(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 763 137**

(51) Int. CI.:

A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010 E 17155654 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3181134**

(54) Título: **Bifidobacterias para el tratamiento de diabetes y afecciones relacionadas**

(30) Prioridad:

19.06.2009 US 218563 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2020

(73) Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (100.0%)
Langebrogade 1
1001 Copenhagen K, DK

(72) Inventor/es:

BURCELIN, RÉMY;
CARCANO, DIDIER y
LAHTINEN, SAMPO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Bifidobacterias para el tratamiento de diabetes y afecciones relacionadas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a usos nuevos de la bacteria de la especie *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) (en particular, aunque no exclusivamente, bifidobacterias probióticas) y a productos alimentarios, productos de piensos, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas que contienen tal bacteria.

Descripción de la técnica anterior

La diabetes mellitus, a menudo denominada simplemente como diabetes, es una afección caracterizada por un trastorno en el metabolismo y azúcar en sangre anómalamente elevada (hiperglucemia) que es resultado de niveles y/o acción insuficientes de la hormona insulina. Los síntomas característicos son una excesiva producción de orina (poliuria) debido a los elevados niveles de glucosa en sangre, sed excesiva y elevada ingesta de fluido (polidipsia) que trata de compensar la elevada producción de orina, visión borrosa debido a los efectos de la elevada glucosa en sangre sobre la óptica del ojo, pérdida de peso inexplicable y letargo. Estos síntomas probablemente sean menos evidentes si el azúcar en sangre es moderadamente elevado.

La Organización Mundial de la Salud reconoce tres formas principales de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional (que tiene lugar durante el embarazo), que tienen diferentes causas y distribuciones poblacionales. Aunque, en última instancia, todas las formas se deben a que las células beta del páncreas no pueden producir suficiente insulina para prevenir la hiperglucemia, las causas son diferentes. La diabetes de tipo 1 generalmente se debe a la destrucción autoinmunitaria de las células beta pancreáticas. La diabetes de tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina en los tejidos diana. Esto causa la necesidad de cantidades anormalmente altas de insulina y la diabetes se desarrolla cuando las células beta no pueden satisfacer esta demanda. La diabetes gestacional es similar a la diabetes de tipo 2 en que implica la resistencia a la insulina; las hormonas del embarazo pueden causar resistencia a la insulina en mujeres genéticamente predispuestas a desarrollar esta afección.

La diabetes gestacional generalmente se soluciona con el parto del niño: sin embargo, las diabetes de tipo 1 y 2 son afecciones crónicas. Todos los tipos se pueden tratar desde que la insulina llegó a estar médicamente disponible en 1921. La diabetes de tipo 1, en la que la insulina no es secretada por el páncreas, solo se puede tratar directamente con insulina inyectada, aunque los ajustes en la dieta y otros ajustes en el estilo de vida son parte del tratamiento. El tipo 2 se puede tratar con una combinación de tratamiento de la dieta, comprimidos e inyecciones y, frecuentemente, con suplementos de insulina.

La diabetes puede provocar muchas complicaciones. Las complicaciones agudas (hipoglucemia, cetoacidosis o coma hiperosmolar no cetósico) pueden tener lugar si la enfermedad no se controla de manera adecuada. Las complicaciones serias a largo plazo incluyen enfermedades cardiovasculares (duplicación del riesgo), insuficiencia renal crónica, lesiones retinianas (que pueden llevar a la ceguera), lesiones nerviosas (de varios tipos) y lesiones microvasculares, que pueden provocar impotencia y mala cicatrización. La mala cicatrización de las heridas, en particular, de los pies, puede dar lugar a gangrena, lo que puede requerir la amputación. El tratamiento de la diabetes, así como un mayor énfasis en el control de la presión arterial y los factores del estilo de vida (tales como no fumar y mantener un peso corporal sano), pueden mejorar el perfil de riesgo de la mayoría de las complicaciones mencionadas anteriormente. En el mundo desarrollado, la diabetes es la causa más significativa de ceguera en adultos no ancianos y la causa principal de amputación no traumática en adultos, y la nefropatía diabética es la principal enfermedad que requiere diálisis renal en los Estados Unidos.

La diabetes mellitus es actualmente una enfermedad crónica, sin una cura, y el énfasis médico debe estar necesariamente sobre tratar/evitar posibles problemas a corto y a largo plazo relacionados con la diabetes. Existe un papel excepcionalmente importante en la educación del paciente, el apoyo dietético, el ejercicio prudente, el autocontrol de la glucosa, con el objetivo de mantener los niveles de glucosa a corto plazo y a largo plazo, dentro de los límites aceptables. Se necesita un control cuidadoso para reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo. Esto en teoría se puede lograr con combinaciones de la dieta, ejercicio y pérdida de peso (tipo 2), diversos fármacos orales para la diabetes (solo tipo 2), y el uso de insulina (tipo 1 y, cada vez más, para el tipo 2 que no responde a los medicamentos orales). Además, dados los mayores riesgos asociados de enfermedades cardiovasculares, se deberían realizar modificaciones en el estilo de vida para controlar la presión arterial y el colesterol haciendo más ejercicio, dejando de fumar, consumiendo una dieta apropiada, llevando calcetines para diabéticos y, si es necesario, tomando cualquier o varios fármacos para reducir la presión arterial.

Los fármacos orales antidiabetes y los análogos de insulina actualmente en el mercado o que se están sometiendo a ensayos clínicos incluyen biguanidas (tales como metformina), sulfonilureas (tales como carbutamida, clorpropamida, glibenclamida (Glyburide), gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, tolazamida o tolbutamida), inhibidores de alfa-glucosidasa (tales como acarbosa, miglitol o voglibosa), tiazolidinodionas (TZD) (tales como pioglitazona, rivoglitazona o rosiglitazona), meglitinidas (tales como nateglinida, repaglinida o mitiglinida), inhibidores

de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (tales como alogliptina, saxagliptina, sitagliptina o vildagliptina), análogos del péptido 1 de tipo glucagón (tales como exenatida, liraglutida, o albiglutida), análogos de amilina (tales como pramlintida), análogos de insulina de acción rápida (tal como insulina lispro, insulina asparta e insulina glulisina), análogos de insulina de acción prolongada (tal como insulina glargina, insulina detemir), agonistas de PPAR dual (tal como aleglitazar) e inhibidores de SGLT2 (tales como dapagliflozina, remogliflozina y sergliflozina).

La diabetes de tipo 2 a menudo se asocia con la obesidad. El índice de masa corporal (IMC) (calculado como el peso en kilogramos dividido entre el cuadrado de la altura en metros) es la medición más comúnmente aceptada para el sobrepeso y/o la obesidad. Un IMC que supera el 25 se considera sobrepeso. Se define la obesidad como un IMC de 30 o más, con un IMC de 35 o más considerado como obesidad de comorbilidad grave y un IMC de 40 o más considerado obesidad mórbida. La mortalidad es elevada en la obesidad, estando un IMC de más de 32 asociado a una duplicación del riesgo de muerte. Existen alteraciones en la respuesta del cuerpo a la insulina (resistencia a la insulina), un estado proinflamatorio y una elevada tendencia a la trombosis (estado protrombótico).

La obesidad central (de tipo masculino o la obesidad que predomina en la cintura, caracterizada por una elevada proporción cintura-cadera), es un factor de riesgo particularmente importante para la diabetes y el síndrome metabólico, el agrupamiento de una serie de enfermedades y de factores de riesgo que fuertemente predisponen a la enfermedad cardiovascular. Estos son la diabetes mellitus de tipo 2, tensión arterial alta, elevado colesterol y niveles de triglicéridos en sangre (hiperlipidemia mixta).

El uso de microorganismos en el tratamiento de la obesidad, diabetes y afecciones relacionadas con la diabetes está en el conocimiento general en la materia. Por ejemplo, el documento WO 2007/043933 describe el uso de bacterias probióticas para la fabricación de alimentos y productos alimenticios, suplementos dietéticos, para controlar la ganancia de peso, prevenir la obesidad, aumentar la saciedad, prolongar la saciación, reducir la ingesta de alimento, reducir la deposición de grasas, mejorar el metabolismo energético, aumentar la sensibilidad a la insulina, tratar la obesidad y tratar la insensibilidad a la insulina.

El documento WO 2009/024429 describe el uso de una composición primaria que comprende un agente que reduce la cantidad de proteobacterias, en particular, enterobacterias y/o deferribacterias en el intestino para el tratamiento o la prevención de trastornos metabólicos, para apoyar y/o para apoyar el manejo del peso.

El documento WO 2009/004076 describe el uso de bacterias probióticas para normalizar las concentraciones de glucosa en plasma, mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir el riesgo de desarrollo en mujeres embarazadas, y prevenir la diabetes gestacional.

El documento WO 2009/021824 describe el uso de bacterias probióticas, en particular *Lactobacillus rhamnosus,* para tratar la obesidad, tratar los trastornos metabólicos y apoyar la pérdida de peso y/o el mantenimiento del peso.

El documento WO 2008/016214 describe una bacteria del ácido láctico probiótica de la cepa *Lactobacillus gasseri* BNR17 y su uso en la inhibición de la ganancia de peso.

El documento WO 02/38165 describe el uso de una cepa de *Lactobacillus* (en particular, *Lactobacillus plantarum)* en la reducción de los factores de riesgo implicados en el síndrome metabólico.

El documento WO 2002/0037577 describe el uso de microorganismos, tales como *Lactobacilli,* para el tratamiento o la prevención de la obesidad o la diabetes mellitus mediante la reducción de la cantidad de monosacárido o disacárido que se puede absorber en el cuerpo, convirtiendo tales compuestos en materiales poliméricos que no se pueden absorber por el intestino.

Lee et al., J. Appl. Microbiol. 2007, 103, 1140-1146, describe la actividad antiobesidad de la bacteria productora de ácido *trans*-10, *cis*-12 linoleico conjugado (CLA) de la cepa de *Lactobacillus plantarum* PL62 en ratones.

Li et al., Hepatology, 2003, 37(2), 343-350, describen el uso de probióticos y de anticuerpos anti-TNF en un modelo de ratón para la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención comprende una bacteria de la especie *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) para su uso en el tratamiento de una o más de las siguientes enfermedades y afecciones (a) a (g) en un mamífero:

(a) tratamiento de la diabetes;
(b) tratamiento del síndrome metabólico;
(c) tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa;
(d) normalización de la sensibilidad a la insulina;
(e) aumento de la secreción de insulina sin estar en ayunas;
(f) reducción de la secreción de insulina en ayunas;

(g) tratamiento de la obesidad, control de la ganancia de peso, inducción de la pérdida de peso, reducción de la masa de grasa corporal y/o reducción de la masa de grasa mesentérica.

En otro aspecto, la invención comprende la bacteria de la especie *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

En otro aspecto, la invención comprende la bacteria de la especie *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) para su uso en mamíferos que ingieren una dieta alta en grasas.

En un aspecto adicional, la invención comprende una *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) probiótica.

En un aspecto adicional más, la invención comprende una *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) para su uso en combinación con una bacteria adicional del género *Lactobacillus*.

En otro aspecto adicional, la invención comprende la *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) para su uso en combinación con la especie *Lactobacillus acidophilus*.

En un aspecto adicional, la invención comprende la *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) para su uso en combinación con *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM (ATCC PTA-4797).

En otro aspecto, la invención comprende la *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) en combinación con un prebiótico.

En otro aspecto, la invención comprende la *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) en combinación con el prebiótico que es polidextrosa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones C57bl6 macho adulto alimentados con una dieta alta en grasas (DAG) durante cuatro semanas o comida normal (CN);
La Figura 2 ilustra los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal cuatro semanas después del comienzo del tratamiento con probióticos en ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 3 ilustra el efecto del tratamiento con *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM (NCFM) o una combinación de las dos (B420+NCFM) sobre la masa de grasa corporal de los ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 4 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre el peso sin agua de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 5 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre el peso de la masa magra corporal de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 6 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre el peso de agua total de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 7 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre el peso del tejido adiposo subcutáneo de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 8 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre el peso del tejido adiposo mesentérico de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 9 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre el peso del hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 10 ilustra la ganancia de peso corporal antes y después del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 11 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre los niveles de insulina en ayunas y sin ayunas de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 12 ilustra el efecto del tratamiento con B420, NCFM o B420+NCFM sobre la sensibilidad de la insulina de ratones alimentados con dieta alta en grasas;
La Figura 13 ilustra las concentraciones de ARNm de citocina hepática en ratones diabéticos con DAG tratados con B420, NCFM o B420+NCFM y ratones de control alimentados con DAG;
La Figura 14 ilustra el índice inflamatorio en tejido del hígado en ratones diabéticos con DAG tratados con B420, NCFM o B420+NCFM y ratones de control alimentados con DAG;
La Figura 15 ilustra las concentraciones de ARNm de citocina de músculo esquelético en ratones diabéticos con DAG tratados con B420, NCFM o B420+NCFM y ratones de control alimentados con DAG;
La Figura 16 ilustra el índice inflamatorio de tejidos de músculo esquelético en ratones diabéticos con DAG tratados con B420, NCFM o B420+NCFM y ratones de control alimentados con DAG.
La Figura 17 ilustra las concentraciones de ARNm de citocina de tejido adiposo subcutáneo en ratones diabéticos con DAG tratados con B420, NCFM o B420+NCFM y ratones de control alimentados con DAG;
La Figura 18 ilustra el índice inflamatorio de tejidos adiposos subcutáneos en ratones diabéticos con DAG tratados con B420, NCFM o B420+NCFM y ratones de control alimentados con DAG;

La Figura 19 ilustra los niveles de glucosa en sangre de ratones alimentados con DAG tratados con B420, una combinación de B420 con polidextrosa (B420+PDX), metformina (MET) o una combinación de polidextrosa y metformina (PDX+MET) y ratones control tratados con DAG;

La Figura 20 ilustra los niveles de insulina en plasma de ratones alimentados con DAG tratados con B420, B420+PDX, MET o una combinación de B420 y metformina (B420+MET) y ratones de control tratados con DAG; y

La Figura 21 ilustra los niveles de HOMA-IR (modelo homeostático de resistencia a la insulina) de ratones alimentados con DAG tratados con B420, B420+PDX, MET, B420+MET, PDX+MET y ratones de control tratados con DAG.

