

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 974**

51 Int. Cl.:

A61K 36/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2010 E 10749635 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2470213**

54 Título: **Composición para el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos, método y uso que comprende levadura electromagnéticamente irradiada**

30 Prioridad:

26.08.2009 SE 0950613

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

07.02.2014

73 Titular/es:

**MILMED AB (100.0%)
Industrigatan 18
386 32 Färjestaden, SE**

72 Inventor/es:

**TÖRNQVIST, KENT;
SIBILEVA, MARIA;
EK, PETER;
FREDRIKSSON, ANDERS;
ARCHER, TREVOR;
BLOMQVIST, TATIANA;
MUDRIK, DMITRY;
GOLANT, NATALIA y
BALAKIREVA, LUDMILA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 974 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos, método y uso que comprende levadura electromagnéticamente irradiada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos, así como un método para producir tal composición.

Antecedentes

10 Las enfermedades o trastornos neurodegenerativos son afecciones en las que se pierden células del cerebro y la médula espinal. El cerebro y la médula espinal se componen de neuronas que realizan diferentes funciones. Tales funciones pueden controlar los movimientos, procesar la información sensorial, o tomar decisiones. Las células del cerebro y la médula espinal no se regeneran fácilmente, de manera que el daño excesivo puede ser irreversible. Las enfermedades neurodegenerativas son el resultado de un deterioro de las neuronas o de su vaina de mielina que con el tiempo dará lugar a una disfunción o a diferentes clases de enfermedades o trastornos.

15 La apoptosis es un fenómeno que se produce en el tejido neuronal para impedir que las células lesionadas dañen a las células intactas del organismo, durante el desarrollo del sistema nervioso. Durante la apoptosis las células experimentan una serie de cambios morfológicos, los cuales comprenden contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, etc. El control disfuncional de la apoptosis ocasiona muertes de células extremas, por ejemplo en la enfermedad de Parkinson y en la enfermedad de Alzheimer.

20 El tratamiento inicial de las enfermedades o trastornos neurodegenerativos depende del diagnóstico y el progreso de la enfermedad o trastorno específicos. En la actualidad existen pocas terapias conocidas en la técnica para la amplia gama de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que existen.

25 Para la enfermedad de Parkinson, el tratamiento con L-dihidroxi-fenil-alanina (L-dopa; levodopa) puede inhibir los síntomas durante un corto período de tiempo, pero después, provoca la aceleración de los síntomas. También se están realizando esfuerzos para desarrollar terapias para la enfermedad de Alzheimer que estabilicen la función cognitiva al nivel existente en el momento del diagnóstico inicial. De un modo similar, otras enfermedades o trastornos neurodegenerativos, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o afecciones relacionadas con la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, estas terapias a menudo tienen un efecto limitado, son costosas y se pueden asociar con graves efectos secundarios. Tampoco son preventivas.

30 El documento EP 1375653 describe el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades del sistema nervioso central con células de levadura que han sido irradiadas con ondas electromagnéticas en el intervalo de 13050 hasta 13150 GHz.

De este modo, existe una necesidad de nuevos métodos y composiciones que permitan un mejor tratamiento o prevención de las enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

Compendio

35 Por consiguiente, la presente invención busca mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias identificadas anteriormente y proporcionar un tratamiento mejorado de la clase referida, y las composiciones utilizadas específicamente en la misma.

40 Para este fin, en un primer aspecto, se proporciona una composición que comprende células de levadura tratadas con, o desarrolladas a partir de células de levadura tratadas con ondas electromagnéticas en el intervalo de 30 GHz a 300 GHz, para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

Una ventaja con la composición de la invención es que permite un tratamiento mejorado y rentable de las enfermedades o los trastornos neurodegenerativos.

