



## TÍTULO DE PATENTE No. 404980

**Titular(es):** CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

**Domicilio:** Avenida Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal , 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

**Denominación:** SISTEMA DE ESTABILIZACIÓN DE MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.

**Clasificación:** **CIP:** C12N1/20; C12N1/04; C12N1/36; G01N33/00  
**CPC:** C12N1/20; C12N1/04; C12N1/36; C12N1/205; G01N33/00

**Inventor(es):** MARISELA GONZÁLEZ AVILA

### SOLICITUD

**Número:**  
MX/a/2018/010105

**Fecha de Presentación:**  
21 de Agosto de 2018

**Hora:**  
15:41

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 21 de agosto de 2038

**Fecha de Expedición:** 3 de agosto de 2023

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en [www.gob.mx/impi](http://www.gob.mx/impi). Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

### SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

#### EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:  
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION  
TRIBUTARIA|56||MX/2023/73102|MX/a/2018/010105|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s)  
1|UN1ohPcPhfXoyDO+Oaggi5r8NM=

Sello Digital:  
fHz7xo0EHfYz296muxLGA2ALeC4Zjv49t2F6ROACFdC0njhtJmO+vVA9CBWxJMx/tnSl8+h8CuVhIzmrUljGkdA2uC  
C8tDlkdNW89UusyC7Q8AtSFQLMqpZKO930wr2wr15BIfzrBplm3e/Kdj1Mn3EmVsqhJ72oMrJ41KfyFq6a2vGJW9cYg  
NJGxpYlp2uwzn3zDcH9Zl0mDQ5WB5UIMxzXnCbzbbmdAnAhvSaERVnjSBfnEp3pC4QMqJPS3DmzoToS6hnuZlya9rMj  
cvAnVBRswVQoUoNJ/cc5J4dmMoKkFRjBGmoJv1uiUdYjpf2PvwkTUYf2l5WIKO1Uk0Q9Bdw==



MX/2023/73102



## SISTEMA DE ESTABILIZACIÓN DE MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

### DESCRIPCIÓN

#### Campo técnico de la invención

La presente invención corresponde a los campos técnicos de la biotecnología y la microbiología industrial, particularmente concierne a un sistema integrado por composiciones y métodos para la obtención, estabilización y aplicación de un modelo *ex vivo* de microbiota gastrointestinal, más particularmente para su aplicación en modelos *in vitro* de fermentación colónica para la simulación de procesos de digestión y el estudio de diversas interacciones de la microbiota intestinal.

#### 10 Antecedentes

El aparato digestivo cumple con la función de transformar las sustancias complejas que están presentes en los alimentos a moléculas más simples que pueden ser utilizadas finalmente como fuente de energía para llevar a cabo la gama de procesos metabólicos y celulares habituales en el organismo. Sin embargo, esta función primordial es un proceso sumamente complejo, en el que participan los distintos órganos que constituyen al aparato digestivo como son la boca (en la cual se incluyen los dientes y la lengua) la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso, el recto y el ano, todos ellos conformando el tubo digestivo llamado también tracto gastrointestinal o tracto digestivo; y participan también glándulas accesorias del tubo digestivo incluyendo las glándulas salivales, el hígado, la vesícula biliar, el bazo y el páncreas.

Además, el aparato digestivo incluye vastas poblaciones microbianas, heterogéneas, integradas por arqueas, bacterias, hongos, protistas y virus, que en la actualidad se consideran como un “órgano metabólico” que desempeña *per se* funciones esenciales en los procesos de digestión, así como en relación a la salud humana en general. Estas poblaciones de microorganismos son englobadas en el término aceptado actualmente de “microbiota”, y su estudio ha sido un tema que cobra más y más relevancia conforme se van revelando los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que forman la base de la relación de la microbiota y la salud humana. En las diferentes regiones anatómicas del tubo digestivo la cantidad de microorganismos y las especies presentes es variable. Por ejemplo, el estómago generalmente no está colonizado numerosamente por microorganismos dado el bajo pH que este tiene en homeostasis, típicamente alberga hasta  $1 \times 10^3$  UFC/g, con presencia principalmente de microorganismos de los tipos lactobacilos, estreptococos, y levaduras. En el intestino delgado se incrementa levemente la población de microorganismos, estableciéndose mayormente en el yeyuno e íleon en proporciones respectivamente de  $1 \times 10^4$

- y  $1 \times 10^{6-7}$ , mientras que en el duodeno la población es más bien baja por la presencia de sales biliares. La mayor proporción de la microbiota se establece en el intestino grueso, particularmente en el colon, en donde las poblaciones pueden alcanzar concentraciones de hasta  $1 \times 10^{12} - 1 \times 10^{14}$  UFC/g de contenido colónico, representando hasta un 95 % del total de la microbiota. (Guarner, F., Malagelada, JR., 2003. *La flora bacteriana del tracto digestivo. Gastroenterol Hepatol Vol.26, Supl 1:1-5*; Icaza-Chávez, M.E., 2013. *Microbiota en la salud y la enfermedad. Revista de Gastroenterología de México. Vol.78(4):240-248*; Williams, CF., Walton, GE., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, GR. 2015. *Comparative analysis of intestinal tract models. Annu Rev Food Sci Technol. Vol.6:329-350*).
- 5
- 10 La relevancia de la participación de la microbiota intestinal en la serie de eventos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar durante la digestión de los alimentos y las subsiguientes fases de absorción, transporte e incorporación al metabolismo de los nutrientes provenientes de los mismos, ha generado gran interés tanto en el ámbito científico como por parte de los sectores industriales relacionados a la producción de alimentos, alimentos nutracéuticos y funcionales, bebidas, fármacos, medicamentos y otras sustancias terapéuticas. Así, se ha puesto gran empeño en diseñar diversas estrategias para caracterizar la composición de la microbiota intestinal y su rol en los procesos digestivos. Se ha considerado también fundamental tener un mayor entendimiento de los cambios que puede sufrir la microbiota intestinal en aspectos como diversidad, estabilidad y funcionalidad metabólica por efecto de condiciones
- 15
- 20 patológicas, tipo de alimentación y/o intervenciones nutricionales, tratamientos médicos, entre otros; dado que tales cambios en la microbiota intestinal pueden tener importantes repercusiones en la salud humana. La microbiota intestinal se considera un nuevo factor implicado en la etiología de la obesidad debido a su influencia en las funciones metabólicas e inmunológicas del hospedero. (Sanz Y. A., Santacruz, J. D. 2009. *Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y las alteraciones del metabolismo. Acta Pediatr Esp. Vol.67(9):437-442*)
- 25
- 30 La población con obesidad tanto infantil como adulta presentan una alteración en la composición de su microbiota intestinal (disbiosis) que se caracteriza por una mayor cantidad de Firmicutes y una menor cantidad de Bacteroidetes, mismos que se han relacionado con el tipo de dieta de las poblaciones (Tremaroli V, Bäckhed F. 2012. *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature. Sep 13;489(7415):242-9. doi: 10.1038/nature11552*; Estrada-Velasco B.I., et al. 2015. *La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. Nutr Hosp. 31(3):1074-1081 ISSN 0212-1611. doi:10.3305/nh.2015.31.3.8302*; Sanders M.E. 2008. *Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis. Vol.46(2): S58-S61. doi: 10.1086/523341*).
- 35

La microbiota intestinal también regula parte de la inmunidad del hospedero, influye en las respuestas locales y sistémicas, por lo que se considera que tiene influencia en la inflamación crónica leve asociada a la obesidad. Distintos receptores como los TLR (Toll-like) se activan en respuesta a estímulos microbianos y componentes de la dieta como proteínas y lípidos, desencadenando vías de señalización que activan distintos factores de transcripción como NFκ-β y la síntesis de diversas citocinas como TNF-α, IL-6 e IL-1β y mediadores de inflamación. (Sanz Y. A., Santacruz, J. D. 2009. *Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y las alteraciones del metabolismo. Acta Pediatr Esp. Vol.67(9):437-442*).