Descripción detallada de la invención

Bacterias

La bacteria usada en la presente invención es una *Bifidobacterium* que generalmente se reconoce como segura y, que preferentemente está aprobada como GRAS (forma siglada de *generally recognized as safe* (considerado seguro)).

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

Las bacterias pueden comprender bacterias completas o pueden comprender componentes bacterianos. Los ejemplos de tales componentes incluyen componentes de la pared celular bacteriana tales como peptidoglicano, ácidos nucleicos bacterianos tales como ADN y ARN, componentes de membrana bacteriana y componentes estructurales bacterianos tales como proteínas, hidratos de carbono, lípidos y combinaciones de estos tales como lipoproteínas, glucolípidos y glucoproteínas.

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

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

La *Bifidobacterium* usada de acuerdo con la presente invención es una que es adecuada para el consumo humano y/o animal.

Las bacterias usadas en la presente invención son *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420). Esta cepa está comercialmente disponible de Danisco A/S.

En una realización, la bacteria usada en la presente invención es una bacteria probiótica. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'bacteria probiótica' se define como que abarca cualquier bacteria no patógena que, cuando se administra viva en cantidades adecuadas, confiere un beneficio saludable sobre el hospedador. Estas cepas probióticas generalmente tienen la capacidad de sobrevivir al paso a través de la parte superior del trato digestivo. No son patógenas, ni tóxicas y ejercen su efecto beneficioso sobre la salud, por un lado, mediante interacciones ecológicas con la flora residente en el tracto digestivo y, por otro lado, mediante su capacidad para influir en el sistema inmunitario de una forma positiva mediante el "GALT" (del inglés *gut-associated lymphoid tissue*, tejido linfoide asociado al intestino). En función de la definición de los probióticos, estas bacterias, cuando se dan en un número suficiente, tienen la capacidad de progresar vivas a través del intestino, sin embargo, no atraviesan la barrera intestinal y sus principales efectos, por lo tanto, se inducen en el lumen y/o en la pared del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, forman parte de la flora residente durante el período de administración. Esta colonización (o colonización transitoria) permite que las bacterias probióticas ejerzan un efecto beneficioso, tal como la represión microorganismos potencialmente patógenos presentes en la flora e interacciones con el sistema inmunitario del intestino.

En realizaciones preferidas, la bacteria usada en la presente invención es una *Bifidobacterium* probiótica.

En algunas realizaciones, la *Bifidobacterium* se usa en la presente invención junto con una bacteria del género *Lactobacillus*. Una combinación de bacterias de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* de acuerdo con la presente

invención presenta un efecto sinérgico en determinadas aplicaciones (es decir, un efecto que es mayor que el efecto aditivo de las bacterias cuando se usan por separado). Por ejemplo, combinaciones que, además de tener efecto en el mamífero como componentes individuales, pueden tener un efecto beneficioso en los otros componentes de la combinación, por ejemplo, produciendo metabolitos que luego se usan como fuente de energía por otros componentes de la combinación, o manteniendo condiciones fisiológicas que favorezcan a los demás componentes.

Normalmente, las bacterias *Lactobacillus* se seleccionan de las especies *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus kefiri, Lactobacillus bifidus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus sakei, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus farciminis, Lactobacillus lactis, Lactobacillus delbreuckii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paraplantarum, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus jensenii,* y combinaciones de cualquiera de las mismas.

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

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

En una realización preferida, la *Bifidobacterium* se usa en la presente invención junto con una bacteria de la especia *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM. La *Lactobacillus acidophilus* NCFM fue depositada por Rhodia Chimie, Francia, en la American Type Culture Collection como PTA-4797 el 15 de noviembre de 2002.

En una realización particularmente preferida, las bacterias usadas en la presente invención comprenden una combinación de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) y *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM (PTA-4797).

Dosificaciones

La *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420), y (si está presente) la *Lactobacillus* (tal como una cepa de *Lactobacillus acidophilus,* por ejemplo *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM) usada de acuerdo con la presente invención puede comprender de 10^6 a 10^{12} UFC de bacterias/g de soporte, y más en particular, de 10^8 a 10^{12} UFC de bacterias/g de soporte, preferentemente, de 10^9 a 10^{12} UFC/g para la forma liofilizada.

De manera adecuada, la *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420), y (si está presente) la *Lactobacillus* (tal como una cepa de *Lactobacillus acidophilus,* por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM), se pueden administrar a una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos/dosis. Mediante el término "por dosis" se refiere a que esta cantidad de microorganismo se le proporciona a un sujeto bien por día o bien por ingesta, preferentemente por día. Por ejemplo, si el microorganismo se va a administrar en un producto alimenticio (por ejemplo, en un yogur), entonces el yogur preferentemente contendrá desde aproximadamente 10^8 a 10^{12} UFC del microorganismo. Como alternativa, sin embargo, esta cantidad de microorganismo se puede repartir en múltiples administraciones que consisten cada una en una cantidad más pequeña de carga microbiana, siempre que la cantidad global de microorganismo recibida por el sujeto en cualquier momento específico (por ejemplo, cada período de 24 horas) sea de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos, preferentemente de 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos.

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

En una realización, preferentemente la *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420), y (si está presente) la *Lactobacillus* (tal como una cepa de *Lactobacillus acidophilus,* por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM), se pueden administrar a una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos/día. Por lo tanto, la cantidad eficaz en la presente realización puede ser de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismos/día.

UFC significa "unidades formadoras de colonias". Por 'soporte' se refiere al producto alimenticio, al suplemento dietético o al soporte farmacéuticamente aceptable.

Cuando las *Bifidobacterias* se usan en la presente invención junto con las *Lactobacilli*, las bacterias pueden estar presentes en cualquier proporción capaz de lograr los efectos deseados de la invención descrita en el presente

documento. Normalmente, la proporción de *Bifidobacteria* frente a *Lactobacilli* (medida en términos de unidades formadoras de colonias) está en el intervalo de 1:100 a 100:1, convenientemente 1:50 a 50:1, preferentemente 1:20 a 20:1, más preferentemente 1:10 a 10:1, aún más preferentemente de 1:5 a 5:1, todavía más preferentemente 1:3 a 3:1 e incluso más preferentemente 1:2 a 2:1 y lo más preferentemente 1:1,5 a 1,5:1. En un ejemplo particular, la proporción de *Bifidobacteria* frente a *Lactobacilli* es 1:1.

En particular, cuando las bacterias de *Bifidobacteria animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) se usan en la presente invención junto con las bacterias *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM, las bacterias pueden estar presentes en cualquier proporción capaz de lograr los efectos deseados de la invención descrita en el presente documento. Normalmente, la proporción de *Bifidobacteria animalis* subesp. *lactis* cepa 420 frente a *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM (medida en términos de unidades formadoras de colonias) está en el intervalo de 1:100 a 100:1, convenientemente 1:50 a 50:1, preferentemente 1:20 a 20:1, más preferentemente 1:10 a 10:1, aún más preferentemente de 1:5 a 5:1, todavía más preferentemente 1:3 a 3:1 e incluso más preferentemente 1:2 a 2:1 y lo más preferentemente 1:1,5 a 1,5:1. En un ejemplo particular, la proporción de *Bifidobacteria animalis* subesp. *lactis* cepa 420 frente a *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM es 1:1.

Sujetos / *Indicaciones médicas*

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

Las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) a las que se refiere la presente invención pueden ser adecuadas para el tratamiento de una serie de enfermedades o afecciones en mamíferos (en particular, seres humanos). En la presente memoria descriptiva, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a cualquier administración de las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) de acuerdo con la presente invención e incluye: (1) evitar que la enfermedad especificada tenga lugar en un mamífero que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o presenta la patología o la sintomatología de la enfermedad (incluyendo la prevención de uno o más factores de riesgo asociados con la enfermedad); (2) inhibir la enfermedad en un mamífero que está experimentando o presentando la patología o la sintomatología de la enfermedad (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o de la sintomatología), o (3) aliviar la enfermedad en un mamífero que está experimentando o presentando la patología o la sintomatología de la enfermedad (es decir, revertir la patología y/o la sintomatología).

Las *Bifidobacteria* a las que se refiere la presente invención son adecuadas para la administración a mamíferos tanto diabéticos como obesos. También podrían ser adecuados para mamíferos diabéticos y no obesos, así como para mamíferos obesos que tienen factores de riesgo de diabetes, pero que todavía no son diabéticos. Este aspecto se trata a continuación con más detalle.

En particular, el uso de las *Bifidobacteria* de acuerdo con la presente invención es adecuado para el tratamiento de mamíferos que ingieren una dieta alta en grasas. Este aspecto se trata a continuación con más detalle.

Tal como se describe en más detalle en los ejemplos a continuación, las *Bifidobacteria* usadas en la presente invención tienen una serie de actividades biológicas. En particular, las *Bifidobacteria* usadas en la presente invención son capaces de normalizar la sensibilidad a la insulina, aumentar la secreción de insulina sin ayunas, reducir la secreción de insulina en ayunas, mejorar la tolerancia a la glucosa en un mamífero. Estos efectos confieren el potencial para su uso en el tratamiento de la diabetes y de las afecciones relacionadas con la diabetes (en particular, diabetes de tipo 2 y tolerancia alterada a la glucosa).

En particular, tal como se describe en más detalle en los ejemplos a continuación, las *Bifidobacteria* usadas en combinación con las bacterias de *Lactobacillus* (en particular, bacterias de *Lactobacillus acidophilus*) de acuerdo con la presente invención tienen una serie de actividades biológicas. En particular, las *Bifidobacteria* usadas en la presente invención son capaces de aumentar la secreción de insulina sin ayunas y de mejorar la tolerancia a la glucosa en un mamífero. Estos efectos confieren el potencial para su uso en el tratamiento de la diabetes y de las afecciones relacionadas con la diabetes (en particular, diabetes de tipo 2 y tolerancia alterada a la glucosa).

En la presente memoria descriptiva, el término 'diabetes' incluye todas las formas de diabetes que, tal como se ha señalado anteriormente, se caracterizan por un trastorno metabólico y azúcar en sangre anómalamente alto (hiperglucemia) que es resultado de niveles insuficientes de la hormona insulina. El término, por lo tanto, incluye la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional y la tolerancia alterada a la glucosa. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por la pérdida de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que lleva a una deficiencia de insulina. La diabetes mellitus de tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina o sensibilidad reducida a la insulina, combinada con la secreción reducida de insulina. La diabetes gestacional formalmente se define como "cualquier grado de intolerancia a la glucosa con aparición o primer

reconocimiento durante el embarazo". La tolerancia alterada a la glucosa (TAG) es un estado prediabético de disglucemia que se asocia con la resistencia a la insulina y el elevado riesgo de patología cardiovascular. De acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud y la Asociación Americana de Diabetes, la tolerancia alterada a la glucosa se define como los niveles de glucosa de 140 a 199 mg por dl (7,8 a 11,0 mmol) a las dos horas tras la prueba de tolerancia a la glucosa oral de 75 g. Se dice que un paciente tiene la afección de TAG cuando él/ella tiene un nivel de glucosa elevado de manera intermedia tras 2 horas, pero menos de lo que lo calificaría como diabetes mellitus de tipo 2. La glucosa en ayunas puede ser o normal o bien moderadamente elevada. La TAG puede preceder a la diabetes mellitus de tipo 2 por muchos años. La TAG también es un factor de riesgo de mortalidad.

Además, las *Bifidobacteria* usadas en la presente invención son capaces de inducir pérdida de peso y de reducir la masa de la grasa corporal (en particular, la masa de grasa mesentérica). Estos efectos confieren el potencial para su uso en el tratamiento de la obesidad y el control de la ganancia de peso y/o la inducción de pérdida de peso en un mamífero.

En particular, tal como se describe en más detalle en los ejemplos a continuación, las *Bifidobacteria* usadas en combinación con las bacterias de *Lactobacillus* (en particular, las bacterias de *Lactobacillus acidophilus*) de acuerdo con la presente invención son capaces de inducir la pérdida de peso y de reducir la masa de grasa corporal (en particular, la masa de grasa mesentérica). Estos efectos confieren el potencial para su uso en el tratamiento de la obesidad y el control de la ganancia de peso y/o la inducción de pérdida de peso en un mamífero.

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

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

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

Además, las *Bifidobacteria* usadas en la presente invención se pueden usar para el tratamiento del síndrome metabólico en un mamífero. El síndrome metabólico es una combinación de trastornos médicos que aumentan el riesgo de desarrollo de una enfermedad cardiovascular y diabetes. El síndrome metabólico también se conoce como síndrome X metabólico, síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven y CHAOS (Australia).

Actualmente no hay una única definición aceptada de síndrome metabólico. Los criterios de la Organización Mundial de la Salud (1999) requieren la presencia de diabetes mellitus, tolerancia alterada a la glucosa, glucosa en ayunas alterada o resistencia a la insulina, Y dos de las siguientes:

presión arterial: ≥ 140/90 mm de Hg
dislipidemia: triglicéridos (TG): ≥ 1,695 mmol/l colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) ≤ 0,9 mmol/l (hombres), ≤ 1,0 mmol/l (mujeres)
obesidad central: proporción cintura:cadera > 0,90 (hombres); > 0,85 (mujeres), y/o índice de masa corporal > 30 kg/m^2
proporción de microalbuminuria: excreción de albúmina urinaria ≥ 20 mg/min o proporción albúmina: creatinina ≥ 30 mg/g.

El Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (1999) requiere que resistencia a la insulina se defina como el 25% más alto de los valores de insulina en ayunas entre personas no diabéticas Y dos o más de los siguientes:

obesidad central: circunferencia de la cintura ≥ 94 cm (hombres), ≥ 80 cm (mujeres)
dislipidemia: TG ≥ 2,0 mmol/l y/o HDL-C < 1,0 mg/dl o tratado para la dislipidemia
hipertensión: presión arterial ≥ 140/90 mm de Hg o glucosa en plasma en ayunas con medicación antihipertensiva ≥ 6,1 mmol/l

El III Panel de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol de los Estados Unidos (NCEP) (2001) requiere al menos tres de los siguientes:

obesidad central: circunferencia de la cintura ≥ 102 cm o 40 pulgadas (hombres), ≥ 88 cm o 36 pulgadas (mujeres)
dislipidemia: TG ≥ 1,695 mmol/l (150 mg/dl)
dislipidemia: HDL-C < 40 mg/dl (hombres), < 50 mg/dl (mujeres)
presión arterial ≥ 130/85 mm de Hg
glucosa en plasma en ayunas ≥ 6,1 mmol/l (110 mg/dl)

En aspectos adicionales, las *Bifidobacteria* (y, si están presentes, las *Lactobacilli*) usadas en la presente invención se pueden usar para reducir la inflamación de tejidos (en particular, aunque no exclusivamente, la inflamación del tejido hepático, inflamación del tejido muscular y/o inflamación del tejido adiposo) en un mamífero.

