy SC, Kelly WJ, Altermann E, Ronimus RS, Yeoman CJ, Pacheco DM, Li D, Kong Z, McTavish S, Sang C, Lambie SC, Janssen PH, Dey D, Attwood GT 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS One* 5(1).
- 20 Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, suppl. 1: 4615-22.
- Lepage P, Hasler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskas L, Dore J, Raedler A, Schreiber S 2011. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis.
- 25 *Gastroenterology* 141(1): 227-36.
- Leung L, Riutta T, Kotecha J, Rosser W. 2011. Chronic constipation: An evidence-based review. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 24(4): 436-451.
- 30 Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI 2006. Microbial ecology - Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122): 1022-1023.
- Liu LWC. 2011. Chronic constipation: current treatment options. *Canadian Journal of Gastroenterology* 25 (supl. B): 22B-28B.
- 35 Louis P, Flint HJ 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294(1): 1-8.
- Maccaferri S, Candela M, Turrone S, Centanni M, Severgnini M, Consolandi C, Cavina P, Brigidi P 2012. IBS-associated phylogenetic unbalances of the intestinal microbiota are not reverted by probiotic supplementation. *Gut Microbes* 3(5): 406-13.
- 40 Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 2011; 45, suppl.: S120-7.
- 45 R Maddumage, NJ Nieuwenhuizen, SM Bulley, JM Cooney, SA Green, RG Atkinson. 2013. Diversity and relative levels of actinidin, kiwelin, and thaumatin-like allergens in 15 varieties of kiwifruit (*Actinidia*). *J. Agric. Food Chem.* 61: 728-739.
- Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, Brown DG, Neufeld JD. PANDAseq: PAired-eND Assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:31.
- 50 Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68(11): 5445-51.
- 55 Metcalf AM, Phillips SF, Zinsmeister AR, MacCarty RL, Beart RW, Wolff BG. Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology*. 1987; 92: 40-7.
- Millet S, Van Oeckel MJ, Aluwe M, Delezie E, De Brabander DL. Prediction of in vivo short-chain fatty acid production in hindgut fermenting mammals: problems and pitfalls. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010; 50:605-19.
- 60 Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran LG, Chatel JM, Sokol H, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*. 2013; 16: 255-61.
- 65 Monro JA, Mishra S, Venn B. 2010. Baselines representing blood glucose clearance improve in vitro prediction of the glycaemic impact of customarily consumed food quantities. *British Journal of Nutrition*, 103(2): 295-305.

- 5 Murata Y, Ohmori H, Ichikawa M, Harada A, Agari M, Fukuba H, Yamasaki M, Yasuzawa M, Takemoto M, Ikeda M, Matsumoto N, Tamura T, Sumimoto R, Namba K 2013. Fecal microbiota and fecal characteristics of patients with Parkinson's disease. *Journal of Intestinal Microbiology* 27(4): 211-215.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology-Sgm* 148: 257-266.
- 10 Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility* 23(3): 255-64, e119.
- NJ Nieuwenhuizen, R Maddumage, GK Tsang, LG Fraser, JM Cooney, HN De Silva, S Green, KA Richardson, RG Atkinson. 2012. Mapping, complementation, and targets of the cysteine protease actinidin in kiwifruit. *Plant Physiology* 158(1): 376-388.
- 15 Parkar SG, Rosendale D, Paturi G, Herath TD, Stoklosinski H, Phipps JE, *et al.* In vitro usation of gold and green kiwifruit oligosaccharides by human gut microbial populations. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012; 67: 200-7.
- Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *The British Journal of Nutrition*. 2012; 107: 601-13.
- 20 Paturi G, Butts CA, Bentley-Hewitt KL, Ansell J 2014. Influence of green and gold kiwifruit on indices of large bowel function in healthy rats. *J Food Sci* 79(8): H1611-20.
- 25 Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 217: 133-9.
- Qin JJ, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464: 59-U70.
- 30 R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- RStudio. RStudio: Integrated development environment for R (Version 0.97.551) Computer software. Boston, MA. <http://www.rstudio.org/>. 2012.
- 35 Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, *et al.* Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011; 141: 1792-801.
- 40 Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014; 38: 996-1047.
- Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition* 101(4): 541-550.
- 45 Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JL. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*. 2006; 127: 423-33.
- 50 Reid G 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 65(9): 3763-6.
- Rhee SH, Pothoulakis C y Mayer EA. 2009. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 6: 306-314.
- 55 Richardson AJ, Calder AG, Stewart CS, Smith A. 1989. Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas-chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 5-8.
- Rigottier-Gois L. 2013. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME Journal* 7: 1256-1261.
- 60 Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97(6): 1166-1177.
- 65 Rosendale DI, Maddox IS, Miles MC, Rodier M, Skinner M, Sutherland J. 2008. High-throughput microbial bioassays to screen potential New Zealand functional food ingredients intended to manage the growth of probiotic and pathogenic gut bacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12): 2257-2267.