En el estado de la técnica hay una gran cantidad de publicaciones en las que si bien se resalta la trascendencia biológica que pueden tener los estudios realizados de manera directa sobre la microbiota intestinal, también se ponderan los inconvenientes que conllevan estos tipos de estudios. Por ejemplo, se ha demostrado que existe una significativa variación inter-individual en la microbiota intestinal, por lo que los estudios en individuos voluntarios sanos, o en pacientes de hospitales, o en pacientes con ileostomías, o en víctimas repentinas de accidentes graves/mortales, darían resultados con diferencias considerables; además de que se debe hacer frente a una serie de consideraciones éticas. Otros factores que pueden también influir en la composición de la microbiota intestinal, incluyen aspectos relacionados con edad, género, grupo étnico, geografía, ocupación, antropometría, hábitos alimentarios, uso de pre/probióticos, suplementos alimenticios, estado habitual del intestino, uso de antibióticos, medicamentos, contacto con mascotas, etc. Incluso, se ha observado que los patrones de la microbiota intestinal pueden además verse afectados por los ciclos diurnos del portador de la microbiota. Además, se tiene también dentro de los inconvenientes que para poder estudiar la microbiota intestinal están las cuestiones éticas involucradas a la forma de obtención de las muestras intestinales para producir poblaciones de microbiota representante de esta región del tubo digestivo.

Intentos para salvar las cuestiones antes planteadas, se encuentran divulgados en el estado de la técnica, por ejemplo, en relación a la implementación de modelos *in vivo* (modelos animales incluyendo ratones, ratas, cerdos, etc.); no obstante, debido a las diferencias fisiológicas los resultados pierden significancia biológica; sin contar con que se trata de tecnologías costosas, y que por otra parte están presentes las cuestiones éticas, por ejemplo por el uso de animales para la experimentación.

Otra alternativa para estudiar las complejas relaciones bidireccionales entre la microbiota gastrointestinal y la salud humana consiste en la implementación de modelos *in vitro*, los cuales implican menores costos económicos, menores dilemas éticos, y en general su operación es relativamente simple, permitiendo la obtención relativamente rápida de resultados. Además es posible implementar estos modelos para simular en particular alguno

de los compartimientos tubo digestivo. La complejidad de los modelos *in vitro* ha variado en función de las aplicaciones para las cuales se han diseñado.

Se tienen por ejemplo los modelos en Batch, como los diseños más simples, en los cuales los microorganismos y los sustratos son incubados en un reactor bajo condiciones controladas.

5 Debido a que las condiciones en este tipo de cultivos no se pueden estar cambiando, su uso se limita a estudios de corta duración, para evitar que los microorganismos alcancen una fase estacionaria por agotamiento de nutrientes y/o por acumulación de productos tóxicos que inhiban su crecimiento, y posteriormente se pierda la viabilidad. (Williams, CF., Walton, GE., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, GR. 2015. *Comparative analysis of intestinal tract models. Annu Rev Food Sci Technol. Vol.6:329-350*).

10 En los diseños de modelo continuo, se trata de imitar con mayor precisión las condiciones fisicoquímicas que hay en el tracto gastrointestinal; por ejemplo, el flujo constante de nutrientes, el eflujo de desechos en relación a tiempos de retención definidos, y el intercambio de gases (O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); y también se regulan parámetros como el pH y la temperatura. Los modelos continuos pueden tratarse de diseños de un solo paso (reactor), o bien constar de varios reactores interconectados para simular diferentes partes del sistema gastrointestinal. Entre los ejemplos de este tipo de modelos *in vitro* se tiene el modelo colónico de tres pasos de Gibson (1988); el EnteroMix® de Mäkivuokko (2005); y el PolyFermS de Barner (2013). (Williams, CF., Walton, GE., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, GR. 2015. *Comparative analysis of intestinal tract models. Annu Rev Food Sci Technol. Vol.6:329-350*).

15 En los modelos dinámicos, todavía se busca una mayor semejanza con las condiciones fisicoquímicas dentro del tracto gastrointestinal, e incluyen las interacciones entre el vaciado gástrico, pH estomacal, secreción, absorción de agua, remoción de productos de la digestión o metabolitos de los microorganismos, tránsito del alimento a través de las diferentes secciones del tracto digestivo. Ejemplos de este tipo de modelos *in vitro* incluyen SHIME (Simulator of the human intestinal microbial ecosystem) de Molly (1993); el TIM (TNO intestinal model) de Minekus (1995-1999); el M-SHIME (Mucosal model –SHIME) de Van den Abbeele (2012); el HMI (Host-microbiota interaction model) de Mazorati (2014), y el Gut-on-a-chip de Kim (2012), entre otros. (Williams, CF., Walton, GE., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, GR. 2015. *Comparative analysis of intestinal tract models. Annu Rev Food Sci Technol. Vol.6:329-350*).

20 Sin menoscabo de lo anterior, es importante remarcar que para que los modelos *in vitro* tengan una significancia biológica equiparable a la de los modelos *in vivo*, es necesario que cuenten con poblaciones microbianas complejas en su composición, estables, y que puedan así representar de manera confiable el ecosistema microbiano intestinal, así como su función metabólica en el tubo digestivo y los distintos procesos relacionados con la digestión.

Así, una alternativa más, consiste en los llamados modelos *ex vivo*, en los que se busca tener poblaciones de microbiota con la complejidad y diversidad de su estado natural, y que son aisladas de un individuo o de un grupo de individuos con una característica de interés particular, por ejemplo: en relación a edad, género, genotipo/fenotipo, etnias o razas o ubicación geográfica; o bien en relación a alguna alteración específica del estado de salud. En los modelos *ex vivo*, la microbiota aislada se mantiene en ambientes artificiales (*in vitro*) bajo condiciones controladas. Para este fin, las poblaciones microbianas deberían ser inicialmente aisladas de su hábitat natural, es decir del tracto gastrointestinal, primordialmente del colon; sin embargo debido las cuestiones éticas y técnicas que tendrían que enfrentarse para tener acceso a esta parte del cuerpo humano y tomar de ahí las muestras, se ha optado por recuperar la microbiota a partir de las heces fecales. (Roeselers G., Ponomarenko M., Lukovac S., Wolterboer H., 2013. *Ex vivo systems to study host–microbiota interactions in the gastrointestinal tract. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. Vol.27:101-113; Wei-Kai W, Chieh-Chang C, Suraphan P, Rou-An C, Ming-Shiang W, Lee-Yan S, Shan-Chwen C. 2018. Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. J Formos Med Assoc. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.005; Vogtmann E, Chen J, Kibriya MG, Chen Y, Islam T, Eunes M, Ahmed A, Naher J, Rahman A, Amir A, Shi J, Abnet CC, Nelson H, Knight R, Chia N, Ahsan H, Sinha R. 2017. Comparison of fecal collection methods for microbiota studies in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 83: e00361-17. doi: 10.1128/AEM.0061-17).*