En un aspecto, las *Bifidobacteria* (y, si están presentes, las *Lactobacilli*) usadas en la presente invención se pueden usar para reducir la inflamación del tejido hepático. Esto confiere el potencial para la aplicación de las bacterias en el tratamiento de la hepatitis, la cual se caracteriza por la destrucción de una serie de células hepáticas y la presencia de células inflamatorias en el tejido hepático.

La hepatitis se puede dividir en dos subgrupos de acuerdo con su duración: hepatitis aguda (que dura menos de seis meses) y hepatitis crónica (que dura más de seis meses). La hepatitis también se puede clasificar de acuerdo con su causa: por ejemplo, la hepatitis puede comprender hepatitis vírica infecciosa (tal como hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E), hepatitis provocada por otras enfermedades víricas (tales como mononucleosis y citomegalovirus), hepatitis provocada por infecciones bacterianas graves o infecciones amébicas, hepatitis provocada por medicinas, hepatitis provocada por toxinas tales como el alcohol, hepatitis autoinmunitaria (en la cual una serie de células hepáticas son destruidas por el propio sistema inmunitario del paciente) y hepatitis provocada por trastornos metabólicos congénitos tales como la enfermedad de Wilson (trastorno del metabolismo del cobre del cuerpo) y hemocromatosis (trastorno del metabolismo del hierro del cuerpo).

En un aspecto, las *Bifidobacteria* (y, si están presentes, las *Lactobacilli*) usadas en la presente invención se pueden usar para reducir la inflamación del tejido muscular. Esto confiere el potencial para la aplicación de las bacterias en el tratamiento de la miositis, en la que las fibras musculares y la piel se inflaman y se dañan, lo cual da como resultado debilidad muscular.

Existen varios tipos de miositis que pueden afectar a diferentes partes del cuerpo. Las formas particulares de miositis que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen: polimiositis (PM) (en la que se inflaman los músculos en muchas partes del cuerpo y especialmente las partes más cercanas al tronco); dermatomiositis (DM) (la cual afecta tanto a las fibras musculares como a la piel dañando los capilares que suministran sangre al músculo y a la piel), miositis por cuerpos de inclusión (MCI), la cual se caracteriza por un debilitamiento gradual de los músculos en todo el cuerpo, incluidas las muñecas o los dedos, el desarrollo de disfagia y atrofia de los antebrazos y/o los músculos de los muslos; y miositis juvenil (MJ), la cual implica debilitamiento muscular, sarpullido en la piel y disfagia en niños.

Los inventores de la presente han descubierto sorprendentemente que las *Bifidobacteria* (y, si están presentes, las *Lactobacilli*) a las cuales se refiere la presente invención son capaces de reducir la inflamación del tejido adiposo en mamíferos. Existen evidencias epidemiológicas en la bibliografía que muestran una correlación estadística entre la inflamación, la obesidad y la resistencia a la insulina en seres humanos (Cani et al., *Diabetes*, **2007**, *56*, 1761-1772 y las referencias citadas en este). Por consiguiente, este descubrimiento confiere el potencial para que las *Bifidobacteria* (y, si están presentes, las *Lactobacilli*) sean útiles en el tratamiento de la obesidad, la diabetes y afecciones relacionadas, enfermedades metabólicas y consecuencias cardiovasculares en mamíferos.

De acuerdo con Berg y Scherer, *Circulation Research*, **2005**, *96*, 939, evidencias recientes destacan el papel del tejido adiposo en el desarrollo de un estado inflamatorio sistémico que contribuye al riesgo cardiovascular y la vasculopatía que se asocian con la obesidad. Los mediadores en circulación de la inflamación participan en los mecanismos del traumatismo vascular y el cambio ateromatoso, y muchas de estas proteínas inflamatorias se secretan directamente a partir de macrófagos derivados de tejido adiposo y adipocitos. Se han identificado varios factores que relacionan la obesidad con un mayor riesgo cardiovascular. La proteína secretora de adipocitos específica adiponectina es un candidato particularmente prometedor en este contexto. Sus niveles están reducidos en la obesidad.

La supresión dirigida de varias cascadas proinflamatorias en los adipocitos representa específicamente una nueva oportunidad terapéutica para el área de las enfermedades cardiovasculares. Por consiguiente, cabría esperar que la supresión de la inflamación del tejido adiposo proporcionara un beneficio terapéutico en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Algunos ejemplos de enfermedades cardiovasculares que se pueden tratar mediante el uso de las *Bifidobacteria* (y, si están presentes, las *Lactobacilli*) de acuerdo con la presente invención incluyen aneurisma, angina, aterosclerosis, accidente cerebrovascular (embolia), enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), arteriopatía coronaria, infarto de miocardio (ataque al corazón) y enfermedad vascular periférica.

Un aneurisma es una dilatación localizada llena de sangre (bulto similar a un globo) de un vaso sanguíneo provocada por una enfermedad o debilitamiento de la pared del vaso. Las aneurismas se producen de la forma más habitual en las arterias de la base del cerebro (el círculo de Willis) y en la aorta (la arteria principal que sale del corazón, el denominado aneurisma aórtico). A medida que se incrementa el tamaño del aneurisma, existe un mayor riesgo de ruptura, que puede provocar una hemorragia grave u otras complicaciones, incluido un fallecimiento repentino.

La angina de pecho, conocida habitualmente como angina, consiste en un dolor intenso del pecho debido a la isquemia (una falta de suministro de sangre, y por lo tanto, de oxígeno) del músculo del corazón, que por lo general se debe a la obstrucción o espasmo de las arterias coronarias (los vasos sanguíneos del corazón). La arteriopatía coronaria, la principal causa de la angina, se debe a la aterosclerosis de las arterias cardíacas.

La aterosclerosis es una afección en la que una pared de la arteria se espesa como resultado de la acumulación de materiales grasos tales como el colesterol. Es un síndrome que afecta a los vasos sanguíneos arteriales. Es una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias, debida en gran parte a la acumulación de glóbulos blancos macrófagos y propiciada por lipoproteínas (proteínas del plasma portadoras de colesterol y triglicéridos) de baja densidad (especialmente partículas pequeñas) sin la eliminación adecuada de las grasas y el colesterol a partir de los macrófagos por parte de las lipoproproteínas funcionales de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés). Habitualmente se hace referencia a esta como un endurecimiento o revestimiento de las arterias. Está provocada por la formación de múltiples placas dentro de las arterias.

Un accidente cerebrovascular consiste en la pérdida de función o funciones cerebrales que se desarrolla rápidamente debida a una alteración en el suministro sanguíneo del cerebro. Esto se puede deber a una isquemia (falta de suministro sanguíneo) provocada por una trombosis o embolia o debida a una hemorragia. Como resultado, el área afectada del cerebro es incapaz de funcionar, lo cual conlleva una incapacidad para mover uno o más miembros en un lado del cuerpo, una incapacidad para comprender o formular un discurso o para ver un lado del campo visual y en última estancia el fallecimiento.

Las enfermedades cerebrovasculares consisten en un grupo de disfunciones cerebrales relacionadas con una enfermedad de los vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro. La hipertensión es la causa más importante que daña el endotelio que reviste los vasos sanguíneos, con lo que se expone el colágeno subyacente donde las plaquetas se agregan para iniciar un proceso de reparación que no siempre es completo y perfecto. Una hipertensión sostenida cambia de forma permanente la arquitectura de los vasos sanguíneos y los hace más delgados, rígidos, deformados e irregulares, con lo que son más vulnerables a las fluctuaciones de la presión sanguínea. Una caída de la presión sanguínea cuando se está durmiendo puede conllevar una reducción marcada del flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos estrechados, provocando un accidente cerebrovascular isquémico por la mañana, mientras que un aumento repentino de la presión sanguínea puede provocar la rotura de los vasos sanguíneos, lo que originaría una hemorragia intracraneal durante un momento de excitación por el día. La gente que padece enfermedades cerebrovasculares son principalmente personas de la tercera edad, diabéticas, fumadores o que padecen una enfermedad cardíaca isquémica. Todas las enfermedades relacionadas con una disfunción arterial se pueden clasificar como una enfermedad conocida como enfermedad macrovascular. Este es un estudio simplista mediante el cual las arterias son bloqueadas por depósitos grasos o por un coágulo de sangre. Los resultados de una enfermedad cerebrovascular pueden incluir un accidente cerebrovascular o incluso a veces un accidente cerebrovascular hemorrágico. La isquemia u otras disfunciones de los vasos sanguíneos pueden afectar a uno durante un accidente cerebrovascular.

La insuficiencia cardíaca es una expresión global para el estado fisiológico en el que la respuesta cardíaca es insuficiente para las necesidades del cuerpo. Esto puede ocurrir cuando la respuesta cardíaca es baja (lo que se denomina a menudo “insuficiencia cardíaca congestiva”). Las causas habituales de la insuficiencia cardíaca incluyen el infarto de miocardio y otras formas de enfermedad cardíaca isquémica, hipertensión, enfermedad cardiaca valvular y cardiomiopatía.

La enfermedad coronaria (o enfermedad cardíaca coronaria) se refiere a una insuficiencia de la circulación coronaria a la hora de suministrar una circulación adecuada al músculo cardíaco y el tejido circundante. De la manera más habitual se equipara con la arteriopatía coronaria aterosclerótica, pero la enfermedad coronaria puede ser debida a otras causas tales como un vasoespasmo coronario. Es posible que la estenosis sea provocada por el espasmo.

El infarto de miocardio, conocido comúnmente como ataque al corazón, se produce cuando el suministro sanguíneo se interrumpe en una parte del corazón, lo que provoca que algunas células del corazón mueran. Esto se debe de la manera más habitual a la oclusión (bloqueo) de una arteria coronaria tras la ruptura de una placa aterosclerótica vulnerable, que es una acumulación inestable de lípidos (como el colesterol) y glóbulos blancos (especialmente

macrófagos) en la pared de un arteria. La isquemia (restricción del suministro sanguíneo) y la falta de oxígeno resultantes, si no se trata durante un periodo suficiente de tiempo, pueden provocar daños y/o la muerte (infarto) del tejido muscular del corazón (miocardio).

La enfermedad vascular periférica (EVP), también conocida como arteriopatía periférica (AP) o arteriopatía oclusiva periférica (AOP), incluye todas las enfermedades provocadas por la obstrucción de arterias grandes en los brazos y las piernas. La EVP puede ser el resultado de aterosclerosis, procesos inflamatorios que conducen a estenosis, una embolia o formación de trombos. Provoca isquemia (falta de suministro sanguíneo) crónica o aguda, habitualmente en las piernas.

Se contempla dentro del alcance de la presente invención que las realizaciones de la invención se pueden combinar de modo que se incluyan combinaciones de cualquiera de las características descritas en la presente dentro del alcance de la presente invención. En particular, se contempla dentro del alcance de la presente invención que cualquiera de los efectos terapéuticos de las bacterias se puedan exhibir de forma concomitante.

Dieta

Tal como se ha señalado anteriormente, los mamíferos diabéticos y/u obesos tratados con bacterias de acuerdo con la presente invención pueden ingerir una dieta alta en grasas mientras mitigan las consecuencias metabólicas de su(s) afección(es). En la presente memoria descriptiva, el término 'dieta alta en grasas' se refiere a una dieta que generalmente contiene al menos el 20 %, preferentemente al menos el 25 %, tal como al menos el 30%, por ejemplo, al menos el 35 %, tal como al menos el 40 %, por ejemplo, al menos el 45 %, tal como al menos el 50 %, por ejemplo, al menos el 55 %, tal como al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, tal como al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 75 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, tal como al menos el 90 % de calorías de la grasa.

En algunas realizaciones, los mamíferos tratados con bacterias de acuerdo con la presente invención pueden ingerir una dieta baja en hidratos de carbono durante el trascurso del tratamiento. En la presente memoria descriptiva, la expresión 'la dieta baja en hidratos de carbono' se refiere a una dieta que generalmente no contiene más del 50 %, tal como no más del 45 %, por ejemplo no más del 40 %, tal como no más del 35 %, por ejemplo no más del 30 %, tal como no más del 25 %, por ejemplo no más del 20 %, tal como no más del 15 %, por ejemplo no más del 10 %, tal como no más del 5 %, por ejemplo no más del 2 %, tal como no más del 1 %, por ejemplo no más del 0,5 %, tal como no más del 0,2 % de calorías de los hidratos de carbono.

Composiciones

Aunque es posible administrar las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) solo de acuerdo con la presente invención (es decir, sin ningún soporte, diluyente o excipiente), las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las bacterias *Lactobacilli*) normalmente y preferentemente se administran sobre o dentro de un soporte como parte de un producto, en particular, como un componente de un producto alimenticio, un suplemento dietético o una formulación farmacéutica. Estos productos típicamente contienen componentes adicionales bien conocidos para los expertos en la materia.

Cualquier producto que se puede beneficiar de la composición de puede usar en la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a alimentos, particularmente conservas de frutas y productos lácteos y productos derivados de productos lácteos, y productos farmacéuticos. Las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli)* se pueden citar en el presente documento como "la composición de la presente invención" o "la composición".