45 En un segundo aspecto, se proporciona un método para preparar una composición de acuerdo con el primer aspecto. Dicho método comprende las etapas de preparar un medio de crecimiento, esterilizar o pasteurizar dicho medio de crecimiento, cultivar células de levadura en dicho medio de crecimiento y tratar dichas células de levadura con ondas electromagnéticas, en donde dichas ondas electromagnéticas están en el intervalo de 30 GHz a 300 GHz.

Otras características ventajosas de la invención y sus realizaciones se definen en las reivindicaciones adjuntas y en la descripción detallada.

50

Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, características y ventajas de los que es capaz la invención, resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones ilustrativas de la presente invención, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que

5 La Fig. 1A es un diagrama que muestra una curva de crecimiento de células de levadura no tratadas y la Figura 1 B es un diagrama que muestra una curva de crecimiento de las células tratadas de acuerdo con una realización;

La Fig. 2 describe una ilustración de un aparato experimental. La Fig. 2A es una vista lateral y la Fig. 2B es una vista frontal;

10 La Fig. 3 es un diagrama que muestra el contenido de DA en el cuerpo estriado de ratones utilizados para someter a ensayo la invención;

La Fig. 4 son diagramas que muestran los valores medios y la DT para la locomoción, la exploración aérea y la actividad total, en diferentes momentos, respectivamente;

15 La Fig. 5 son diagramas que muestran los valores medios y la DT para la locomoción, la exploración aérea y la actividad total, respectivamente, y

Las Figs. 6 a 15 son diagramas que muestran diferentes resultados de los estudios.

Descripción detallada

20 El uso de ondas milimétricas electromagnéticas de baja intensidad en áreas no tradicionales, como la medicina, la biología y la biotecnología es una tendencia que se originó en Rusia a mediados de la década de 1960 como resultado de un trabajo pionero realizado por M. B. Golant et al. Las ondas milimétricas son ondas electromagnéticas con frecuencia extremadamente alta, también denominadas ondas EHF. La frecuencia está en el intervalo de aproximadamente 30 GHz a aproximadamente 300 GHz. Estas ondas son absorbidas en gran medida por el agua y otros medios acuosos, y tienen diversos efectos sobre los organismos biológicos. La profundidad de penetración de la radiación EHF en el tejido es de solo de fracciones de milímetro. Al mismo tiempo, los experimentos directos con organismos vivos indicaron que el impacto de EHF en la superficie de un cuerpo vivo también influye en el tejido situado a una distancia del sitio expuesto a la radiación.

25 Existen numerosas investigaciones experimentales, que indican la influencia de las ondas milimétricas de baja intensidad en los procesos químicos, bioquímicos y metabólicos en células y sistemas modelo. Por ejemplo, se ha demostrado que las ondas milimétricas aceleran el transporte activo de iones Na⁺, influyen en la conductividad de las membranas lipídicas y estimulan la síntesis de ATP en la célula. Se cree que las ondas en el intervalo EHF son el instrumento principal utilizado por los sistemas de autorregulación de los organismos para recuperar las funciones alteradas y mantener la homeostasis. En Rusia, se han tratado más de 2.000.000 de pacientes con la terapia de EHF y se ha demostrado que es eficaz contra las enfermedades y los síntomas por ejemplo en el tracto gastrointestinal. Además, la terapia con EHF se puede utilizar como un complemento a los tratamientos con fármacos y otras clases de radiación, ya que reduce el estrés y alivia el dolor.

30 Las ondas EHF son facilitadas por circuitos de resonancia formados por estructuras de proteínas de larga duración en conexión con membranas celulares. Esta facilitación se produce a expensas de la energía, que se toma del metabolismo de la célula.