La recuperación de microbiota a partir de las heces fecales y su posterior estabilización y mantenimiento en sistemas *in vitro* implica retos que bajo diversas estrategias se han tratado de salvar en los procedimientos divulgados en el estado de la técnica. Diversos métodos de preservación de muestras fecales han resultado efectivos para la obtención de ácidos nucleicos con miras a la caracterización genotípica de la microbiota (Gaci N., Chaudhary P.P., Tottey W., Alric m., Brugère J., 2017. *Functional amplification and preservation of human gut microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease. Vol. 28, 1308070. doi:10.1080/16512235.2017.1308070*); pero respecto a la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos recuperados de dichas muestras el panorama es distinto. Aunque ya en el mantenimiento de la microbiota en los modelos *ex vivo* se lleve a cabo un manejo cuidadoso y controlado de parámetros como temperatura, pH, mantenimiento de ambientes anaerobios, tiempos de retención, y las sustancias nutricionales aportadas en los medios de cultivo utilizados, etc., para simular lo más fielmente posible las características ambiente-espacio-tiempo bajo las cuales llevan a cabo sus actividades metabólicas y funcionales los diversos integrantes de la microbiota intestinal, hay pasos críticos en las fases preliminares del establecimiento de los modelos *ex vivo* de simulación de tracto gastrointestinal, y de estos pasos críticos dependerá el nivel de significancia biológica que tendrá el modelo, es decir, que

se logre tener en el modelo de simulación una microbiota con la densidad poblacional adecuada, lo suficientemente diversa, estable y metabólicamente activa.

Algunos de estos aspectos se abordan por ejemplo en la patente EP 2750682 B1, en donde se describe un sistema micro-ecológico anaerobio que comprende microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada, una composición que comprende microbiota intestinal humana cultivada anaeróbicamente y un método de preparación de la misma. Se menciona en el documento que la composición constituye un cultivo funcional para reestablecer la normalidad de un microbioma humano afectado por enfermedades; como se describe en este documento, la composición se prepara de modo que se favorezca esencialmente el crecimiento de bacterias anaerobias incluyendo *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, con la finalidad de que su interacción con la microbiota intestinal dañada genere un efecto sinérgico que promueva el restablecimiento de las funciones fisiológicas y metabólicas.

La presencia de miembros de las familias bacterianas anaeróbicas antes mencionadas también se resalta en el documento WO 2016/139217, en el que se describe la preparación de una composición de microbiota intestinal humana a partir de muestras fecales de donadores sanos, para su uso en terapias de trasplante en el tratamiento de alguna condición relacionada a la disbiosis intestinal, derivada por ejemplo de infecciones producidas por *Clostridium difficile*; el cultivo de los microorganismos se lleva a cabo mediante proceso continuo en un fermentador anaeróbico, utilizando como medio de cultivo un medio nutritivo suplementado con fibra dietética.

En el documento US 9,433,651 B2, se divulgan composiciones para terapia de restauración de microbiota y los métodos para su fabricación y uso. El método de fabricación de la composición comprende la recolección de una muestra fecal humana, la adición de una solución salina como diluyente en el que se incluye un crioprotector (Polietilenglicol), la filtración de la muestra diluida para la recuperación de un filtrado que se transfiere a una bolsa de muestra que es sellada al momento de la transferencia, y posteriormente se preserva en condiciones de refrigeración/congelación. La composición resultante, que comprende una cantidad eficaz de la microbiota fecal y el crioprotector, es utilizada para terapia de restauración de microbiota por trasplante fecal. Y se menciona que factores como el tiempo de almacenamiento, la técnica de congelación/descongelación, la manipulación de la microbiota descongelada, entre otros son factores que pueden afectar la calidad de la muestra que se va a trasplantar por lo que se utilizan técnicas de cultivo microbiológico para confirmar la viabilidad y diversidad de la microbiota.

Otro ejemplo es el documento de patente US 20150037285 A1, en donde se refieren también métodos para transferir microbiota gastrointestinal preservando su viabilidad y bioactividad,

- incluso si están presentes organismos exigentes, anaeróbicos y no cultivables; se proporcionan ejemplos de cómo la manipulación de la microbiota gastrointestinal y la introducción de taxones particulares pueden usarse para afectar el estado metabólico de un individuo en el que se realiza trasplante de microbiota, particularmente en relación al peso, la grasa y la obesidad. Se describe en el documento que las muestras de heces deben ser depositadas en un contenedor con ambiente reducido (sin oxígeno), en una solución salina estéril, agua o algún otro medio de transporte aeróbico; en el caso de transporte de bacterias anaerobias, el ambiente anaeróbico consta de 90% nitrógeno, 5% hidrógeno y 5% dióxido de carbono en un contenedor que permita estas condiciones.
- 5
- 10 Y un caso más, se encuentra en el documento de patente US 2018/0099012 A1, que versa también sobre la preparación de composiciones de microbiota intestinal, obtenida de heces fecales de donadores sanos, y que son de aplicación en terapias de trasplante de microbiota fecal en el tratamiento de disbiosis intestinal provocada por ejemplo por infecciones de bacterias patógenas como *Clostridium difficile*. El método incluye los pasos de: recoger al
- 15 menos una muestra de microbiota fecal del sujeto donante, y en un período de menos de 5 minutos después de recoger la muestra colocarla en un dispositivo desprovisto de oxígeno; pero se debe de mezclar la muestra obtenida con al menos una solución salina acuosa que contenga al menos un crioprotector y posteriormente, filtrar la mezcla obtenida por medio de un filtro que comprende poros que tienen un diámetro de menos de o igual a 0.7 mm y
- 20 finalmente almacenar la mezcla obtenida a una temperatura de entre -15°C y -100°C.

Sin embargo, ha persistido hasta ahora la necesidad de mejorar los métodos de obtención, estabilización y mantenimiento, en tiempos óptimos, de poblaciones microbianas que pudieran considerarse representaciones biológicamente significativas de la microbiota humana intestinal. La microbiota obtenida para trasplante, de acuerdo con los métodos

25 anteriormente divulgados en el estado de la técnica, no se mantenía en cultivo, sino que solamente se establecían las condiciones óptimas para preservarla hasta el momento de su uso; con el riesgo constante de que se perdieran microorganismos por efecto de fallos en las técnicas microbiológicas aplicadas durante la manipulación de dicha microbiota.

#### Breve descripción de la invención

- 30 La invención que será descrita en lo sucesivo proporciona un sistema atractivo y rentable, en el que se integran distintos elementos que permite la estabilización de la microbiota intestinal humana, obtenida a partir de muestras de heces fecales, por lo que no es necesaria la implicación de técnicas invasivas.

El sistema de la invención está integrado por un kit para toma de muestra de heces fecales

35 diseñado para que al ser proporcionado a un donador o grupo de donadores, resulte sencillo

el procedimiento de colecta de las muestras a partir de las cuales se obtendrá la microbiota intestinal que asegure la viabilidad de los microorganismos que están contenidos en ella.

Otro elemento primordial de la invención consiste en un método cuya realización según las etapas y pasos que serán posteriormente descritos, permite lograr eficazmente la estabilización *in vitro* de microbiota intestinal humana proveniente de muestras de heces fecales de un donador o grupo de donadores con al menos una característica de interés específico para su estudio, que puede corresponder por ejemplo a una alteración como obesidad, donde el IMC es igual o mayor a 30, sin comorbilidades; o bien a otro tipo de alteraciones como la diabetes; la enfermedad inflamatoria intestinal; entre otras. Incluso, el donador o grupo de donadores pueden ser individuos en estado no alterado incluyendo niños sanos, adultos sanos, deportistas sanos, entre otros.