- Rumah KR, Linden J, Fischetti VA, Vartanian T 2013. Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS One* 8(10): e76359.
- 5 Rush EC, Patel M, Plank LD, Ferguson LR. 2002. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11(2): 164-168.
- Sanchez B, Champomier-Verges MC, Collado Mdel C, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, *et al.* Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 6450-9.
- 10 Sartor RB. Efficacy of probiotics for the management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & Hepatology.* 2011; 7: 606-8.
- 15 Saulnier DM, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009; 20: 135-41.
- Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R 2007. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics* 119(1): e124-30.
- 20 Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P 2014. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders.*
- Schloss PD, Schubert AM, Zackular JP, Iverson KD, Young VB, Petrosino JF. Stabilization of the murine gut microbiome following weaning. *Gut Microbes.* 2012; 3: 383-93.
- 25 Seeram N. Associate Professor of Bioactive Botanical Research Laboratory, University of Rhode Island. Digestive Health Forum, NutraIngredients-USA, 25 de septiembre de 2014.
- 30 Singleton, Vernon L, Orthofer, Rudolf, Lamuela-Raventós, Rosa M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent 299: 152.
- Skinner MA. 2012. Wellness foods based on the health benefits of fruit: gold kiwifruit for immune support and reducing symptoms of colds and influenza. *Journal of Food and Drug Analysis* 20(1): 261-264.
- 35 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 16731-6.
- 40 Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2009; 15: 1183-9.
- Stonehouse W, Gammon CS, Beck KL, Conlon CA, Von Hurst PR, Kruger R. 2012. Kiwifruit: our daily prescription for health. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 91(6): 442-447.
- 45 D Sun-Waterhouse, I Wen, R Wibisono, LD Melton, S Wadhwa. 2009. Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of green kiwifruit juicing. *International Journal of Food Science & Technology.* 44(12): 2644-2652.
- Taras D, Simmering R, Collins MD, Lawson PA, Blaut M. Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2002; 52: 423-8.
- 50 Timm D, Willis H, Thomas W, Sanders L, Boileau T, Slavin J. The use of a wireless motility device (SmartPill(R)) for the measurement of gastrointestinal transit time after a dietary fibre intervention. *The British Journal of Nutrition.* 2011; 105: 1337-42.
- 55 Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. *The British Journal of Nutrition.* 2001; 86: 341-8.
- 60 Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe* 3(4): 213-223.
- Udani J, Bloom D. 2013. Effects of kivia powder on Gut health in patients with occasional constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition Journal* 12(1): 78.
- 65 Vaahtovuori J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P 2008. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis.

- Journal of Rheumatology 35(8): 1500-5.
- Vogt JA, Pencharz PB, Wolever TMS. L-Rhamnose increases serum propionate in humans. American Journal of Clinical Nutrition. 2004; 80: 89-94.
- 5 Walker AW, Duncan SH, McWilliam Leitch EC, Child MW, Flint HJ. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 3692-700.
- 10 Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJ, Holtrop G, Welling GW, Flint HJ 2008. The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle- associated and liquid phase communities. Environ Microbiol 10(12): 3275-83.
- 15 Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, *et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. ISME Journal. 2011; 5: 220-30.
- 20 Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA 2011. Low relative abundances of the mucolytic bacterium Akkermansia muciniphila and Bifidobacterium spp. in feces of children with autism. Applied and Environmental Microbiology 77(18): 6718-21.
- 25 Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. ISME Journal 6(2): 320-9.
- 30 Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 5261-7.
- 35 Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI 2012. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. mBio 3(1).
- 40 Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, *et al.* A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. Gastroenterology. 2010; 139: 1844-54 e1.
- 45 Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. Journal of Clinical Gastroenterology. 2006; 40: 235-43.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science. 2011; 334: 105-8.
- Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J 2010. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. Current Microbiology 61(1): 69-78.
- Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. ISME Journal. 2012; 6: 1535-43.
- Zoppi G, Cinquetti M, Luciano A, Benini A, Miner A y Bertazzoni ME. 1998. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. Acta Paediatrica 87: 836-841.