35 La membrana celular es una bicapa de lípidos que comprende proteínas. También está polarizada, lo que significa que existe un potencial eléctrico entre las superficies externa e interna de la membrana. Las diferentes desviaciones de las funciones de las celulares normales están siempre acompañadas por la aparición de una asimetría eléctrica en la membrana celular. Las ondas acústicas que se propagan a lo largo de las membranas causan cambios periódicos en el grosor de la membrana determinado por el factor de Poisson. El período espacial de cambios en el espesor de la membrana es igual a la longitud de onda acústica. En las membranas dieléctricas polarizadas tales cambios de espesor están acompañados de cambios en el campo eléctrico, con el mismo periodo de tiempo y espacio que las ondas acústicas. Estas ondas en la membrana celular son denominadas por lo tanto ondas electro-acústicas.

40 Los organismos vivos producen señales de EHF por sí mismos, en sus membranas. Sin embargo, en las células con una distribución eléctrica simétrica y funciones normales, no hay razones para la generación de frecuencias de resonancia concretas. Pero si se producen estas señales, se pueden enviar a través de la masa celular de un organismo, ampliando el efecto de la radiación externa. La radiación EHF se utiliza para la recuperación por el propio organismo. Esta recuperación se organiza con carácter excepcional por el sistema cibernético perfecto, que gestiona los procesos de recuperación y mantenimiento de la homeostasis del organismo. Los sistemas de información de todas las células, órganos y sistemas del organismo participan en el funcionamiento

de este sistema y los procesos de recuperación en todos los elementos del organismo son controlados por sus propias señales que reflejan peculiaridades de los trastornos producidos.

Las ondas de resonancia en las células también se deben a la radiación EHF externa. La radiación EHF externa puede por lo tanto ser transformada en ondas de resonancia, ondas EHF internas, producidas por las propias células, con el propósito de la recuperación. Las propias células pueden lograr la restauración de la simetría eléctrica sin estimulación EHF externa. Sin embargo, si las células están deprimidas de cualquier manera la restauración natural podría ser lenta o no tener lugar. En estos casos la radiación EHF se puede utilizar para la aceleración de la restauración. Esta es la razón para el tratamiento mediante la radiación EHF, pero puesto que sería imposible desarrollar un conjunto preciso de señales con la ayuda de un dispositivo técnico externo se pueden inducir ondas EHF internas. Los seres humanos, por ejemplo, consisten en tanto como 10^{13} células, cada uno con un potencial para generar un sistema de señales individual, que sería imposible de regenerar. Sin embargo, si las células se tratan con señales externas, los sistemas de información de las células, órganos y funciones del organismo transforman estas señales en ondas electro-acústicas EHF internas coherentes que corresponden a los mecanismos naturales de la propia recuperación en estas células.

Gracias a tal transformación la radiación EHF externa contribuye a la formación de señales necesarias para la recuperación de un organismo. La restauración de la simetría eléctrica en una membrana da como resultado la terminación de los mecanismos que generan las ondas electro-acústicas. Como resultado, las subestructuras de proteínas temporales que aparecen en las membranas de las células se disuelven gradualmente después de que las funciones se normalicen.

Hay más de mil diferentes tipos de moléculas de proteínas en células cuyas bandas de frecuencia de resonancia se solapan con la banda EHF. Las oscilaciones dipolares de tales moléculas causan ondas EHF a expensas de la energía extraída de metabolismo celular. Se ha demostrado que las proteínas forman conglomerados en regiones de la membrana en las que la perturbación eléctrica es grande. De este modo, las proteínas ubicadas a lo largo de una superficie de membrana pueden proporcionar oscilaciones de las amplitudes que crean ondas electro-acústicas.

Por otra parte, ya que las ondas no pueden propagarse a través del espacio libre, los conglomerados en los que las oscilaciones se encuentran en fase entre sí funcionan como una red de antenas que envían la señal a las células vecinas. Por lo tanto, los mecanismos desencadenados por la radiación EHF en los organismos vivos parecen estar basados en la sincronización de los procesos de recuperación intercelulares, así como intracelulares debidos a la estimulación de oscilaciones de EHF coherentes, es decir, el efecto de la radiación EHF aumenta la resistencia en un sistema multicelular. Las células, que circulan en los sistemas sanguíneos y linfáticos, por ejemplo, en el organismo humano, pueden propagar adicionalmente las ondas EHF, puesto que intercambian constantemente oscilaciones EHF con las vecinas.