El método de la invención involucra la utilización de recipientes en donde se estarán realizando las reacciones de fermentación inherentes a la estabilización de la microbiota intestinal humana, que en lo sucesivo serán definidos como reactores, los cuales actúan de acuerdo con el método de la invención simulando respectivamente una o más regiones anatómicas del tubo digestivo. Como parte del método de la invención, se precisa establecer en los reactores las condiciones de al menos pH, agitación, y temperatura, en función de la región anatómica del tubo digestivo que se simulará. Estos valores están ampliamente difundidos en la literatura, por ejemplo es bien conocido que el pH en el estómago de un adulto sano fluctúa entre 2 a 2.5.

Y otro elemento primordial de la invención consiste en un medio de cultivo para la estabilización de la microbiota, diseñado tal que sin incurrir en altos costos permite lograr la estabilización de la microbiota intestinal obtenida de muestras de heces fecales, y permite también mantener la microbiota intestinal humana en condiciones *in vitro* aún durante periodos prolongados de tiempo necesarios para la realización del estudio de las poblaciones microbianas, de sus interacciones, y/o de simulaciones de una gama de procesos digestivos.

#### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1**, ejemplifica esquemáticamente los componentes principales del kit de toma de muestra de heces fecales: los contenedores (1) con tapa de cierre hermético (2), en donde (1a) corresponde al contenedor para la muestra en condiciones de anaerobiosis y (1b) corresponde al contenedor para la muestra aerobia; para el caso de muestra en anaerobiosis, en la cara interna de la tapa de cierre hermético (2) se incorpora una vela de tamaño tal que no tenga contacto con el contenido final (3); ambos contenedores incluyen un volumen de medio de cultivo para toma de muestra (4); el dispositivo para la colecta de muestra (5); y el instructivo para la toma de muestra (6).

La **Figura 2**, muestra un gráfico correspondiente al monitoreo de la microbiota de pacientes en situación de prediálisis, estabilizada conforme al método de la invención para un proceso de simulación de colon ascendente, colon transverso, y colon descendente. Se observó la presencia de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, y *Clostridium*; cuyas proporciones se mantuvieron durante la estabilización de la microbiota, respecto de las proporciones encontradas en la microbiota nativa de los pacientes donantes

La **Figura 3**, muestra un gráfico correspondiente al monitoreo de la microbiota de pacientes en situación de hemodiálisis, estabilizada conforme al método de la invención para un proceso de simulación de colon ascendente, colon transverso, y colon descendente. Se observó la presencia de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, y *Clostridium*; cuyas proporciones se mantuvieron durante la estabilización de la microbiota, respecto de las proporciones encontradas en la microbiota nativa de los pacientes donantes

La **Figura 4**, muestra un gráfico correspondiente al monitoreo de la microbiota de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, estabilizada conforme al método de la invención para un proceso de simulación de colon ascendente, colon transverso, y colon descendente. Se observó la presencia de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, y *Clostridium*; cuyas proporciones se mantuvieron durante la estabilización de la microbiota, respecto de las proporciones encontradas en los pacientes que donaron la microbiota inicial la cual es tomada como referencia para asegurar condiciones de microorganismos similares al intestino del paciente.

#### Descripción detallada de la invención

La invención a la que se hace mención en este documento se refiere a un sistema de estabilización de microbiota intestinal humana, en el que se integra un kit de toma de muestra de heces fecales para la recuperación de la microbiota intestinal; un medio de cultivo de estabilización de la microbiota intestinal obtenida de muestras de heces fecales; y, un método para la estabilización *in vitro* de la microbiota intestinal obtenida de muestras de heces fecales; elementos que en su conjunto permiten el aislamiento, estabilización, mantenimiento y aplicación de la microbiota intestinal en modelos *ex vivo* por ejemplo para la simulación de procesos de digestión, en donde la incorporación de la microbiota estabilizada permite realizar una gama de estudios sobre poblaciones de microorganismos provenientes de donadores pertenecientes a un grupo de interés por alguna característica o condición relacionada a edad, género, genotipo/fenotipo, etnias o razas o ubicación geográfica; o bien en relación a alguna alteración específica del estado de salud, por ejemplo causada por patógenos, por aspectos nutricionales, por obesidad, insuficiencia renal, desórdenes metabólicos, etc. La microbiota estabilizada, conforme a la presente invención, puede provenir también de un individuo particular para su utilización en simulaciones de procesos digestivos, para ensayar terapias

que tengan relación con la formación de metabolitos y el impacto que pueden tener sobre la microbiota intestinal, por ejemplo en casos de enfermedad inflamatoria intestinal.

Un primer aspecto de la invención comprende el kit de toma de muestra de heces fecales (Figura 1), el cual está diseñado para asegurar la diversidad, cantidad de la población, y actividad metabólica de los grupos aeróbicos y anaeróbicos. El kit incluye para cada donación/donante de muestra de heces fecales:

1) Al menos dos contenedores, preferentemente con una capacidad de 5 a 50 mL, fabricados con material que pueda ser esterilizado, y ambos con tapas de cierre hermético (2). En al menos uno de los contenedores (1a) está provista una vela (3) adherida a la cara interior de la tapa de cierre hermético, de manera que al encender la vela después de depositar la muestra y tapar el contenedor herméticamente, se lleve a cabo una reacción de conversión de oxígeno a CO<sub>2</sub> para generar un ambiente de anaerobiosis (muestra anaeróbica); en tanto que en al menos un contenedor (1b) se tendrá un ambiente aeróbico (muestra aerobia).

2) Un medio de cultivo de toma de muestra (4), que incluye fuentes de carbono como extracto de levadura (1-3 g/L) y peptona (1-3 g/L), sales inorgánicas como NaHCO<sub>3</sub> (0.1-0.1 g/L), NaCl (0.01-0.1g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01-0.1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01-0.1 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0.001-0.01 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.001-0.01 g/L), fuentes de nitrógeno como L-cisteína (0.1-1g/L), y una fuente de hierro que opcionalmente se puede seleccionar de entre sulfato ferroso, cloruro férrico, hemina y extracto de eritrocito (0.1-0.5 g/L). El medio de cultivo de toma de muestra (4) se proporciona en un volumen de entre 1 y 30 mL, estéril, incluido en los respectivos contenedores con tapas de cierre hermético (1a, 1b), de manera que actúa como medio de transporte de las muestras de heces fecales, preservando la viabilidad y actividad metabólica de la diversidad de microorganismos presentes en las muestras hasta el momento de su procesamiento, en un período de hasta 8 horas después de la deposición de las heces.

De manera opcional, en el kit se puede también incluir:

3) Al menos un dispositivo para la colecta de muestra (5), que debe estar fabricado en material que pueda aseptizarse, preferentemente en forma de cucharilla para la colecta de muestras de heces fecales de diferente consistencia, con una capacidad de entre 1 y 10 g de muestra.

4) Un instructivo de toma de muestra (6), para proporcionar las indicaciones específicas sobre la manera en que se debe realizar la colecta de la muestra de heces fecales.