# REIVINDICACIONES

1. Una composición preparada a partir de kiwi amarillo secado, en la que el kiwi amarillo secado es un kiwi *Actinidia chinensis* Zesy002, para su uso en:  
5 el tratamiento o prevención de uno o más síntomas de estreñimiento al mejorar una disminución de los niveles de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo de un sujeto.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se administra por  
10 administración enteral, oral o rectal.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición se administra como uno o más de un comprimido, cápsula, líquido, gel o sobre.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición se administra a una dosificación de:  
(i) 2000 a 4000 mg de polvo por día,  
20 (ii) 250 a 2500 mg de polvo por día,  
(iii) 2400 mg de polvo por día o  
(iv) 600 mg de polvo por día.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se coadministra con una o más de:  
(i) otra ayuda digestiva,  
30 (ii) una o más composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas; o  
(iii) fibra y/o una enzima digestiva.
- 35 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición se complementa además con polifenoles.
7. Una composición preparada a partir de kiwi amarillo secado, en la que el kiwi amarillo secado es un kiwi *Actinidia chinensis* Zesy002, para su uso en:  
40 el tratamiento o prevención de uno o más síntomas de estreñimiento al incrementar los niveles de *Faecalibacterium prausnitzii* en el tubo digestivo de un sujeto.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición se administra por  
45 administración enteral, oral o rectal.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que la composición se administra como uno o más de un comprimido, cápsula, líquido, gel o sobre.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la composición se administra a una dosificación de:  
(i) 2000 a 4000 mg de polvo por día,  
55 (ii) 250 a 2500 mg de polvo por día,  
(iii) 2400 mg de polvo por día o  
(iv) 600 mg de polvo por día.
- 60 11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que la composición se coadministra con una o más de:  
(i) otra ayuda digestiva,  
65 (ii) composiciones probióticas, prebióticas o simbióticas, o



(iii) fibra y/o una enzima digestiva.

5 12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en la que la composición se complementa además con polifenoles.

13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 9, en la que la composición se administra como una cápsula de gelatina.

10 14. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el sujeto también tiene uno o más síntomas de: irregularidad intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal o cáncer gastrointestinal.