Alimentos

En una realización, las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las bacterias de *Lactobacilli*) se emplean de acuerdo con la invención en un producto alimenticio tal como un suplemento alimenticio, una bebida o un polvo a base de leche. En el presente documento, el término "alimento" se usa en sentido amplio y abarca alimentos para seres humanos así como alimentos para animales (es decir, un pienso). En un aspecto preferente, el alimento es para el consumo humano.
El alimento puede estar en la forma de una solución o como un sólido, en función del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

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

A modo de ejemplo, la composición de la presente invención se puede usar como un ingrediente para bebidas sin alcohol, un zumo de frutas o una bebida que comprenda proteína del suero, tés sanos, bebidas de cacao, bebidas de leche y bebidas de bacterias del ácido láctico, yogur y yogur para beber, queso, helado, polos y postres,

confitería, bizcochos y mezclas para pasteles, aperitivos, alimentos y bebidas equilibrados, rellenos de frutas, glaseado de tartas, relleno de repostería de chocolate, relleno de sabor a tarta de queso, relleno de tartas de sabor a fruta, glaseado de pastel y de rosquillas, cremas instantáneas de relleno para repostería, rellenos para galletas, relleno de repostería listo para usar, relleno bajo en calorías, bebida nutricional para adultos, bebida acidificada de soja/zumo, bebida de chocolate aséptica/esterilizada en el envase, mezclas de frutos secos, polvos de bebidas, chocolate con leche y soja enriquecido en calcio, bebida de café enriquecida en calcio.

La composición se puede usar adicionalmente como un ingrediente en productos alimenticios tales como salsa de queso americana, agente antiaglomerante para queso rallado y triturado, salsa para nachos, queso de crema, crema agria sin grasa para poner encima de postres, crema de leche para postres para congelar/descongelar, *topping* para postres estable a congelación/descongelación, queso cheddar natural ligero y bajo en grasas, yogur estilo suizo bajo en grasas, y postres congelados aireados, helado de consistencia compacta, helado de consistencia compacta con etiqueta de confianza y precio asequible, helado de consistencia cremosa, salsa barbacoa, salsa de queso para nachos, aderezo de requesón, mezcla seca de salsa Alfredo, salsa de mezcla de quesos, salsa de mezclas de tomate y otros.

El término "producto lácteo" tal como se usa en el presente documento se refiere a que incluye un medio que comprende leche de origen animal y/o vegetal. Como leche de origen animal se puede mencionar la de las vacas, la de las ovejas, la de las cabras o la de los búfalos. Como leche de origen vegetal se puede mencionar cualquier sustancia fermentable de origen vegetal que se puede usar de acuerdo con la invención, en particular, originaria de la soja, del arroz o de los cereales.

Aún más preferentemente, el producto alimenticio empleado de acuerdo con la invención es una leche fermentada o leche humanizada.

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

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

La presente invención también proporciona un método un alimento o un producto alimenticio, comprendiendo el método la mezcla de la composición de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente alimenticio.

Ventajosamente, la presente invención se refiere a productos que se han puesto en contacto con la composición de la presente invención (y opcionalmente con otros componentes/ingredientes), en los que se usa la composición en una cantidad que es capaz de mejorar los beneficios nutritivos y/o saludables del producto.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "en contacto" se refiere a la aplicación indirecta o directa de la composición de la presente invención al producto. Los ejemplos de los métodos de aplicación que se pueden usar, incluyen, pero sin limitación, el tratamiento del producto en un material que comprende la composición, la aplicación directa mezclando la composición con el producto, el pulverizado de la composición sobre la superficie del producto o impregnar el producto en una preparación de la composición.

Cuando el producto de la invención es un producto alimenticio, la composición de la presente invención preferentemente se mezcla con el producto. Como alternativa, la composición se puede incluir en la emulsión o las materias primas de un producto alimenticio. En una alternativa adicional, la composición se puede aplicar como un sazonador, un glaseado, una mezcla de colorantes y similares.

Para algunas aplicaciones, es importante que la composición esté disponible en o sobre la superficie de un producto para ser afectado/tratado. Esto permite que la composición proporcione uno o más de las siguientes características favorables: beneficios nutritivos y/o saludables.

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para intercalar, recubrir y/o impregnar un producto con una cantidad controlada de un microorganismo.

Preferentemente, la composición se usa para fermentar leche o leche enriquecida en sacarosa o medio láctico con sacarosa y/o maltosa en donde el medio resultante que contiene todos los componentes de la composición, es decir, dicho microorganismo de acuerdo con la presente invención, se puede añadir como un ingrediente a la leche de yogur en concentraciones adecuadas, tal como por ejemplo en concentraciones en el producto final que ofrezcan una dosis diaria de 10^6-10^{10} ufc. El microorganismo de acuerdo con la presente invención se puede usar antes o después de la fermentación del yogur.

Para algunos aspectos, los microorganismos de acuerdo con la presente invención se usan como, o en la preparación de, piensos para animales, tales como piensos de ganado, en particular, piensos de aves de corral (tales como gallinas) o alimento para mascotas.

Ventajosamente, cuando el producto es un producto alimenticio, las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) deberían permanecer eficaz hasta la fecha normal de "límite de venta" o de "caducidad", período durante el cual el producto alimenticio se ofrece a la venta por el minorista.

Preferentemente, el tiempo eficaz debería sobrepasar tales fechas hasta el período de frescura normal, cuando el deterioro del alimento se hace evidente. La duración deseada y la vida útil normal variarán de un alimento a otro y los expertos en la materia reconocerán que los tiempos de vida útil variarán según el tipo de producto alimenticio, el tamaño del producto alimenticio, las temperaturas del almacenamiento, las condiciones del procesamiento, el material de envasado y el equipo de envasado.

Ingrediente alimenticio

La composición de la presente invención se puede usar como ingrediente alimenticio y/o ingrediente para piensos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ingrediente alimenticio" o "ingrediente para piensos" incluye una formulación que está o se puede añadir a alimentos funcionales o a productos alimenticios como suplemento nutricional.

El ingrediente alimenticio puede estar en a forma de una solución o como un sólido, en función del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Suplementos alimenticios

La composición de la presente invención puede estar - o se puede añadir a - los suplementos alimenticios (también citados en el presente documento como suplementos dietéticos).

Alimentos funcionales

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

Tal como se usa en el presente documento, el término "alimento funcional" se refiere a un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional, sino que también es capaz de administrar un efecto beneficioso adicional al consumidor.

Por consiguiente, los alimentos funcionales son alimentos comunes que tienen componentes o ingredientes (tales como los descritos en el presente documento) incorporados a ellos que proporcionan al alimento una función específica, por ejemplo, un beneficio médico o fisiológico que no sea un efecto puramente nutritivo.

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

Algunos alimentos funcionales son los nutracéuticos. En el presente documento, el término "nutracéutico" se refiere a un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o una satisfacción del gusto, sino que también es capaz de administrar un efecto terapéutico (u otro beneficio) al consumidor. Los nutracéuticos cruzan las líneas divisorias tradicionales entre los alimentos y las medicinas.

Medicamento

El término "medicamento" tal como se usa en el presente documento abarca medicamentos tanto para uso humano como para uso animal en medicina humana y veterinaria. Además, el término "medicamento" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que proporciona un efecto terapéutico y/o beneficioso. El término "medicamento" tal como se usa en el presente documento no se limita necesariamente a las sustancias que requieren la aprobación comercial, sino que pueden incluir sustancias que se pueden usar en cosméticos, nutracéuticos, alimentos (incluyendo piensos y bebidas, por ejemplo), cultivos probióticos, y remedios naturales. Además, el término "medicamento" tal como se usa en el presente documento, abarca un producto diseñado para la incorporación en piensos de animales, por ejemplo, pienso para ganado y/o alimento para mascotas.

Producto farmacéutico

La composición de la presente invención se puede usar como, o en la preparación de, un producto farmacéutico. En el presente documento, la expresión "producto farmacéutico" se usa en sentido amplio, y abarca productos

farmacéuticos para seres humanos, así como productos farmacéuticos para animales (es decir, aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferente, el producto farmacéutico es para uso humano y/o para ganadería.

El producto farmacéutico puede ser para fines terapéuticos, que pueden ser de naturaleza curativa o paliativa o preventiva. El producto farmacéutico puede ser incluso para fines de diagnóstico.

Un soporte farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, un soporte en la forma de tabletas comprimidas, comprimidos, cápsulas, pomadas, supositorios y soluciones bebibles. Otras formas adecuadas se proporcionan a continuación.

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

El producto farmacéutico puede estar en la forma de una solución o como un sólido, en función del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) de la presente invención se pueden usar como ingredientes farmacéuticos. En el presente documento, la composición puede ser el único componente activo o puede ser al menos uno de una serie (es decir, 2 o más) de componentes activos.

El ingrediente farmacéutico puede estar en la forma de una solución o como un sólido, en función del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) se pueden usar de acuerdo con la presente invención en cualquier forma adecuada, tanto solas como cuando están presentes en una combinación con otros componentes o ingredientes. Las bacterias del ácido láctico usadas en la presente invención se pueden citar en el presente documento como "la composición". Del mismo modo, las combinaciones que comprenden la composición de la presente invención y otros componentes y/o ingredientes (es decir, ingredientes tales como ingredientes alimenticios, ingredientes de alimentos funcionales o ingredientes farmacéuticos) se pueden usar en cualquier forma adecuada.

Las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) se pueden usar de acuerdo con la presente invención en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de las mismas. Los ejemplos de las preparaciones sólidas incluyen, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, polvos finos, gránulos y polvos que se pueden ser humectables, secados por pulverización o liofilizados. Los ejemplos de las preparaciones líquidas incluyen, pero sin limitación, soluciones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas, suspensiones y emulsiones.

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

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

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

Los excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.
Para las suspensiones acuosa y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con emulsionates y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina y combinaciones de los mismos.

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

Los ejemplos adicionales de la forma incluyen cremas. Para algunos aspectos, los microorganismos usados en la presente invención se pueden usar en productos farmacéuticos y/o cremas cosméticas tales como cremas solares o y/o cremas de *after-sun*, por ejemplo.

En un aspecto, la composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar en un aerosol, por ejemplo, a modo de un pulverizador nasal, por ejemplo para la administración al tracto respiratorio.

Combinaciones

La composición de la presente invención puede contener adicionalmente uno o más prebióticos. Los prebióticos son una categoría de alimento funcional, definido como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera beneficiosa al hospedador estimulando de manera selectiva el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias (en particular, aunque no en exclusiva, probióticos, *Bifidobacteria* y/o bacterias del ácido láctico) en el colon y, por lo tanto, mejoran la salud del hospedador. Normalmente, los prebióticos son hidratos de carbono (tales como oligosacáridos), pero la definición no excluye a los no hidratos de carbono. Las formas más prevalentes de prebióticos se clasifican nutricionalmente como fibra soluble. Hasta cierto punto, muchas formas de fibra dietética presentan algún nivel de efecto prebiótico.

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

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

Los ejemplos de fuentes dietéticas de prebióticos incluyen la soja, fuentes de inulina (tales como la alcachofa de Jerusalén, la jicama y la raíz de chicoria), avena cruda, trigo sin refinar, cebada sin refinar y yacon.

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

En algunas realizaciones, una combinación de bacterias de *Bifidobacterium* (y, si está presente, de *Lactobacillus*) y de prebióticos de acuerdo con la presente invención presenta un efecto sinérgico en determinadas aplicaciones (es decir, un efecto que es mayor que el efecto aditivo de las bacterias cuando se usan por separado). Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que tal combinación es capaz de estimular de manera selectiva el crecimiento y/o la actividad de las bacterias *Bifidobacteria* (y si está presente, las *Lactobacilli*) en el colon y, por lo tanto, mejoran la salud del hospedador.

En un aspecto, las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) se pueden usar de acuerdo con la presente invención en combinación con uno o más fármacos antidiabetes. Los ejemplos de los fármacos antidiabetes orales que se pueden usar en tal combinación incluyen las biguanidas (tales como metformina), sulfonilureas (tales como carbutamida, clorpropamida, glibenclamida (Glyburide™), gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, tolazamida o tolbutamida), inhibidores de alfa-glucosidasa (tales como acarbosa, miglitol o voglibosa), tiazolidinodionas (TZD) (tales como pioglitazona, rivoglitazona o rosiglitazona), meglitinidas (tales como nateglinida, repaglinida o mitiglinida), inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (tales como alogliptina, saxagliptina, sitagliptina o vildagliptina), análogos del péptido 1 de tipo glucagón (tales como exenatida, liraglutida, o albiglutida), análogos de amilina (tales como pramlintida), análogos de insulina de acción rápida (tal como insulina lispro, insulina asparta e insulina glulisina), análogos de insulina de acción prolongada (tal como insulina glargina, insulina detemir), agonistas de PPAR dual (tal como aleglitazar) e inhibidores de SGLT2 (tales como dapagliflozina, remogliflozina y sergliflozina). Un ejemplo particularmente preferido es metformina.

La dosificación, el modo de administración y la formulación de los fármacos antidiabetes anteriores para su uso en la combinación de la presente invención serán fácilmente evidentes para un experto en la materia. De manera adecuada, el fármaco antidiabetes se puede usar de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 1 □ a 10 g / día, preferentemente de 10 □ a 5 g / día, más preferentemente de 0,1 mg a 2 g / día. En una realización, el fármaco antidiabetes se puede usar de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 1 mg a 1 g / día, preferentemente, de 5 a 500 mg / día.

En un aspecto, las *Bifidobacteria* (y, si está presente, las *Lactobacilli*) se pueden usar de acuerdo con la presente invención en combinación tanto con un prebiótico (tal como se describe y se ejemplifica anteriormente) y un fármaco antidiabetes (tal como se describe y se ejemplifica anteriormente).

Preferentemente, las *Bifidobacterium* usadas en la combinación (con un prebiótico, un fármaco antidiabetes, o ambos) es de la especie *Bifidobacterium animalis.* Más preferentemente, la *Bifidobacterium* usada en la combinación es de la especie *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis*. En una realización particularmente preferida, las bacterias usadas en la combinación son *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420).

De manera adecuada, el prebiótico usado en la combinación es polidextrosa.

De manera adecuada, el fármaco antidiabetes usado en la combinación es metformina.

En un aspecto particularmente preferido, las bacterias usadas en la combinación son *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420), el prebiótico es polidextrosa y el fármaco antidiabetes es metformina.

En otro aspecto, se puede usar un prebiótico de acuerdo con la presente invención en combinación con un fármaco antidiabetes, pero en la ausencia de *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* u otras bacterias usadas en las otras realizaciones de la invención.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención comprende una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos.

En otro aspecto más, la invención comprende un producto alimenticio o intermediario de producto alimenticio que incluye un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos.

En otro aspecto más, la invención comprende una composición farmacéutica que comprende un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o un medicamento para el tratamiento de la diabetes (preferentemente pero no exclusivamente diabetes de tipo 2) en un mamífero.