Un segundo aspecto de la invención, comprende el medio de cultivo de estabilización de microbiota, que para su adecuado funcionamiento de conformidad con la invención, se proporciona en dos composiciones: la primera composición corresponde a un medio de cultivo base que comprende fuentes de carbono como extracto de levadura (1-3 g/L) y peptona (1-3 g/L), sales inorgánicas como NaHCO<sub>3</sub> (0.1-0.1 g/L), NaCl (0.01-0.1g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01-0.1

- g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.01-0.1 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0.001-0.01 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.001-0.01 g/L), fuentes de nitrógeno como L-cisteína (0.1-1g/L); y la segunda composición corresponde a un multivitamínico que incluye como mínimo por cada litro: biotina (5000 UI), pantotenato (10 mg), nicotinamida (5 mg), vitamina B12 (cianocobalamina) (5  $\mu\text{g}$ ), tiamina (100 mg), ácido benzoico o paraminobenzóico (vitamina C) (150 mg), menodiona (100 mg). El medio de cultivo de estabilización de microbiota aporta los nutrientes adecuados para preservar por largos períodos de tiempo de cultivo *ex vivo* las características deseadas de la microbiota obtenida de las muestras de heces fecales, a saber, diversidad, densidad de población y actividad metabólica.
- 10 Un tercer aspecto de la invención comprende el método para la estabilización *in vitro* de la microbiota aislada de muestras de heces fecales, para su posterior utilización en uno o más recipientes que cumplan con las características de un reactor, preferentemente de base plana con capacidad de trabajo que va de 100 a 1000 mL, en los que se establecen condiciones muy cercanas a las que prevalecen en el hábitat natural de la microbiota, para mantener los
- 15 cultivos aún durante prolongados períodos de tiempo, necesarios para la realización de diversas pruebas, por ejemplo en pruebas de simulación de digestión, en procesos colónicos, de interacción de los microorganismos con patógenos, por aspectos nutricionales, por obesidad, insuficiencia renal, desórdenes metabólicos, etc. La simulación puede ser realizada de un individuo particular para ensayar terapias que tengan relación con la formación de
- 20 metabolitos y el impacto que pueden tener sobre la microbiota intestinal, por ejemplo en casos de enfermedad inflamatoria intestinal.

El método de estabilización de microbiota de heces fecales comprende las etapas y pasos siguientes:

- I. Colecta de las muestras de heces fecales.
  - 25 a) determinar con base en una característica de interés específico de estudio el donador o grupo de donadores de las heces fecales; por ejemplo se seleccionan individuos con una característica metabólica definida que puede corresponder a una alteración como obesidad, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, etc., o a individuos en estado no alterado como niños sanos, adultos sanos, deportistas sanos, entre otras.
  - 30 b) proporcionar un kit de toma de muestra, al individuo o individuos donantes seleccionados, que esté equipado con al menos dos contenedores con tapa de cierre hermético (2); conteniendo cada uno de los contenedores preferiblemente un volumen de entre 1y 30 mL de medio de toma de muestra, estéril; en donde en al menos uno de los contenedores se pueda generar un ambiente de anaerobiosis (contenedor 1a) mediante la
  - 35 provisión de una vela (3) adherida a la cara interior de la tapa de cierre hermético, para que el donador la encienda después de depositar la muestra, y que al tapar herméticamente el

contenedor (1a) se lleve a cabo una reacción de conversión de oxígeno a CO<sub>2</sub> que propicie la condición de anaerobiosis adecuada para tener una muestra anaeróbica; y en donde en al menos un contenedor (1b) se tenga un ambiente aeróbico que permita obtener una muestra aerobia; y solicitar al individuo o individuos donantes entregar las muestras en un período no mayor a 8 h posterior a la deposición de las heces fecales.

c) obtener por cada donante/donación por lo menos una muestra aeróbica, en la cual se ha asegurado la permanencia de microorganismos aeróbicos, y una muestra anaeróbica, en la cual se ha asegurado la permanencia de microorganismos anaeróbicos.

## II. Procesamiento de las muestras de heces fecales.

a) combinar las muestras aeróbica (contenedor 1b) y anaeróbica (contenedor 1a) en un tubo colector, adecuado para separar por centrifugación una fase sobrenadante, en la que están contenidas las bacterias de la microbiota, de una fase orgánica, que consiste en la pastilla formada después de la centrifugación.

b) verificar la viabilidad y diversidad de las bacterias presentes en la microbiota aislada de las heces fecales, por medio de al menos una de las técnicas microbiológicas ya conocidas en el estado de la técnica; por ejemplo la utilización de medios selectivos, la determinación de microorganismos por métodos moleculares, o bien cualquier otra metodología que permita constatar que la microbiota aislada es viable y diversa.

Para el aspecto de diversidad, se considerará necesaria la presencia de por lo menos entre 4 y 10 grupos bacterianos de interés, por ejemplo *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Clostridium spp*, *Salmonella spp*, *Enterobacteriae spp*, *Prevotella spp*, o aquellos que sean de interés particular según el proceso que se esté realizando; en tanto que en el aspecto de viabilidad se considerará necesario que los grupos bacterianos de interés obtenidos estén metabólicamente activos, es decir que sean capaces de reproducirse y formar al menos un metabolito de interés por ejemplo ácidos grasos de cadena corta (ácido láctico, ácido butírico, ácido propiónico) entre otros.

## III. Estabilización y mantenimiento *ex vivo* de los cultivos de microbiota.

a) preparar uno o más recipientes que actuarán como reactores para simular una región anatómica específica del tubo digestivo, preferentemente, de base plana con capacidad de trabajo que va de 100 a 1000 mL en donde se realizará la estabilización de la microbiota; en donde la preparación se refiere a colocar un medio base para la estabilización de la microbiota intestinal obtenida de muestras de heces fecales, que puede ser el 10% del volumen de trabajo del reactor que comprende: extracto de levadura (1-3 g/L), peptona (1-3 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (0.1-0.1 g/L), NaCl (0.01-0.1g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01-0.1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01-0.1 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0.001-

0.01 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.001-0.01 g/L), y L-cisteína (0.1-1g/L); y mantener dicho medio base en condiciones de esterilidad;

- b) inocular un volumen de sobrenadante obtenido en el paso II-a, correspondiente al 10% del volumen total de medio de cultivo del paso III-a; donde el sobrenadante se obtiene al
- 5 combinar las muestras aeróbica (contenedor 1b) y anaeróbica (contenedor 1a) en un tubo adecuado para separar por centrifugación una fase sobrenadante, en la que están contenidas las bacterias de la microbiota, de una fase orgánica, que consiste en la pastilla formada después de la centrifugación.
- c) establecer las condiciones de al menos pH, agitación, temperatura, en función de la
- 10 región anatómica del tubo digestivo que se simulará en el reactor o reactores;
- d) mantener el cultivo en incubación a 37°C, con agitación constante para mantener en contacto e interacción todos los elementos contenidos en el reactor;
- e) cada 24 horas verificar el pH y adicionar una solución multivitamínica que incluye como
- 15 mínimo por cada litro: biotina (5000 UI), pantotenato (10 mg), nicotinamida (5 mg), vitamina B12 (cianocobalamina) (5 µg), tiamina (100 mg), ácido benzoico o paraminobenzóico (vitamina C) (150 mg), menodiona (100 mg), repitiendo esta operación hasta que el pH se estabilice y sea constante por al menos 3 días consecutivos y que la proporción de microorganismos se mantenga respecto de la proporción de microorganismos de la muestra inicial; y
- 20 f) llevar a cabo un segundo paso de verificación de la viabilidad y diversidad de la microbiota de manera similar a lo realizado en el paso II-b.

Para considerar que la microbiota se ha estabilizado exitosamente se deben considerar al menos tres criterios: 1) que sea variable, es decir, que se puedan identificar de entre 4 y 10 grupos bacterianos de interés en la microbiota estabilizada; 2) que sea estable, lo cual se

25 determina cuando el pH de las diferentes secciones simuladas se mantiene constante; 3) que los microorganismos se encuentren no solo viables sino metabólicamente activos, es decir que sean capaces de reproducirse y formar al menos un metabolito de interés. Cada parte del proceso de estabilización se puede verificar usando diversas técnicas, diversos métodos y diversos instrumentos, de acuerdo a las necesidades y condiciones del usuario.

30 Finalmente si la microbiota estabilizada se desea preservar, puede usarse cualquier método de preservación descrito con anterioridad, por ejemplo mezclar la microbiota estabilizada con glicerol al 70% en proporción 1:1, congelar rápidamente en un sistema de congelación rápida para luego ser pasado a mantenimiento en congelación a -80°C.