FIGURA 1

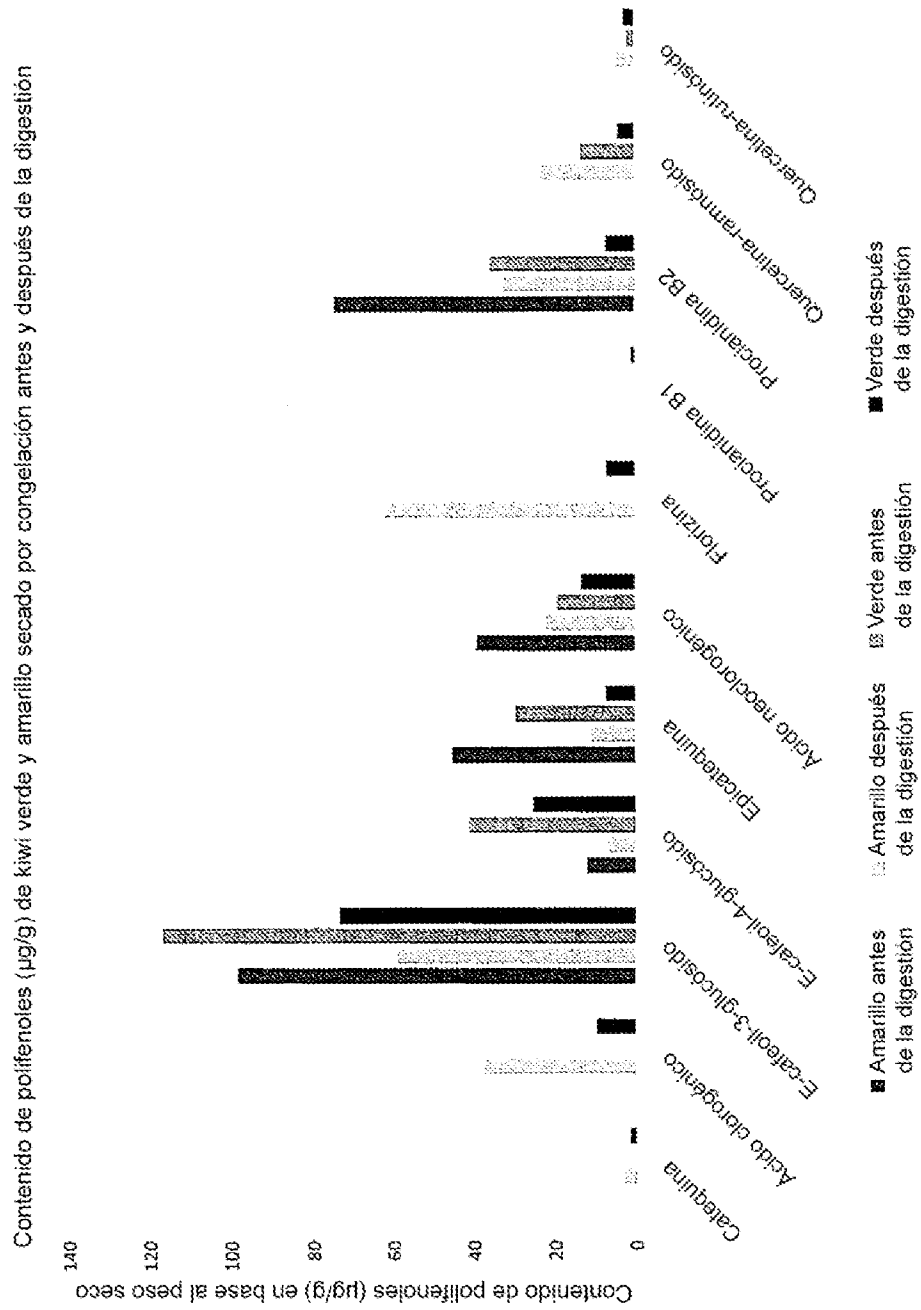




FIGURA 3  
 $\Delta$  Acetato, butirato y