En otro aspecto, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento para el tratamiento de tolerancia alterada a la glucosa en un mamífero.

En un aspecto adicional, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento para normalizar la sensibilidad a la insulina en un mamífero.

En otro aspecto más, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento para aumentar la secreción de insulina sin ayunas en un mamífero.

Aún en un aspecto adicional, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento para reducir la secreción de insulina en ayunas en un mamífero.

En un aspecto adicional, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento para mejorar la tolerancia alterada a la glucosa en un mamífero.

En otro aspecto más, la invención comprende el uso de una combinación de un prebiótico o una mezcla de los mismos y un fármaco antidiabetes o una mezcla de los mismos en la fabricación de un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento para el tratamiento del síndrome metabólico en un mamífero.

En el presente aspecto, los ejemplos de los prebióticos adecuados que se pueden usar en tal combinación incluyen alginato, xantano, pectina, goma garrofín (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), polidextrosa (es decir, Litesse®), lactitol, lactosacarosa, oligosacáridos de soja, isomaltulosa (Palatinose™), isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, manno-oligosacáridos, beta-glucanos, celobiosa, rafinosa, gentiobiosa, melibiosa, xilobiosa, ciclodextrinas, isomaltosa, trehalosa, estaquiosa, panosa, pululano, verbascosa, galactomannanos, y todas las formas de almidones resistentes. Un ejemplo particularmente preferido de un prebiótico es polidextrosa.

En el presente aspecto, los ejemplos de los fármacos antidiabetes orales que se pueden usar en tal combinación incluyen las biguanidas (tales como metformina), sulfonilureas (tales como carbutamida, clorpropamida, glibenclamida (Glyburide™), gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, tolazamida o tolbutamida), inhibidores de alfa-glucosidasa (tales como acarbosa, miglitol o voglibosa), tiazolidinodionas (TZD) (tales como pioglitazona, rivoglitazona o rosiglitazona), meglitinidas (tales como nateglinida, repaglinida o mitiglinida), inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (tales como alogliptina, saxagliptina, sitagliptina o vildagliptina), análogos del péptido 1 de tipo glucagón (tales como exenatida, liraglutida, o albiglutida), análogos de amilina (tales como pramlintida), análogos de insulina de acción rápida (tal como insulina lispro, insulina asparta e insulina glulisina), análogos de insulina de acción prolongada (tal como insulina glargina, insulina detemir), agonistas de PPAR dual (tal como aleglitazar) e inhibidores de SGLT2 (tales como dapagliflozina, remogliflozina y sergliflozina). Un ejemplo particularmente preferido es metformina. La dosificación, el modo de administración y la formulación de los fármacos antidiabetes anteriores para su uso en la combinación de la presente realización serán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

En el presente aspecto, el prebiótico usando en la combinación es preferentemente polidextrosa y el fármaco antidiabetes usado en la combinación es metformina.

En esta combinación, de manera adecuada, se puede usar el prebiótico en una cantidad de 0,01 a 100 g / día, preferentemente, de 0,1 a 50 g/día, más preferentemente de 0,5 a 20 g/día. En una realización, se puede usar el prebiótico en una cantidad de 1 a 10 0g / día, preferentemente, de 2 a 9 g/día, más preferentemente de 3 a 8 g/día. En otra realización, se puede usar el prebiótico en una cantidad de 5 a 50 g / día, preferentemente, de 10 a 25 g/día.

En esta combinación, de manera adecuada, se puede usar el fármaco antidiabetes en una cantidad de 1 □ a 10 g / día, preferentemente de 10 □ a 5 g / día, más preferentemente de 0,1 mg a 2 g / día. En una realización, el fármaco antidiabetes se puede usar de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 1 mg a 1 g / día, preferentemente, de 5 a 500 mg / día.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Modelo animal y tratamiento con probióticos

Se alimentó a una cohorte de cincuenta ratones C57Bl/6 macho de 10 semanas de edad con comida normal (CN) (A03, SAFE, Augy, Francia), o con una dieta alta en grasas (DAG) (que comprende el 72 % de grasa (aceite de grano de maíz y manteca de cerdo), el 28 % de proteína y < 1% de hidratos de carbono) (SAFE, Augy, Francia) durante 4 semanas. Esta dieta tiene la ventaja peculiar de inducir diabetes antes de la aparición de la obesidad (véase por ejemplo, Cani et al. 2008 "Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding". Pathol Biol (París); Cani et al, Diabetes 2008, 57, 1470-81; Knauf et al. Endocrinology 2008, 149, 4768-77; Cani et al., Diabetologia 2007, 50, 2374-83; Cani et al; Diabetes 2007, 56, 1761-1772 y Turini et al. Swiss Med Wkly 2007, 137, 700-4).

Los ratones se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. Se calculó el área bajo la curva y se repartieron los ratones de forma homogénea de acuerdo con los diferentes grupos experimentales o diez ratones por grupo (10 ratones por grupo). Los ratones se alimentaron durante cuatro semanas más con una comida normal (n=10= o una DAG (n=40). Los ratones de la DAG se trataron diariamente durante 4 semanas tal como sigue con, 1. Tratados con vehículo, 2. *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* cepa 420 (B420) (10^9/bacterias por ratón), 3. *Lactobacillus acidophilus* NCFM (NCFM) (10^9/bacterias por ratón), 4. NCFM+B420 ($5x10^8$ B420 + $5x10^8$ NCFM por ratón). Después se realizó una prueba intraperitoneal tal como se describe a continuación. Los ratones se alojaron en un ambiente controlado (ciclos diarios de luz solar de 12 h con inversión, apagado de luz a las 10:00 a.m.).

Evaluación del peso

Los ratones se pesaron semanalmente al comienzo de la administración de la dieta del estudio (4 semanas antes de la administración del probiótico) hasta las 6 semanas de tratamiento con probiótico (hasta el sacrificio).

Composición corporal

La composición corporal del ratón se midió mensualmente usando ECO-MRI. Se midieron la masa de grasa corporal total, la masa magra corporal total, la masa de agua total, el contenido sin agua, el peso del tejido adiposo subcutáneo, el peso del tejido adiposo mesentérico y el peso del hígado.

Tolerancia a la glucosa

La tolerancia a la glucosa se probó después de la administración de 4 semanas de las dietas del estudio (antes de la suplementación con el probiótico) para asegurar el estado de intoleracia a la glucosa y de diabetes de los ratones con DAG, y después de 4 semanas de administración del probiótico. En resumen, a los ratones en ayunas de seis horas se les inyectó con glucosa al 20 % (1 g/kg) en la cavidad peritoneal. Se determinó la glucemia con un medidor de glucosa (ACCU-check Active, Roche, Meylan, Francia) 30 minutos antes de la exposición a la glucosa, en el momento de la exposición a la glucosa, y 30, 60 y 90 minutos después de la exposición a la glucosa, a partir de 3,5 µl de sangre tomada de la vena de la cola.

Insulina en plasma

La concentración de insulina se midió a partir del plasma en estado de ayunas así como sin ayunas.

Sensibilidad a la insulina

Al finalizar el tratamiento con probiótico, los ratones se sometieron a una cirugía intrafemoral en la que se alojó un catéter para infusiones intravenosas adicionales. Este catéter intrafemoral intravenoso se implantó 4 días antes del comienzo del día del experimento (infusiones). El día del ensayo, los ratones estuvieron en ayunas durante 5 horas. Se realizó un pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico durante 3 horas en presencia de la glucosa marcada tritiada para determinar la tasa de recambio de la glucosa. La glucosa fría se coinfundió para mantener la euglucemia.

Marcadores inflamatorios (PCR cuantitativa en tiempo real)

El estado de inflamación del tejido adiposo, del hígado y del músculo se midió midiendo la concentración de los ARNm de los marcadores inflamatorios TNFα, IL-1β, PAI-1 e IL6 mediante análisis cuantitativo de PCR-RT. Se extrajeron los ARNm totales de las almohadillas de grasa injertadas y del tejido adiposo, hepático y muscular subcutáneo del receptor utilizando el reactivo TriPure (Roche, Basel, Suiza). Se realizaron las PCR usando el instrumento del Sistema de Detección de Secuencia AbiPrism 7900 y el programa informático (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU., tal como se describe en Cani et al. Diabetes **2007**, 56, 1761-1772. La concentración de cada ARNm se normalizó para la carga de ARN para cada muestra usando ARNr RPL19 como patrón interno.

RESULTADOS

Tolerancia a la glucosa

Tal como se muestra en la Figura 1, todos los grupos de ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante 4 semanas fueron intolerantes a la glucosa y diabéticos. Tras el tratamiento con B420, los ratones se caracterizaron por una mejora de la tolerancia a la glucosa (Figura 2). La reducción significativa se logra solo con B420; se obtuvo una tendencia hacia el beneficio en la salud para NCFM solo o con una combinación de NCFM y B420. Por lo tanto, se concluyó que el tratamiento con B420 comenzó a mejorar la tolerancia a la glucosa. Un período de tratamiento más largo podría haber tenido un mayor impacto sobre los perfiles glucémicos.

Composición corporal del ratón

Los datos muestran que las cuatro semanas del tratamiento de probiótico con B420 y una combinación de B420 y NCFM redujeron el impacto de la DAG sobre el aumento de la masa de grasa corporal (Figura 3). No se observó efecto del tratamiento sobre la masa magra corporal, la masa sin agua, y la masa de agua total (Figuras 4, 5 y 6).

En particular, la Figura 3 ilustra el efecto del tratamiento de B420 y la combinación de B420+NCFM en la reducción del impacto de la dieta alta en grasas sobre el aumento de la masa de grasa corporal (en donde la columna de la izquierda significa el resultado antes del tratamiento y la columna de la derecha el de después del tratamiento). En la Figura 3, * indica un resultado significativamente diferente de los ratones no tratados del mismo grupo. Se observó un pequeño aumento de peso con B420 o con la combinación de B420 y NCFM. Sin embargo, esto representa una mejor significativa sobre los ratones de DAG sin tratar, dado que los resultados de la DAG muestran que la ingesta de DAG debería aumentar de manera significativa la masa de grasa corporal de los ratones.

Dado que el tratamiento no mostró efectos sobre la masa magra corporal, la masa sin agua y la masa de agua total, se puede concluir de lo anterior que la diferencia en el peso lograda solo se relaciona con los tejidos adiposos.

Peso del tejido individual

Los datos muestran que el peso del tejido adiposo mesentérico se redujo mediante B420 y B420+NCFM. No se apreciaron diferencias en el peso del tejido adiposo subcutáneo o del hígado (Figuras 7, 8 y 9).

En particular, la Figura 8 ilustra el efecto sobre el peso del tejido adiposo mesentérico en ratones alimentados con dieta alta en grasas tratados con probióticos. Se obtuvo significación para B420 solo o en combinación con NCFM

(se obtuvo un p-valor de <0,05 cuando se comparó con el grupo de DAG sin tratar). Los ratones tratados con B420 y B420+NCFM se caracterizaron por una menor masa de grasa mesentérica.

Además, la Figura 9 ilustra el efecto sobre el peso del hígado en ratones alimentados con dieta alta en grasas y tratados con probióticos. No se apreciaron diferencias significativas, lo que muestra una vez más que la diferencia de peso no está ligada al peso del hígado.

Ganancia de peso

La Figura 10 ilustra la ganancia de peso corporal antes y después de la administración de probióticos a los ratones alimentados con dieta alta en grasas. La ganancia de peso corporal de los ratones tratados con B420 y B420+NCFM fue más baja que la de los ratones alimentados con DAG sin probióticos o los ratones tratados solo con NCFM. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para B420 solo o en combinación con NCFM; se observó una tendencia descendente (en comparación con los ratones alimentados con DAG sin tratar) para NCFM solo.

Concentraciones de insulina en plasma

La concentración de insulina en plasma se evaluó en el estado de ayunas y sin ayunas. Los datos muestran que, en estado de ayunas, el grupo tratado con B420 se caracterizó por una normalización de la hiperinsulinemia en ayunas (Figura 11). En el estado sin ayunas, todos los tratamientos con probióticos mejoraron la secreción de insulina glucosa.

Estos resultados son significativos, dado que los bajos niveles de insulina (es decir, los niveles basales de insulina) se observan en el estado de ayunas de los sujetos sanos no diabéticos. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para B420 solo.

De significación adicional es que los elevados niveles de insulina se observan en el estado sin ayunas de los sujetos sanos, no diabéticos. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para B420 solo, NCFM solo y la combinación de los dos.

Sensibilidad a la insulina

La Figura 12 ilustra que a los ratones alimentados con dieta alta en grasas se les hizo un pinzamiento en condiciones euglucémicas hiperinsulinémicas mediante el método del pinzamiento. Los datos muestran que los ratones tratados con B420 se caracterizaron mediante una normalización de la sensibilidad a la insulina. *p<0,05 frente a los ratones con DAG. Sin embargo, en presencia de NCFM no se observó este efecto.

Estos resultados son significativos, dado que la sensibilidad a la insulina proporciona el enlace entre el comportamiento de la insulina y el consumo de glucosa. Los resultados mostrados con B420 son de particular interés ya que, en comparación con los fármacos antidiabetes clásicos que se dirigen solo a la insulina en ayunas, a la sensibilidad a la insulina o a la insulina sin ayunas, tiene un efecto sobre los tres factores.

Inflamación del tejido hepático

Al considerar todas las concentraciones de ARNm de citocina, la DAG indujo inflamación en tejidos hepáticos (Figuras 13 y 14). El tratamiento probiótico tuvo un claro efecto antiinflamatorio sobre el tejido hepático. Esto fue particularmente evidente con el tratamiento con NCFM. También, el tratamiento con la combinación de NCFM y B420 redujo la inflamación, mientras que el tratamiento con B420 solo redujo la inflamación en menor medida.

Inflamación del tejido muscular

La inflamación se indujo por la dieta alta en grasas también en tejidos del músculo, aunque la inducción de la inflamación no fue tan fuerte como en el tejido adiposo (Figuras 15 y 16). El tratamiento de probióticos con B420+NCFM y NCFM solo tendieron a reducir la inflamación del tejido muscular, pero el efecto no estaba tan claro como con el tejido adiposo o el tejido hepático.