### Ejemplos de aplicación de la invención

Con la finalidad de proporcionar elementos que permitan una mayor comprensión del concepto inventivo que da lugar a la presente, se describen a continuación ejemplos de aplicación de la invención, en el entendido de que son ejemplos meramente ilustrativos sin estar destinados en modo alguno a limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Estabilización de microbiota intestinal de pacientes en prediálisis y hemodiálisis.

Se realizó el análisis de microbiota intestinal de cada población estudiada. Se analizaron 5 pacientes en situación de prediálisis y 5 pacientes en situación de hemodiálisis. En el caso de pacientes en situación de prediálisis todos los pacientes resultaron positivos a la presencia de *Clostridium perfringens* y negativos a la presencia de levaduras, al igual que la microbiota de pacientes en estado de hemodiálisis, sin embargo la proporción de los grupos bacterianos se mostró con diferencias sustanciales como puede apreciarse. En los individuos en prediálisis guardó la proporción *Lactobacillus* 26.6%, *Bifidobacterium* 20%, *Salmonella* 26%, *Clostridium* 26.6%; la cual se toma como referencia para considerar la microbiota estabilizada, que como puede observarse guarda la misma proporción de las bacterias medidas. En el caso de pacientes en hemodiálisis se guarda la proporción *Lactobacillus* 23.8%, *Bifidobacterium* 26.1%, *Salmonella* 23%, *Clostridium* 27% que se mantiene en la microbiota estabilizada, como puede verificarse en las tablas 1 y 2 y las figuras 2 y 3.

En la tabla 2 se muestra el análisis de microbiota intestinal de pacientes en hemodiálisis, además de los 4 grupos se evaluó *Clostridium perfringens* y levaduras. Se observó que el 100% de los pacientes tanto en prediálisis como hemodiálisis mostraron la presencia de *Clostridium perfringens*. Ninguno de los pacientes mostró la presencia de levaduras en heces.

Tabla 1. Análisis de microbiota en pacientes en situación de prediálisis

Pacientes en situación de prediálisis						
paciente	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>	Levaduras
1	6.00E+05	3.50E+05	1.27E+06	3.05E+08	positivo	negativo
2	1.60E+07	6.20E+06	3.50E+06	1.30E+07	positivo	negativo
3	1.50E+06	8.20E+06	3.00E+06	1.10E+07	positivo	positivo
4	2.10E+07	4.70E+06	2.50E+06	9.50E+06	positivo	negativo
5	2.70E+07	1.30E+07	3.50E+06	2.30E+07	positivo	positivo

Para los géneros bacterianos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* y *Clostridium* los datos representan la UFC/g de muestra fecal. Para *clostridium perfringens* y levaduras los datos se presentan como positivo (presencia) y negativo (ausencia).

Tabla. 2 Análisis de microbiota intestinal de pacientes en situación de hemodiálisis.

Pacientes en situación de hemodiálisis						
paciente	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>	Levaduras
1	7.10E+07	5.80E+07	2.50E+07	7.50E+07	positivo	negativo
2	5.80E+07	1.50E+08	5.50E+06	5.30E+07	positivo	negativo
3	3.40E+06	3.60E+07	8.30E+06	8.00E+07	positivo	negativo
4	9.00E+06	1.50E+07	5.90E+06	1.40E+07	positivo	negativo
5	7.60E+05	4.30E+05	5.50E+05	3.60E+05	positivo	negativo

Para los géneros bacterianos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* y *Clostridium* los datos representan la UFC/g de muestra fecal. Para *clostridium perfringens* y levaduras los datos se presentan como positivo (presencia) y negativo

### Ejemplo 2. Estabilización de microbiota de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal

Se tomaron muestras de 15 pacientes que presentaron enfermedad inflamatoria intestinal, específicamente Colitis Ulcerativa Inflamatoria Inespecífica (CUCI) de los cuales se realizó el análisis individual (tabla 3) que fue tomada como referencia para estabilizar la microbiota.

Se puede observar que la proporción de los grupos analizados se mantiene en la microbiota estabilizada como se muestra en la Figura 4. En el caso de los pacientes con CUCI si hubo presencia de *Clostridium perfringens* y levaduras en diferentes pacientes por lo que asumimos que la microbiota estabilizada contendrá tanto levaduras como agentes potencialmente precursores de inflamación como *C. perfringens*.

Tabla. 3 Análisis de microbiota intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal

Pacientes con diagnóstico de CUCI						
Pacientes	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>	Levaduras
1	1.2E+07	9.8E+07	2.3E+07	2.6E+08	Positivo	Positivo
2	1.0E+04	6.7E+05	7.0E+04	9.0E+05	Positivo	Positivo
4	5.1E+06	8.5E+07	6.0E+06	1.4E+08	Negativo	Positivo
5	4.3E+07	2.7E+08	3.1E+07	3.0E+08	Negativo	Positivo
7	3.6E+05	6.6E+06	1.8E+06	6.8E+06	Positivo	Positivo
8	1.1E+07	2.4E+08	1.5E+08	8.0E+08	Negativo	Positivo
9	7.8E+05	1.7E+07	2.2E+06	1.5E+07	Positivo	Positivo
10	2.0E+06	3.1E+08	3.1E+07	1.4E+08	Negativo	Positivo
11	5.0E+06	6.3E+06	1.3E+07	4.8E+06	Positivo	Positivo
12	9.0E+04	1.3E+06	1.0E+06	5.5E+06	Negativo	Positivo
13	4.0E+04	2.0E+06	3.0E+05	8.0E+06	Negativo	Positivo
15	6.7E+05	9.1E+06	4.7E+05	1.4E+07	Negativo	Positivo

Para los géneros bacterianos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* y *Clostridium* los datos representan la UFC/g de muestra fecal. Para *Clostridium perfringens* y levaduras los datos se presentan como positivo (presencia) y negativo (ausencia).

Como puede apreciarse las proporciones de los grupos bacterianos contabilizados se mantienen en la microbiota estabilizada respecto de la microbiota original que se mantienen en la siguientes proporciones: *Lactobacillus* 21.75%, *Bifidobacterium* 26.3%, *Salmonella* 24%, *Clostridium* 27.3%.

## REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo para la estabilización de microbiota intestinal obtenida de muestras de heces fecales, caracterizado porque consiste de dos composiciones, en donde la primera composición corresponde a un medio de cultivo base que comprende: extracto de levadura (1-3 g/L), peptona (1-3 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (0.1-0.1 g/L), NaCl (0.01-0.1g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01-0.1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01-0.1 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0.001-0.01 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.001-0.01 g/L), y L-cisteína (0.1-1g/L); y la segunda composición corresponde a un multivitamínico que incluye como mínimo por cada litro: biotina (5000 UI), pantotenato (10 mg), nicotinamida (5 mg), vitamina B12 (cianocobalamina) (5 µg), tiamina (100 mg), ácido benzóico o paraminobenzóico (vitamina C) (150 mg), menodiona (100 mg), en donde el medio de cultivo base incluye además una fuente de hierro que opcionalmente se puede seleccionar de entre sulfato ferroso, cloruro férrico, hemina y extracto de eritrocito (0.1 – 0.5 g/L).
2. Un kit de toma de muestra de heces fecales para aislamiento y estabilización de microbiota intestinal humana, caracterizado porque comprende:
  - i) al menos dos contenedores **(1)** con tapas de cierre hermético **(2)**, estando provista una vela **(3)** adherida a la cara interior de la tapa de cierre hermético en al menos uno de los contenedores **(1a)** para preservar los microorganismos anaeróbicos, una vez que al encender la vela después de depositar la muestra y tapar el contenedor herméticamente, se lleve a cabo una reacción de conversión de oxígeno a CO<sub>2</sub> para generar un ambiente de anaerobiosis; en tanto que en al menos un contenedor **(1b)** sin vela adherida, se mantendrá la muestra en un ambiente aeróbico para preservar los microorganismos aeróbicos; y
  - ii) un medio de cultivo base **(4)**, donde dicho medio de cultivo base es la primera composición del medio de cultivo de conformidad con la reivindicación 1; y
  - iii) al menos un dispositivo para la colecta de muestra **(5)** fabricado en material susceptible de ser asepticado, y que tiene preferentemente una forma de cucharilla para la colecta de muestras de heces fecales de diferente consistencia.
3. El kit de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los contenedores **(1)** con tapa de cierre hermético **(2)** tienen preferentemente una capacidad de 5 a 50 mL, y son fabricados con material susceptible de ser esterilizado.
4. El kit de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque opcionalmente se incluye un instructivo de toma de muestra, en el que se proporcionan al donador o donadores las indicaciones específicas sobre la manera en que se debe realizar la colecta de la muestra de heces fecales.