propionato promedio frente al control

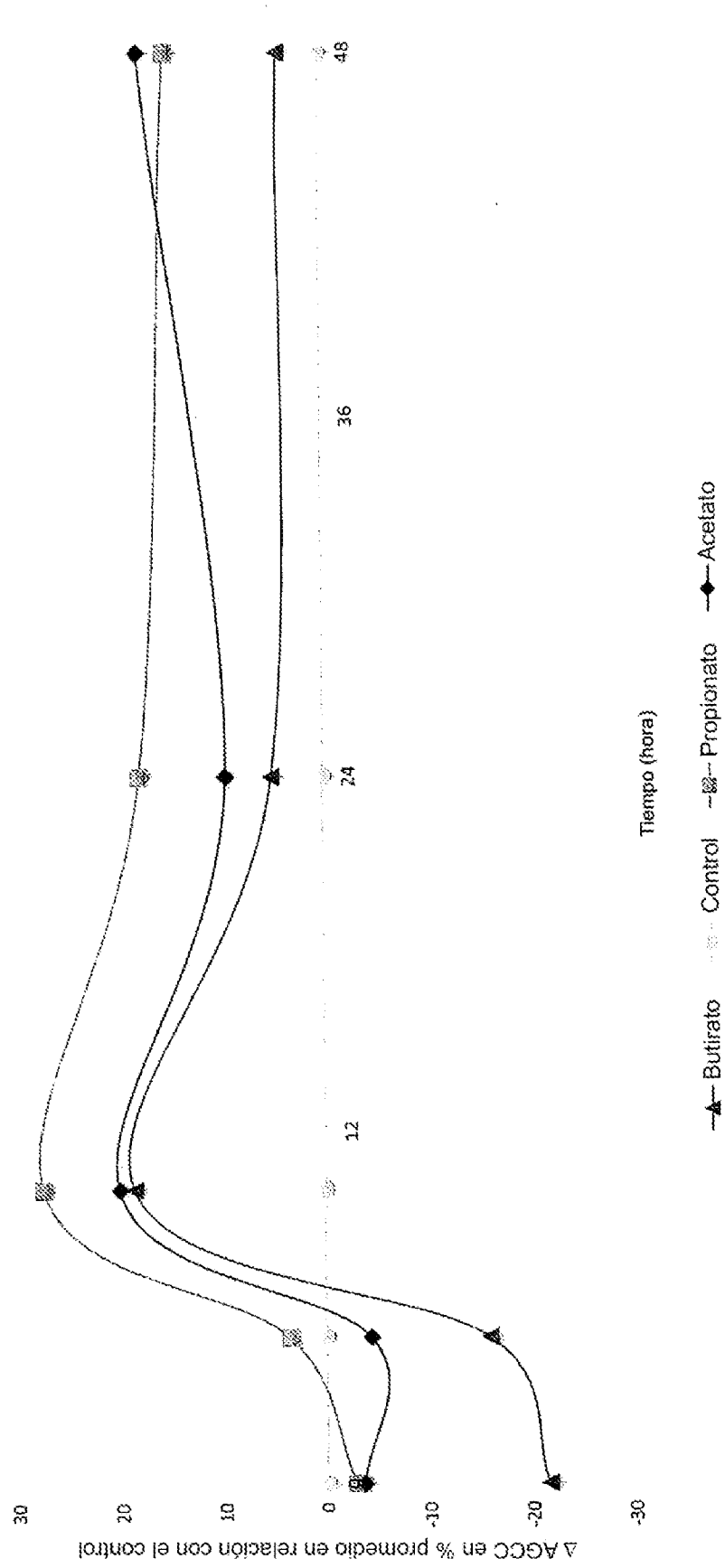


FIGURA 4