Inflamación del tejido adiposo

La dieta alta en grasas claramente indujo la inflamación en tejido adiposo subcutáneo (Figuras 17 y 18). El tratamiento con B420 y el tratamiento con B420+NCFM mostraron un fuerte efecto antiinflamatorio. El tratamiento con NCFM dio como resultado efectos más inconsistentes sobre la inflamación del tejido pero hubo una tendencia general por la inflamación reducida.

En conjunto, las bacterias probióticas mostraron un amplio efecto antiinflamatorio, con los efectos más pronunciados en el tejido adiposo y en el tejido hepático. Es destacable que los efectos antiinflamatorios fueron diferenciales y dependientes del tejido así como del tratamiento de probióticos.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

A una cohorte de ratones C57BI/6 macho de 10 semanas de edad se les alimentó con una dieta alta en grasas (DAG) (que comprende el 72 % de grasas (aceite de grano de maíz y manteca de cerdo), el 28 % de proteína y < 1% de hidratos de carbono) (SAFE, Augy, Francia) durante 4 semanas, tal como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. Se calculó el área bajo la curva y se repartieron los ratones de forma homogénea de acuerdo con los diferentes grupos experimentales o diez ratones por grupo (10 ratones por grupo). Los ratones se alimentaron durante cuatro semanas más con DAG. Los ratones de la DAG se trataron diariamente durante 4 semanas tal como sigue con B420 (10^9 bacterias por ratón), polidextrosa (PDX) (0,2 g / día), el fármaco antidiabetes metformina (MET) (2 mg/ml de agua para beber) y diversas combinaciones de los mismos. Los ratones de control se trataron con solución salina. Los ratones se alojaron en un ambiente controlado (ciclos diarios de luz solar de 12 h con inversión, apagado de luz a las 10:00 a.m.). La glucosa en sangre, la concentración de insulina y el HOMA-IR se midieron a partir del plasma en estado de ayunas.

Resultados

El tratamiento bien con B420 solo o la combinación de B420 y polidextrosa redujo la glucosa en plasma en ayunas en comparación con el control. La metformina sola no tuvo efecto sobre la glucosa en sangre en ayunas, pero una combinación con metformina y polidextrosa fue eficaz (Figura 19).

El tratamiento con B420 redujo la insulina en plasma en ayunas. La adición de polidextrosa mejoró adicionalmente el efecto, lo que sugiere un efecto sinérgico de la combinación. La metformina redujo la insulina en plasma en ayunas, pero la adición de B420 junto con metformina mejoró adicionalmente el efecto (Figura 20).

El tratamiento con B420 redujo el HOMA-IR en ayunas. La adición de polidextrosa con B420 mejoró adicionalmente el efecto, lo que sugiere un efecto sinérgico de la combinación. La adición de metformina a B420 o B420+polidextrosa mejoró adicionalmente el efecto (Figura 21).

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria de la especie *Bifidobacterium animalis subesp. lactis cepa 420 (B420)* para su uso en el tratamiento de una o más de las siguientes enfermedades y afecciones (a) a (g) en un mamífero:

(a) tratamiento de diabetes;
(b) tratamiento del síndrome metabólico;
(c) tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa;
(d) normalización de la sensibilidad a la insulina;
(e) aumento de la secreción de insulina sin ayunas;
(f) reducción de la secreción de insulina en ayunas;
(g) tratamiento de la obesidad, control de la ganancia de peso, inducción de la pérdida de peso, reducción de la masa de grasa corporal y/o reducción de la masa de grasa mesentérica.

2. La bacteria para el uso de la reivindicación 1, en donde la diabetes es diabetes de Tipo 2.

3. La bacteria para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el mamífero en necesidad del tratamiento ingiere una dieta alta en grasas.

4. La bacteria para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la *Bifidobacterium* es una *Bifidobacterium* probiótica.

5. La bacteria para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, usada en combinación con una bacteria adicional del género *Lactobacillus*.

6. La bacteria para su uso de la reivindicación 5, en donde la bacteria adicional es de la especie *Lactobacillus acidophilus.*

7. La bacteria para su uso de la reivindicación 6, en donde la bacteria es *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM (ATCC PTA-4797).

8. La bacteria para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, para su uso en combinación con un prebiótico.

9. La bacteria para su uso de la reivindicación 8, en donde el prebiótico es polidextrosa.

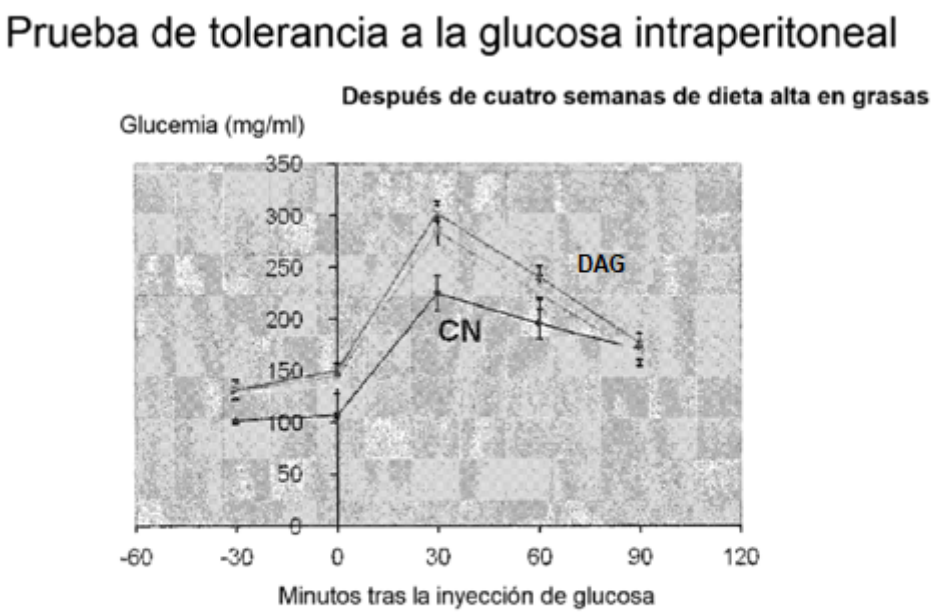
Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
Después de cuatro semanas de dieta alta en grasas
Glucemia (mg/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
DAG
CN
-60
-30
0
30
60
90
120
Minutos tras la inyección de glucosa

Fig. 1

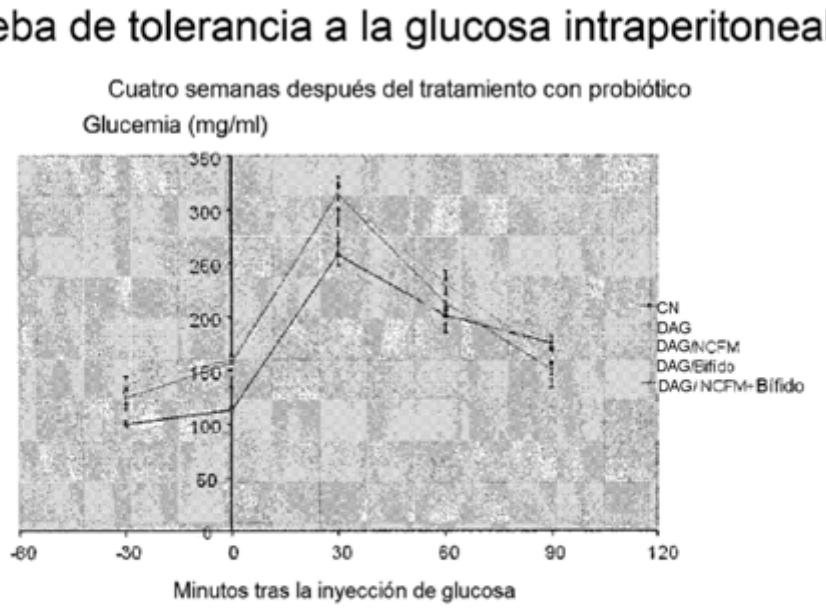
Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
Cuatro semanas después del tratamiento con probiótico
Glucemia (mg/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/Bífido
DAG/ NCFM+Bífido
-60
-30
0
30
60
90
120
Minutos tras la inyección de glucosa