5. Un método para la estabilización *in vitro* de microbiota intestinal humana proveniente de heces fecales, en donde dicho método comprende las etapas y pasos siguientes:
- I. Colectar las muestras de heces fecales mediante los siguientes pasos:
    - a) determinar el donador o grupo de donadores de las heces fecales con base en una característica de interés específico correspondiente a una alteración metabólica incluyendo obesidad, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal; o bien de individuos en estado no alterado incluyendo niños sanos, adultos sanos, y deportistas sanos;
    - b) tomar las muestras del donador o grupo de donadores de conformidad con el paso (a)-I con el kit de toma de muestra de heces fecales y estabilización de microbiota intestinal humana de conformidad con la reivindicación 2, solicitando entregar las muestras en un período no mayor a 8 h posterior a la deposición de las heces fecales;
    - c) obtener por cada donante/donación por lo menos una muestra aeróbica, en la cual se ha asegurado la permanencia de microorganismos aeróbicos, y una muestra anaeróbica, en la cual se ha asegurado la permanencia de microorganismos anaeróbicos;
  - II. Procesar las muestras de heces fecales por medio de los pasos siguientes:
    - a) combinar las muestras aeróbica y anaeróbica en un tubo colector, adecuado para separar por centrifugación una fase sobrenadante, en la que están contenidas las bacterias de la microbiota, de una fase orgánica, que consiste en la pastilla formada después de la centrifugación;
    - b) verificar la viabilidad y diversidad de la microbiota recuperada en la fase sobrenadante del paso (a), por medio de al menos una técnica microbiológica;
  - III. Estabilizar la microbiota aislada y mantenerla en modelos *ex vivo* mediante los pasos siguientes:
    - a) preparar uno o más recipientes que actuarán como reactores para simular una región anatómica específica del tubo digestivo, preferentemente, de base plana con capacidad de trabajo que va de 100 a 1000 mL para la estabilización de la microbiota; en donde la preparación se refiere a colocar la composición que corresponde al medio de cultivo base para la estabilización de la microbiota obtenida de las muestras de heces fecales, en una proporción de 10% del volumen de trabajo del reactor; y mantener dicho medio base en condiciones de esterilidad;
    - b) inocular un volumen de sobrenadante obtenido en el paso II-a, correspondiente al 10% del volumen total de medio de cultivo del paso III-a;

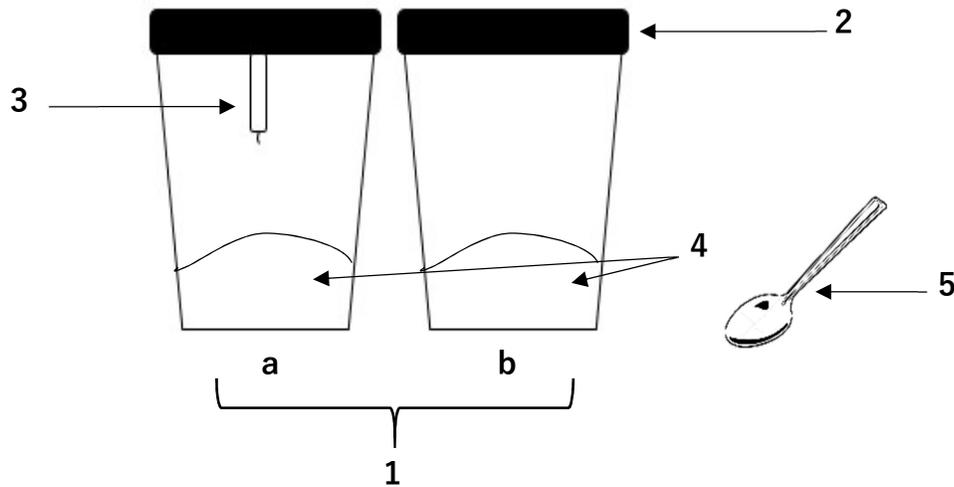
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- c) establecer las condiciones de al menos pH, agitación, temperatura, en función de la región anatómica del tubo digestivo que se simulará en el reactor, y de los valores reportados en la literatura;
  - d) mantener el cultivo en incubación a 37°C, con agitación constante para mantener en contacto e interacción todos los elementos contenidos en el reactor;
  - e) cada 24 horas verificar el pH y adicionar, en una proporción de 10 % del volumen de trabajo del reactor, la composición que corresponde al multivitamínico del medio de cultivo para la estabilización de la microbiota, repitiendo esta operación hasta que el pH se estabilice y sea constante por al menos 3 días consecutivos y que la proporción de microorganismos se mantenga respecto de la proporción de microorganismos de la muestra inicial;
  - f) llevar a cabo un segundo paso de verificación de la viabilidad y diversidad de la microbiota de manera similar a lo realizado en el paso II-b.
6. El método de conformidad con la reivindicación 5, en donde las técnicas microbiológicas para la verificación del paso II-b incluyen la utilización de medios selectivos; y/o la determinación de microorganismos por métodos moleculares; y/o bien cualquier otra metodología que permita constatar que la microbiota aislada es viable y diversa.
7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la diversidad de la microbiota es aceptable si se identifican mediante las técnicas microbiológicas por lo menos entre 4 y 10 grupos bacterianos de interés.
8. El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde la viabilidad de la microbiota es aceptable si se detecta mediante las técnicas microbiológicas que los grupos bacterianos de interés obtenidos estén metabólicamente activos, es decir que sean capaces de reproducirse y formar al menos un metabolito de interés seleccionado.

## RESUMEN

La presente invención pertenece al campo de la microbiología industrial y la simulación *in vitro* de procesos digestivos humanos, en donde la microbiota gastrointestinal juega un papel relevante en los procesos bioquímicos y fisiológicos ocurridos durante la digestión de alimentos. La invención consiste en un sistema de estabilización de microbiota intestinal humana obtenida por métodos no invasivos de muestras de donadores con al menos una característica de interés específico para su estudio (edad, género, genotipo/fenotipo, etnia, raza, ubicación geográfica, etc.); o bien en relación a alguna alteración específica del estado de salud (por patógenos, nutrición, desórdenes metabólicos, etc.). El sistema de la invención comprende un kit, un medio de cultivo y un método, que conjuntamente posibilitan la estabilización *in vitro* de la microbiota recuperada de las muestras y su mantenimiento durante períodos prolongados de tiempo, para su utilización en simulaciones de proceso digestivos para ensayar terapias relacionadas con la formación de metabolitos y su potencial impacto sobre la microbiota, o para determinaciones de diversidad, estabilidad y funcionalidad metabólica por efecto de condiciones patológicas, tipo de alimentación y/o intervenciones nutricionales, tratamientos médicos, entre otros, que pueden repercutir en la salud humana.