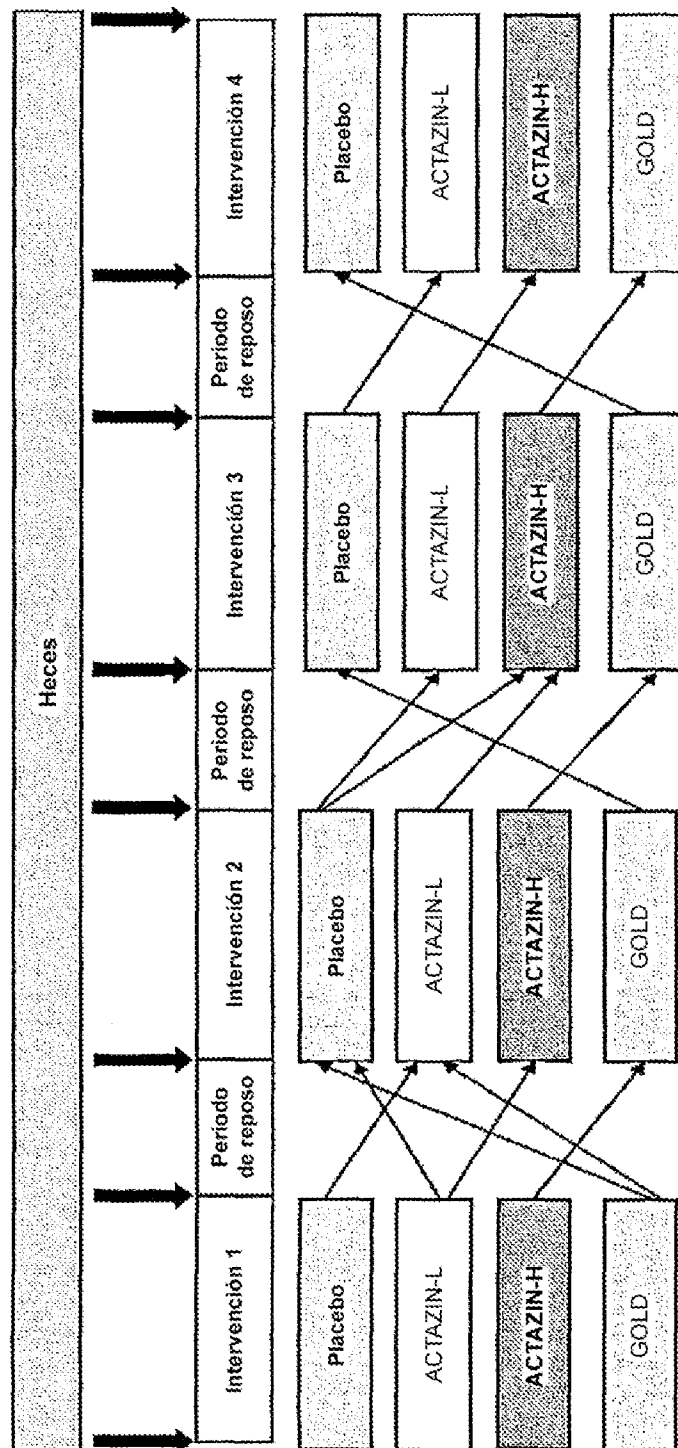


FIGURA 5A

Cambio del ISD para cada participante