Fig. 2

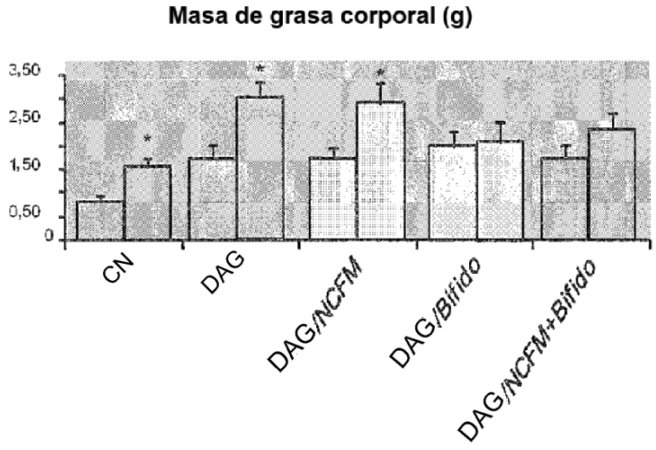

Figura 3

Fig. 3

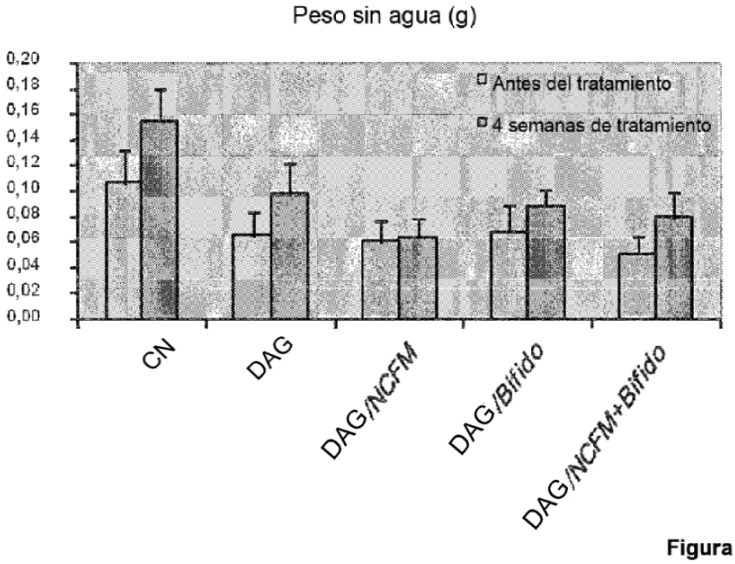

Figura 4

Fig. 4

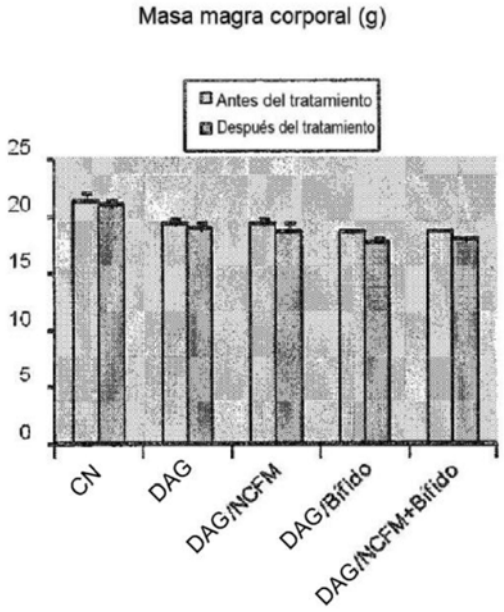

Figura 5

Fig. 5

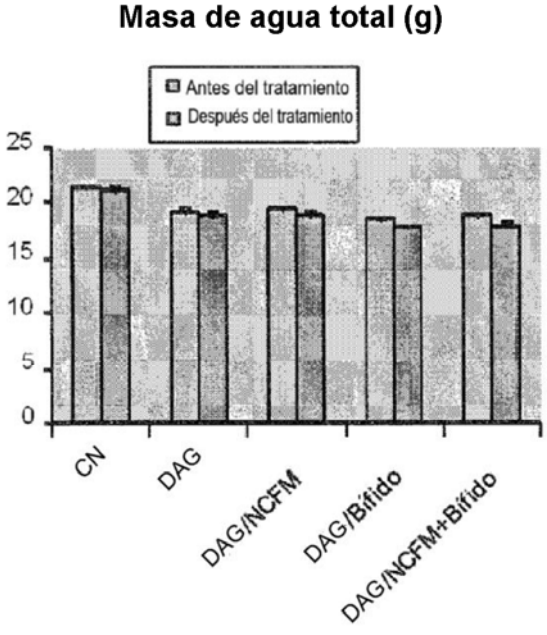

Figura 6

Fig. 6

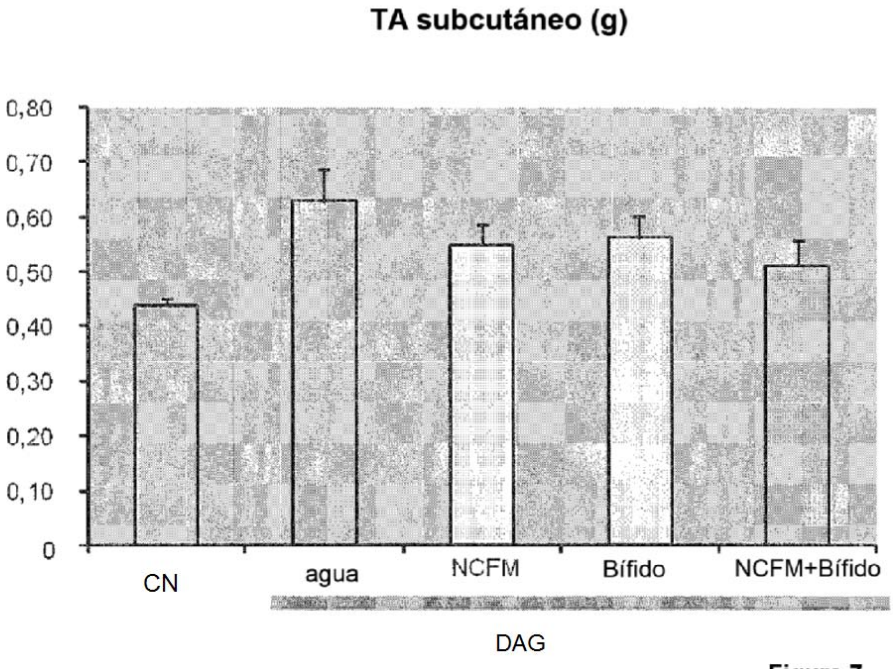

Figura 7

Fig. 7

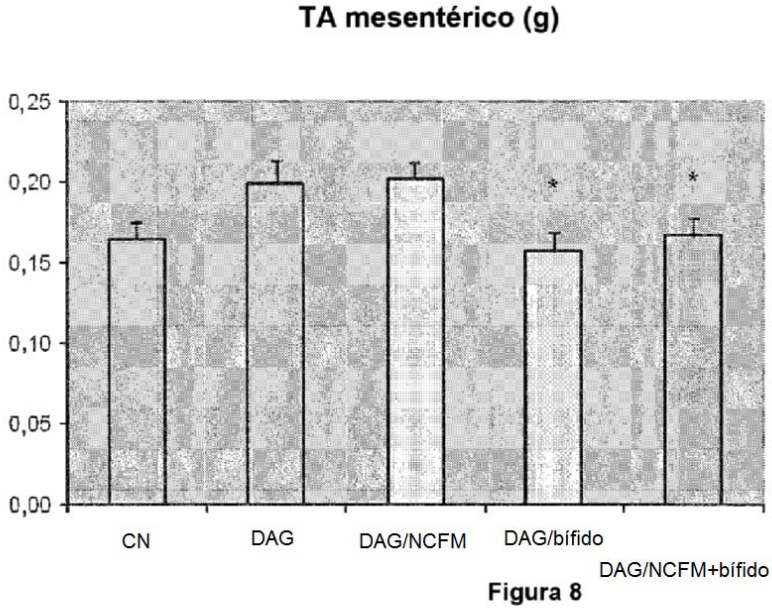

Figura 8

Fig. 8

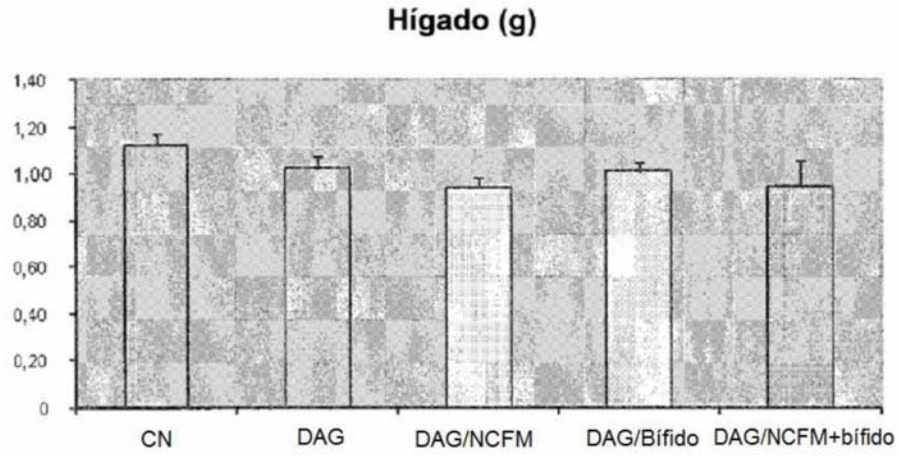

Figura 9

Fig. 9

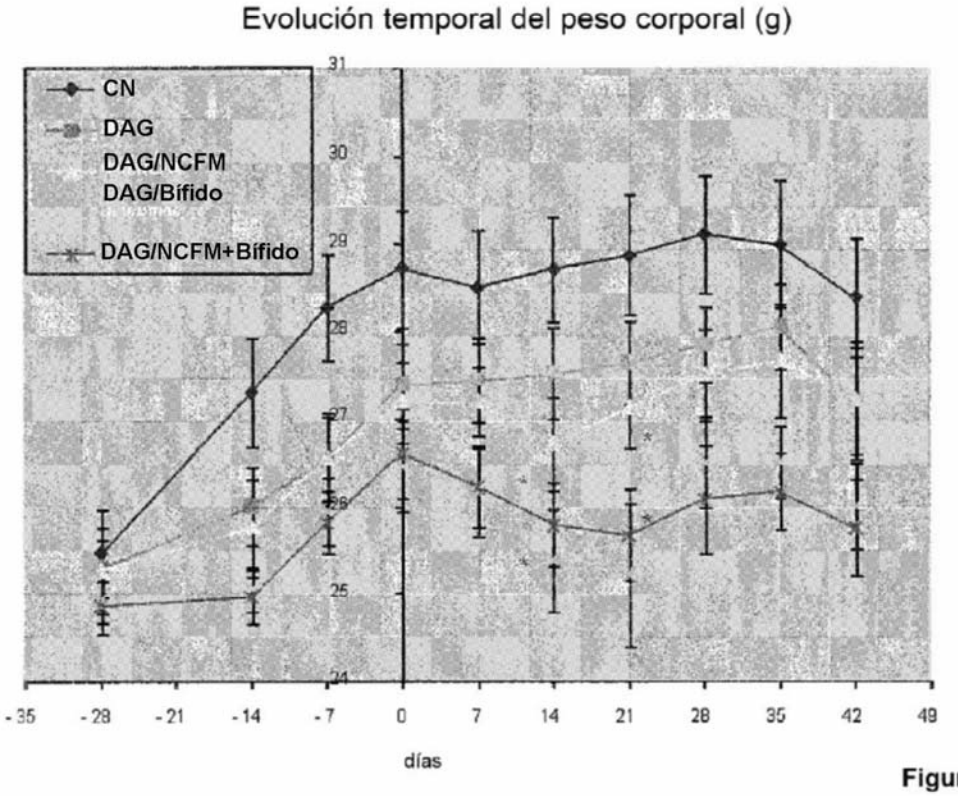

Figura 10

Fig. 10

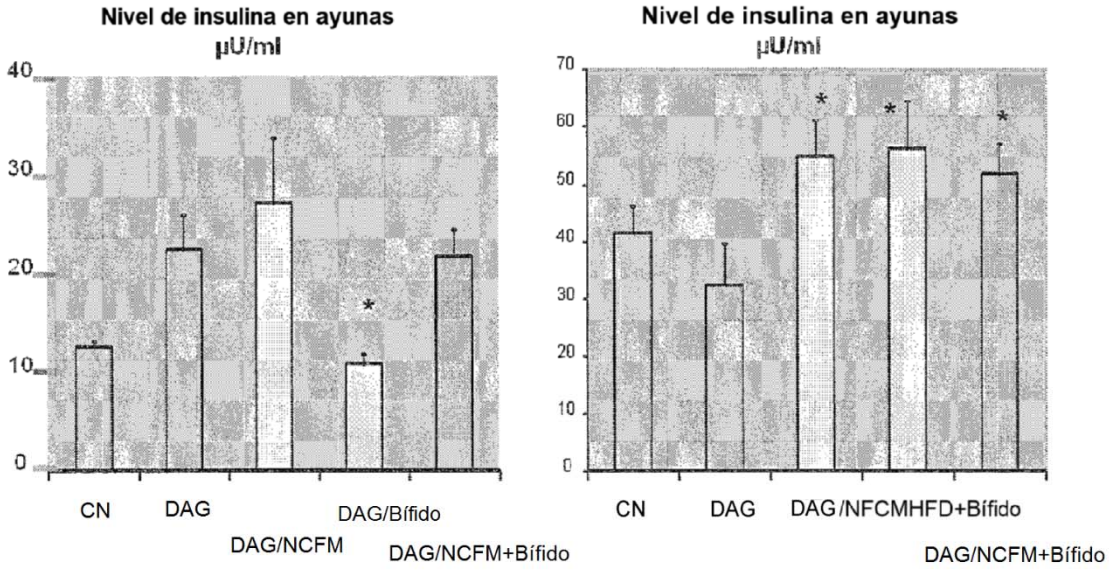
Nivel de insulina en ayunas
µU/ml
40
30
20
10
0
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/Bífido
DAG/NCFM+Bífido
Nivel de insulina en ayunas
µU/ml
70
60
50
40
30
20
10
0
CN
DAG
DAG/NFCMHFD+Bífido
DAG/NCFM+Bífido

Fig. 11

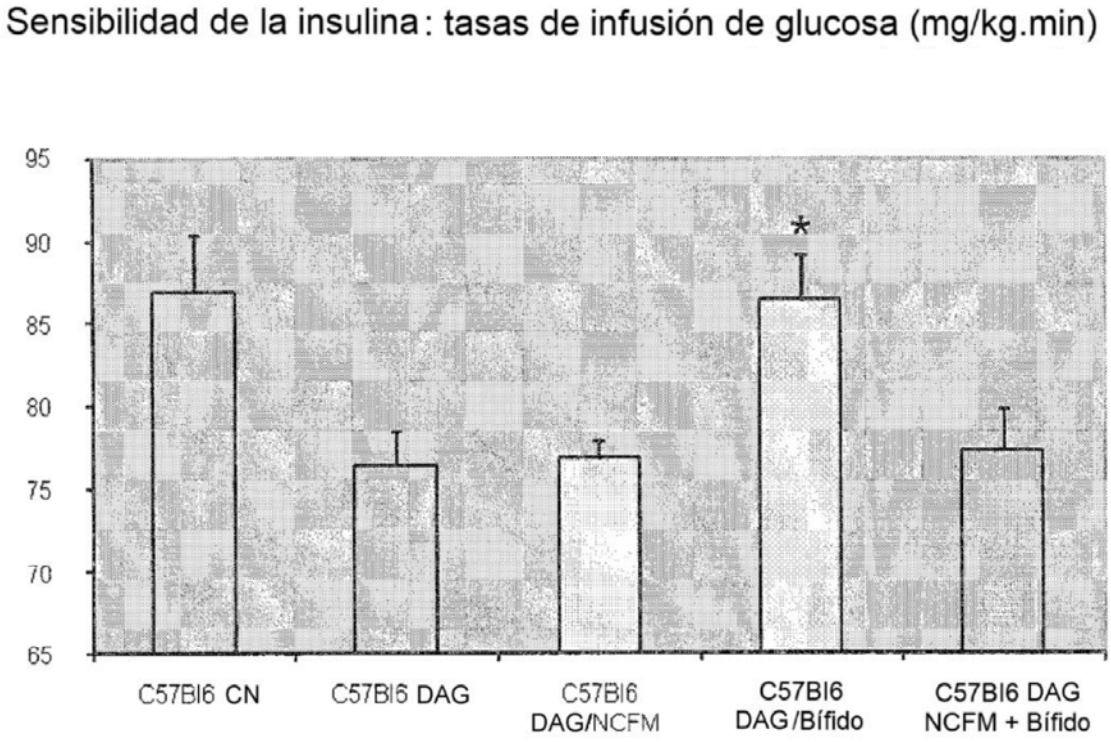
Sensibilidad de la insulina: tasas de infusión de glucosa (mg/kg.min)
95
90
85
80
75
70
65
*
C57Bl6 CN
C57Bl6 DAG
C57Bl6 DAG/NCFM
C57Bl6 DAG/Bífido
C57Bl6 DAG NCFM + Bífido

Fig. 12

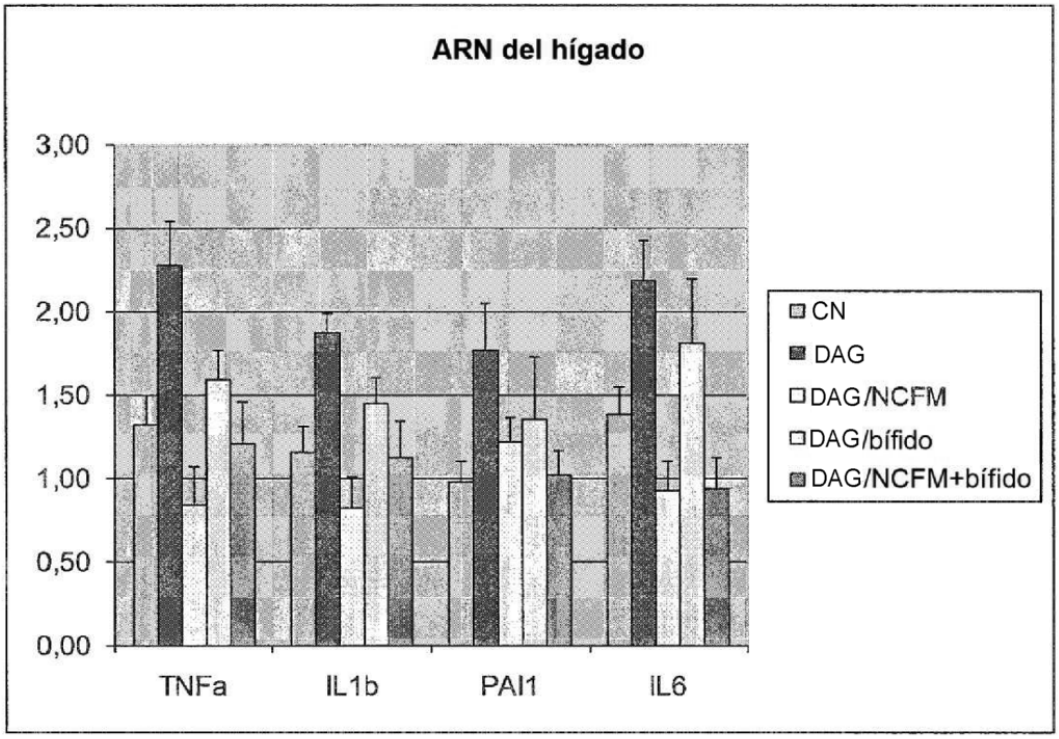
ARN del hígado
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
TNFa
IL1b
PAI1
IL6
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/bífido
DAG/NCFM+bífido