20

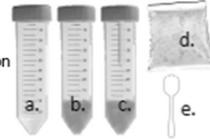
**Figura 1**



**PROTOCOLO PARA TOMA DE MUESTRA DE HECES**

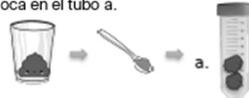
Kit para toma de muestra:

- a. 1 tubo vacío
- b. 1 tubo con medio de cultivo
- c. 1 tubo con medio de cultivo y con una vela en la tapa
- d. Un gel refrigerante
- e. Una palita para recolección de muestra



La muestra debe ser tomada de la primera evacuación del día con ayuda de un objeto desechable para evitar el contacto de la muestra con el agua del W.C.

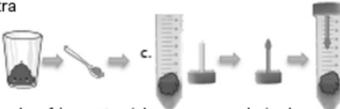
1. De la muestra obtenida se toma una porción con la palita y se coloca en el tubo a.



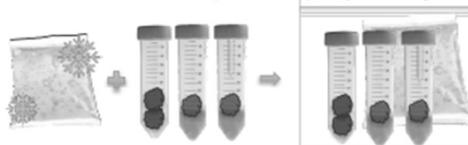
2. De la muestra obtenida se toma otra porción con la palita y se coloca en el tubo b.



3. De la muestra obtenida se toma otra porción con la palita y se coloca en el tubo c. (Tiene VELA en la tapita). Antes de cerrar el tubo se enciende la vela. Con la vela ENCENDIDA se cierra el tubo. (la vela debe apagarse dentro del tubo, no importa si cae cera sobre la muestra)

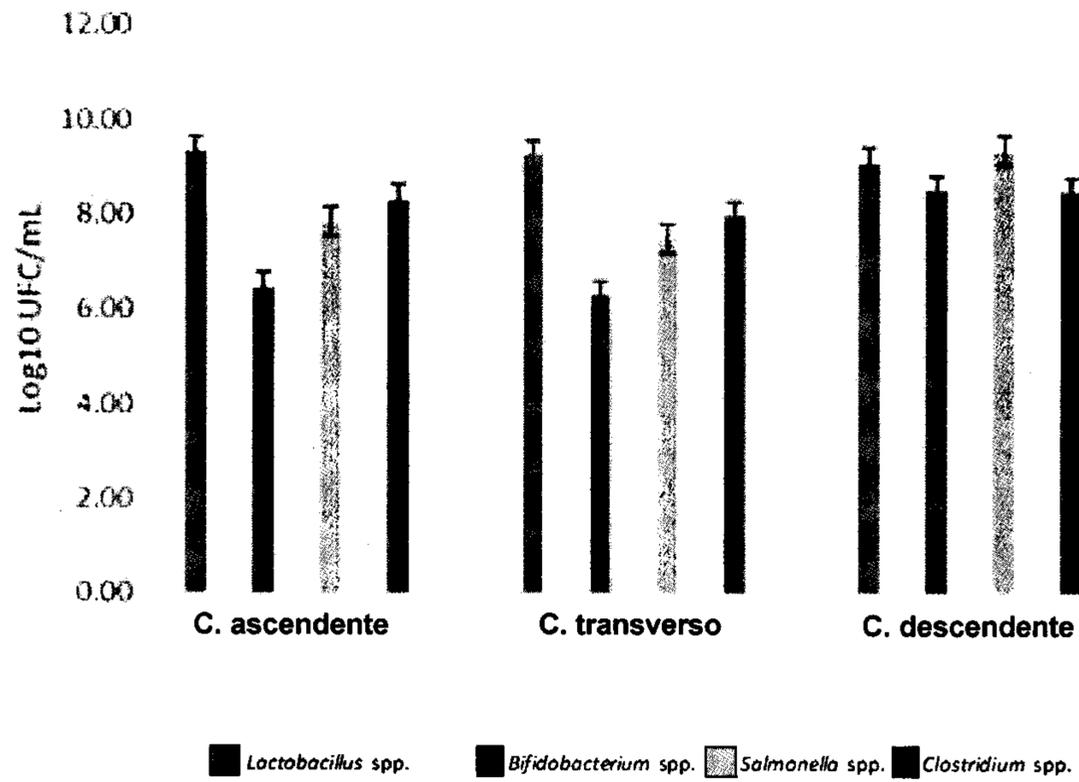


4. El gel refrigerante debe ser congelado horas antes de la recolección de muestra. Y colocarse dentro de una bolsa plástica con los tres tubos con muestra para su transporte y ser entregados.



← 6

**Figura 2**



**Figura 3**

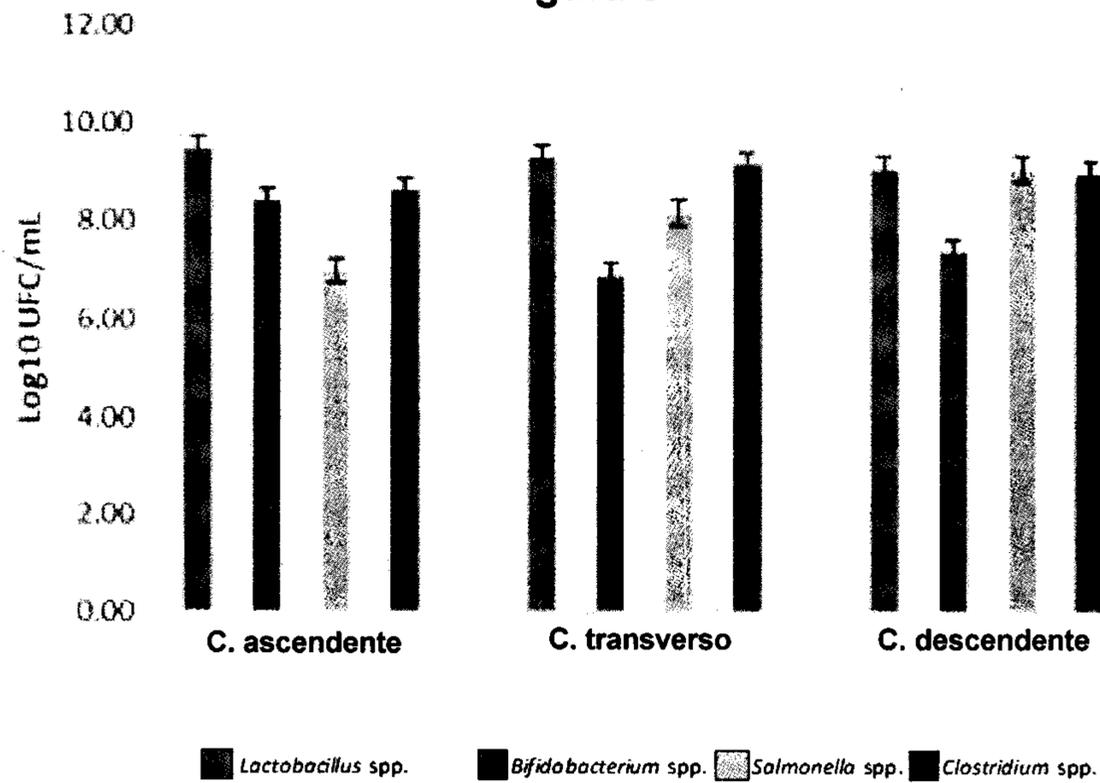


Figura 4