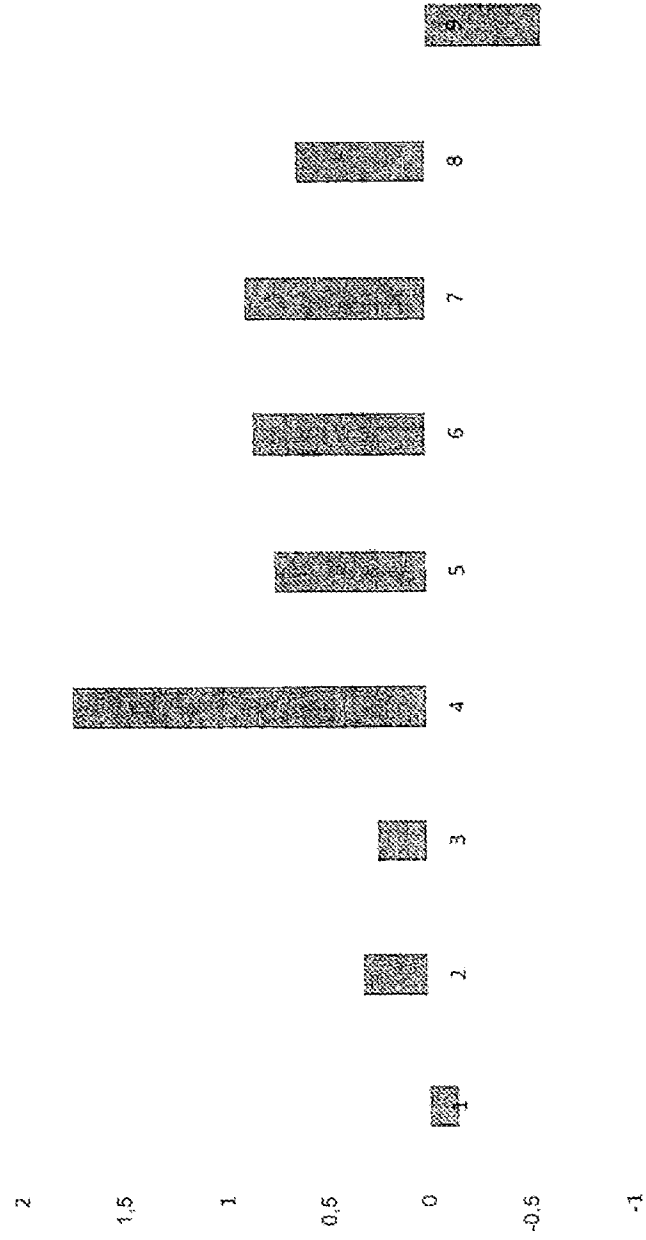


FIGURA 5B

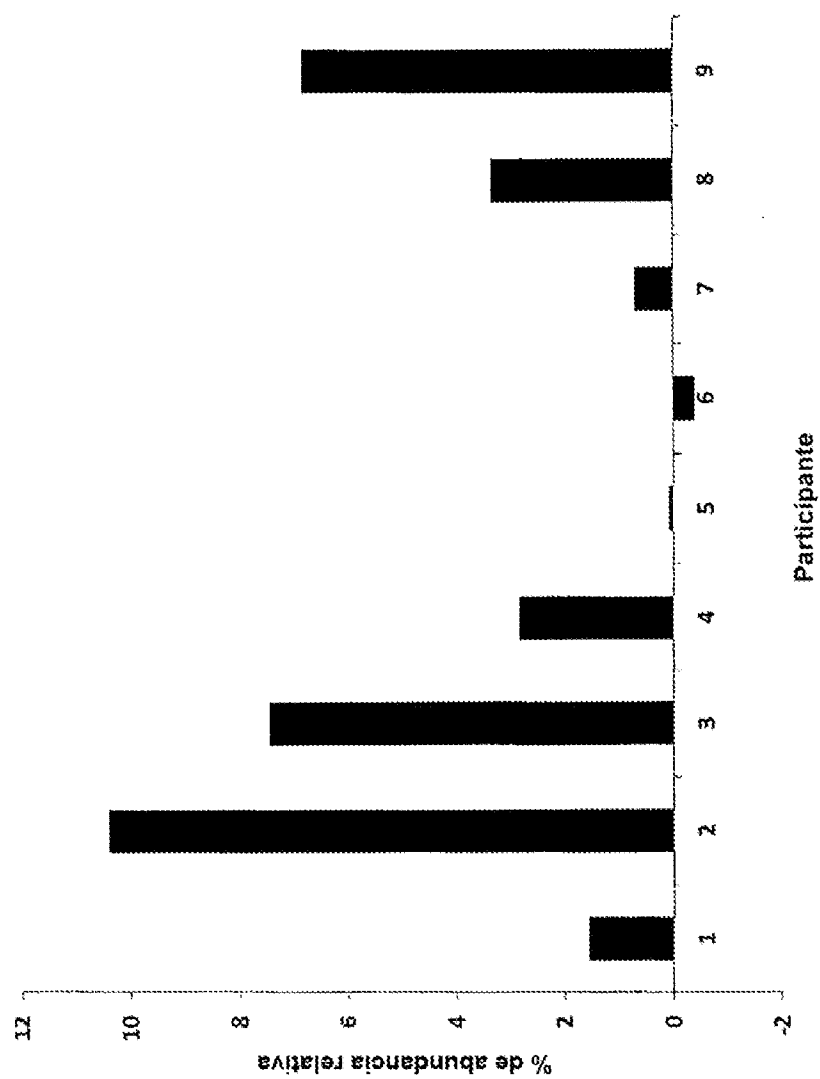


FIGURA 5C