Fig. 13

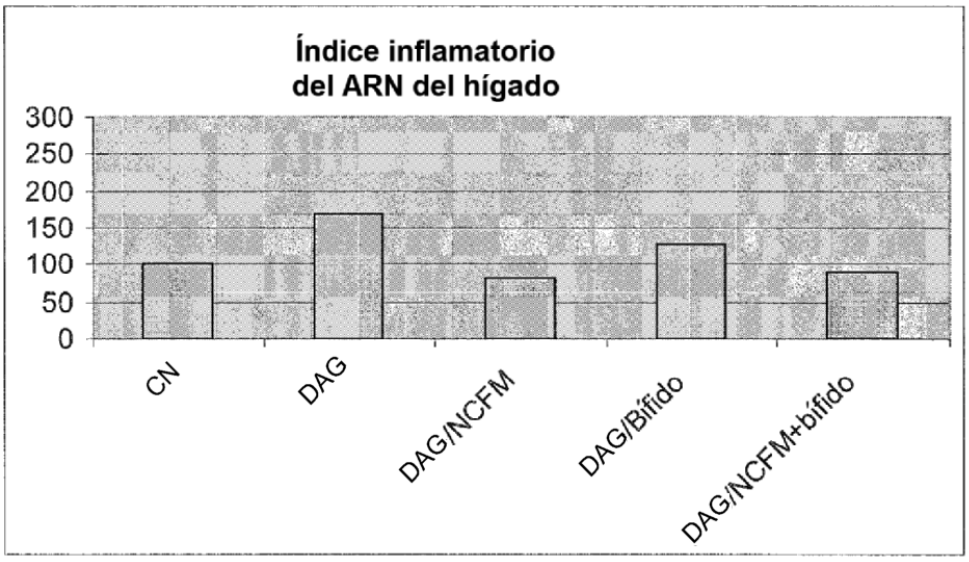
Índice inflamatorio
del ARN del hígado
300
250
200
150
100
50
0
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/Bífido
DAG/NCFM+bífido

Fig. 14

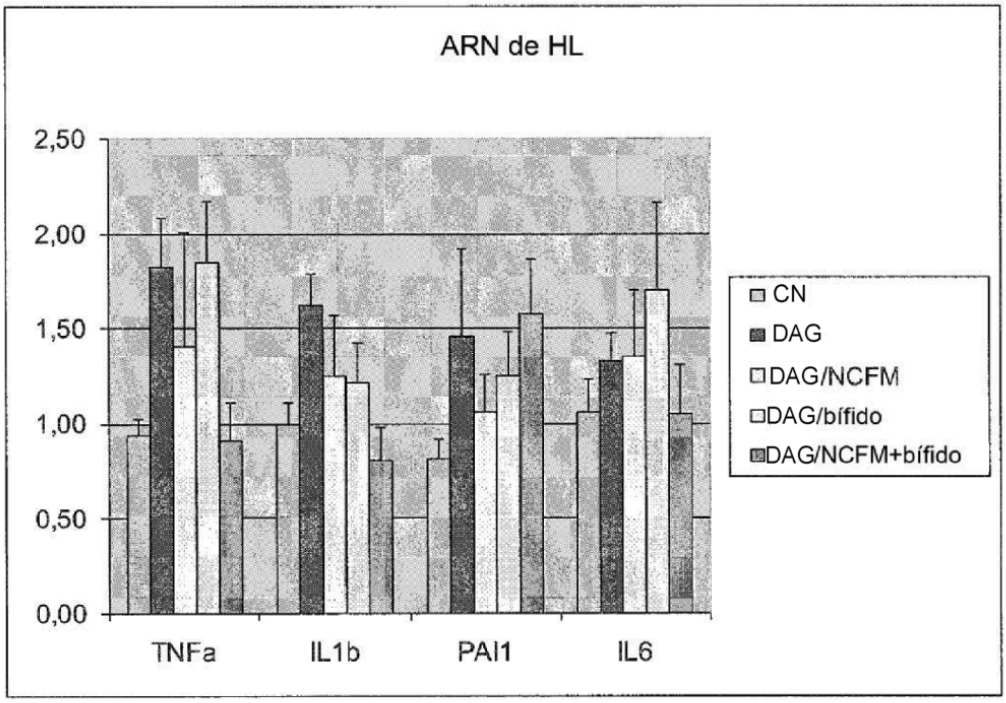
ARN de HL
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
TNFa
IL1b
PAI1
IL6
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/bífido
DAG/NCFM+bífido

Fig. 15

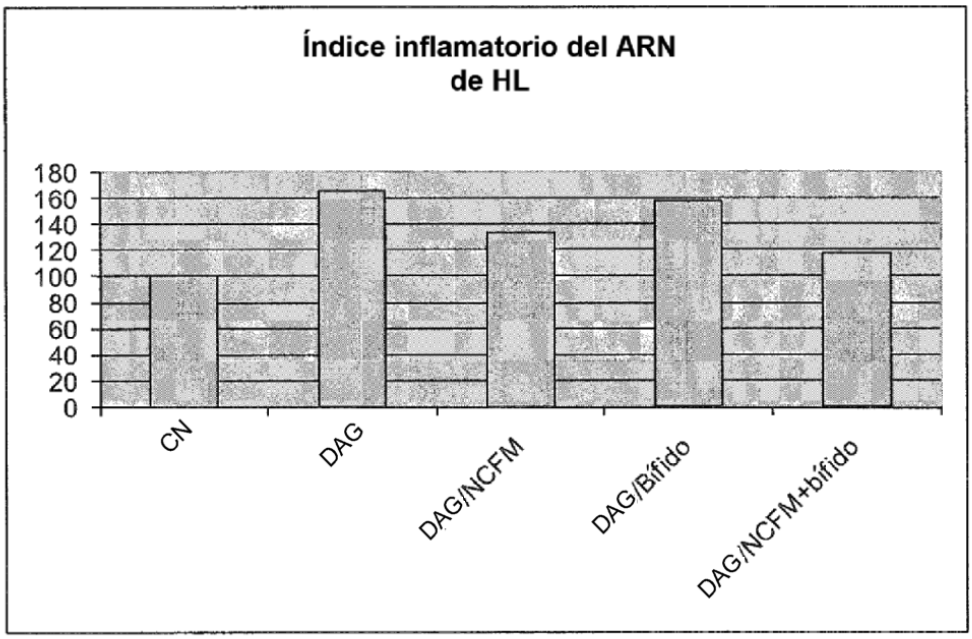
Índice inflamatorio del ARN de HL
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/Bífido
DAG/NCFM+bífido

Fig. 16

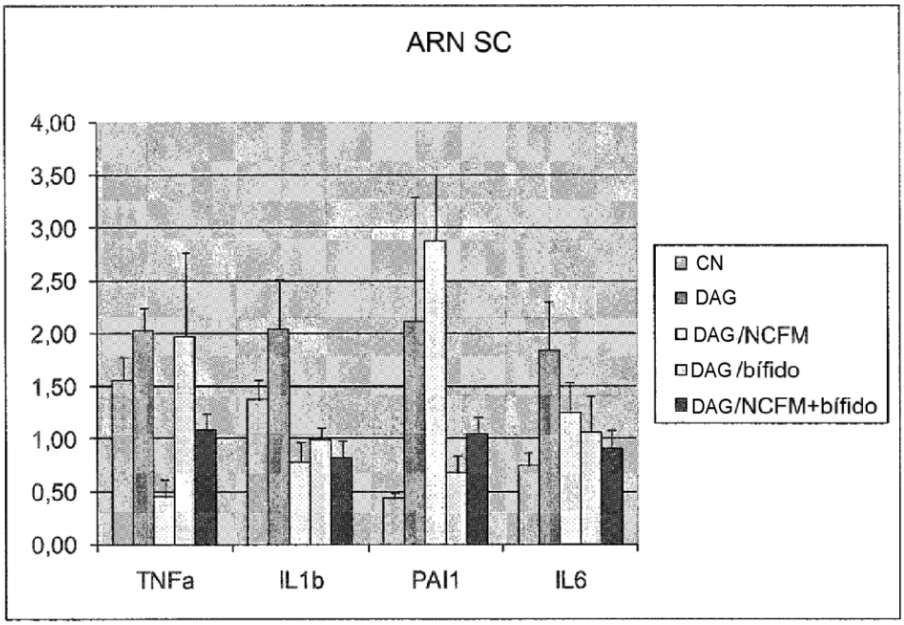
ARN SC
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
TNFa
IL1b
PAI1
IL6
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG /bífido
DAG/NCFM+bífido

Fig. 17

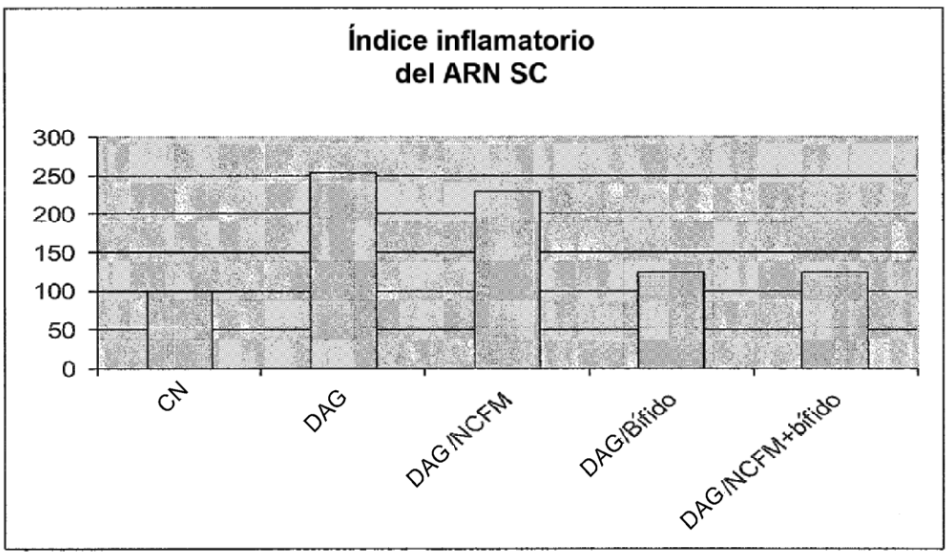
Índice inflamatorio
del ARN SC
300
250
200
150
100
50
0
CN
DAG
DAG/NCFM
DAG/Bífido
DAG/NCFM+bífido

Fig. 18

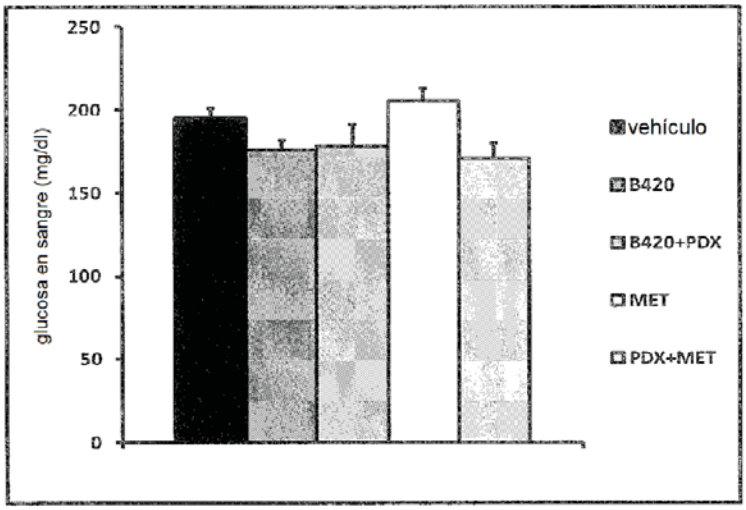
250
200
150
100
50
0
glucosa en sangre (mg/dl)
vehículo
B420
B420+PDX
MET
PDX+MET

Fig. 19

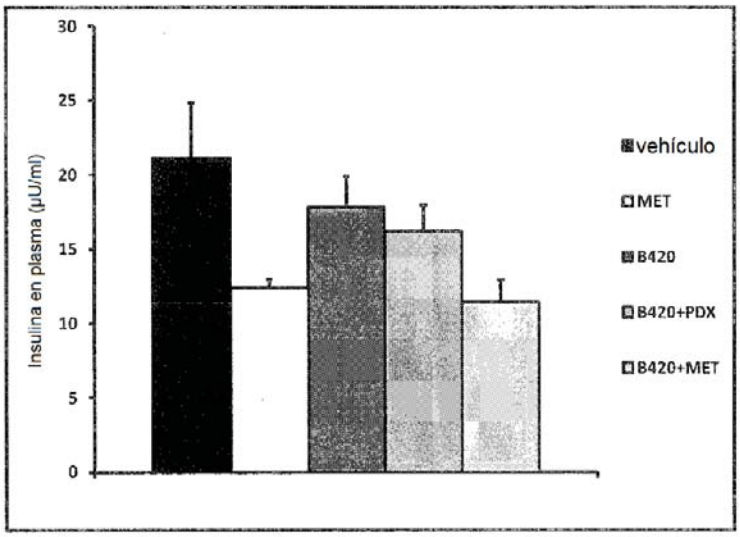
30
25
20
15
10
5
0
Insulina en plasma (µU/ml)
vehículo
MET
B420
B420+PDX
B420+MET

Fig. 20

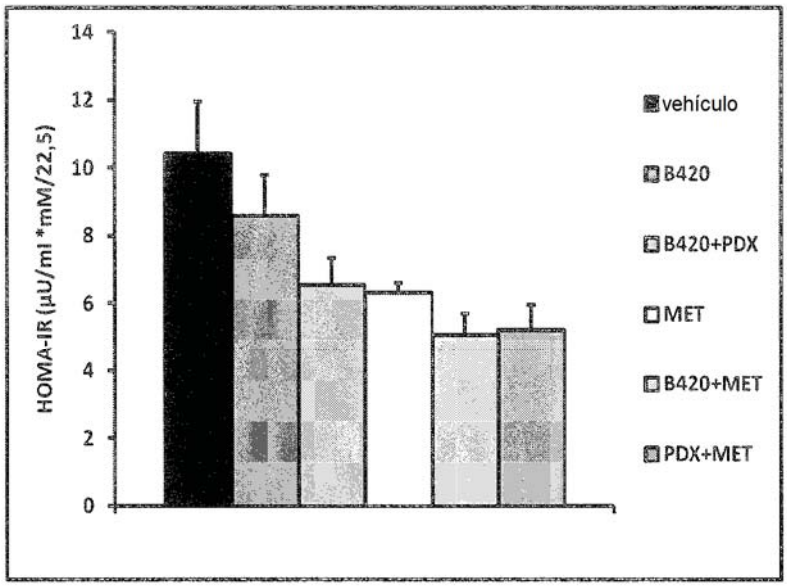
HOMA-IR (µU/ml *mM/22,5)
14
12
10
8
6
4
2
0
vehículo
B420
B420+PDX
MET
B420+MET
PDX+MET

Fig. 21