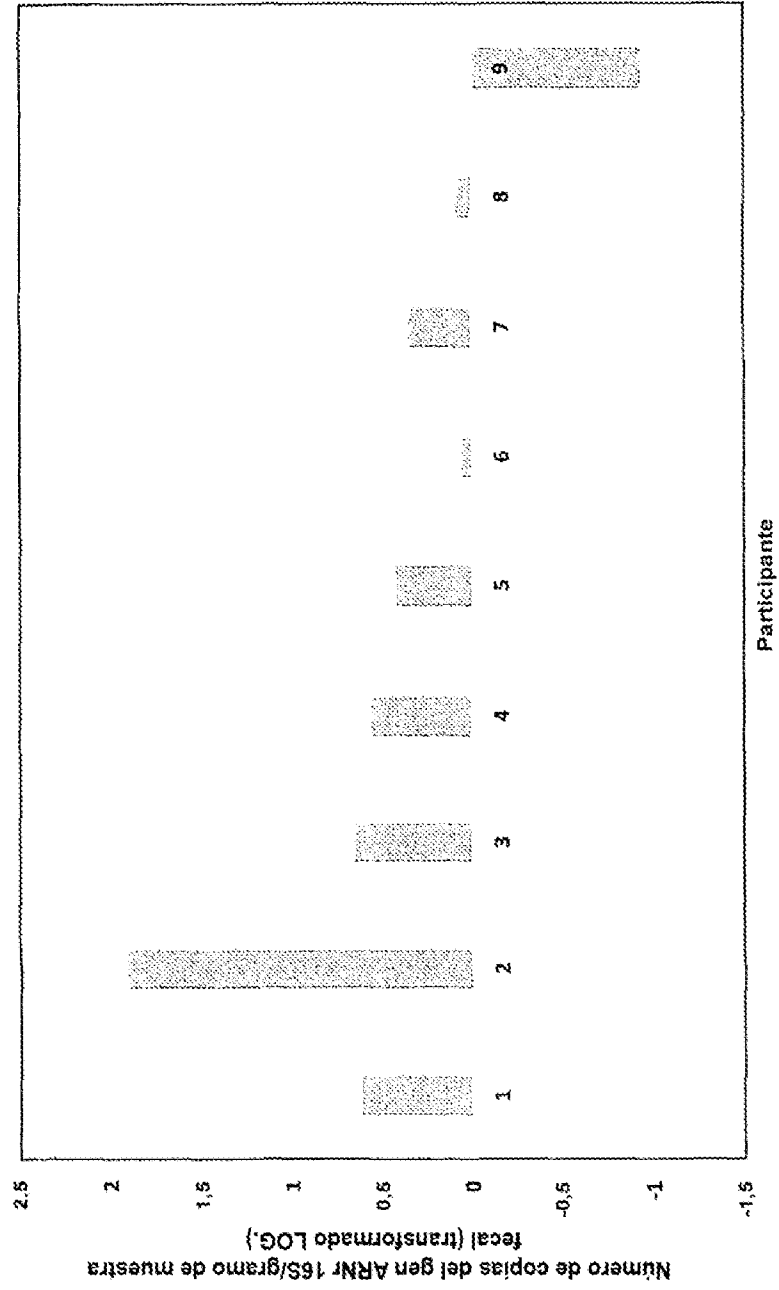




FIGURA 6

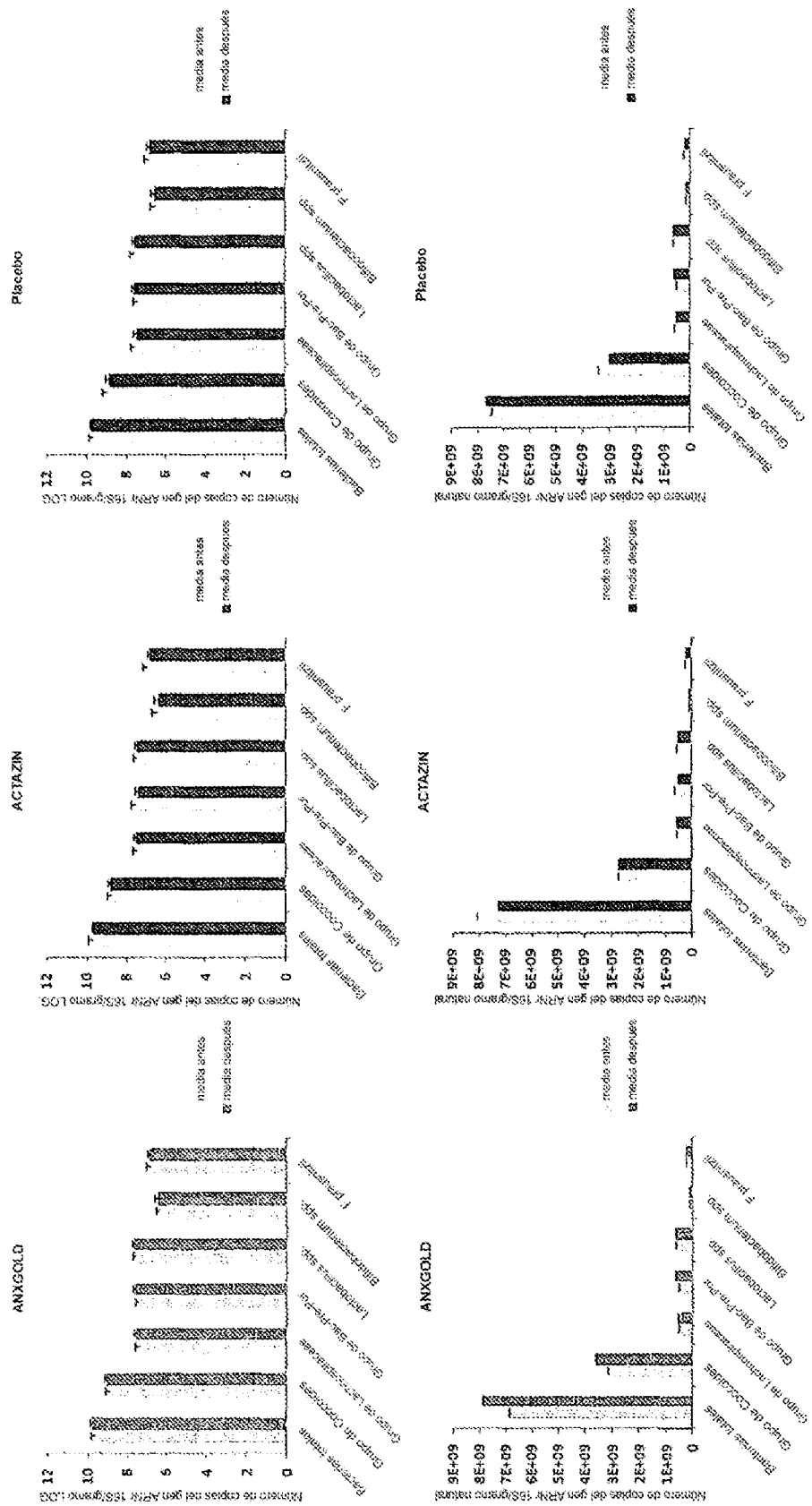


FIGURA 7