Sorprendentemente, se ha encontrado que una composición que comprende células de levadura tratadas con, o cultivadas a partir de células de levadura tratadas con, ondas electromagnéticas en el intervalo de 30 GHz a 300 GHz (también denominadas células de levadura tratadas o levadura tratada) son eficaces para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Una ventaja de dicha composición es que permite el tratamiento mejorado y rentable de enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido en la técnica. Las ondas electromagnéticas pueden tener una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , tal como de aproximadamente $0,1 \text{ mW/cm}^2$.

En una realización, la frecuencia de oscilación se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 GHz. Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido en la técnica. Las ondas electromagnéticas pueden tener una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , tal como de aproximadamente $0,1 \text{ mW/cm}^2$.

En una realización, la frecuencia de oscilación se selecciona del grupo que consiste en 40 GHz, 41 GHz, 42 GHz, 43 GHz, 44 GHz, 45 GHz, 46 GHz, 47 GHz, 48 GHz, 49 GHz, 50 GHz, 51 GHz, 52 GHz, 53 GHz, 54 GHz, o 55 GHz. Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido en la técnica. Las ondas electromagnéticas pueden tener una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , tal como de aproximadamente $0,1 \text{ mW/cm}^2$. En una realización, la frecuencia de oscilación es $42194 \pm 10 \text{ MHz}$ y se modula linealmente dentro de una banda de 100 MHz en torno a esta frecuencia. Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido en la técnica. Las ondas electromagnéticas pueden tener una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , tal como de aproximadamente $0,1 \text{ mW/cm}^2$. En una realización, la frecuencia de oscilación es $53534 \pm 10 \text{ MHz}$ y se modula linealmente dentro de una banda de 50 MHz en torno a esta frecuencia. Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido en la técnica. Las ondas electromagnéticas pueden tener una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , tal como de aproximadamente $0,1 \text{ mW/cm}^2$.

En una realización, dichas células de levadura son *Saccharomyces*, tales como las seleccionadas del grupo que comprende *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces cerevisiae*. Una ventaja de esto es que tal levadura puede ser fácilmente asequible a bajo coste.

5 Las enfermedades o trastornos neurodegenerativos están causados en general por una pérdida continua de células nerviosas, más o menos selectivamente. Con el progreso de la enfermedad, puede haber una aceleración de la pérdida continua de células nerviosas.

De acuerdo con el principio de la plasticidad cada célula nerviosa tiene la capacidad de autorrepararse, en las condiciones adecuadas. Tales condiciones pueden ser factores somáticos o de estilo de vida. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que el ejercicio físico puede ayudar a retardar la progresión de las enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

En general, se ha demostrado que el ejercicio físico tiene un papel importante en la estimulación de factores tróficos en el tejido nervioso, denominados factores neurotróficos. Uno de estos factores es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se ha demostrado que el ejercicio físico aumenta los niveles de BDNF. Se formuló la hipótesis, según una teoría no limitante de los autores de la presente invención, de que las células de levadura tratadas en combinación con ejercicio físico inducen una hiperestimulación que aumenta adicionalmente los niveles de BDNF. El aumento de los niveles de BDNF puede servir después como una base para la movilización de la restauración y la reparación del tejido nervioso. Se formula la hipótesis de que el aumento de la plasticidad debido a la combinación de ejercicio físico y el compuesto de levadura proporciona un sinergismo que reduce la progresión de la enfermedad neurodegenerativa.

20 Se ha demostrado que los niveles de BDNF afectan específicamente a la progresión de varias afecciones neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la ELA. Los efectos neurodegenerativos de la Diabetes Mellitus tipo 2 también pueden verse afectados por los desequilibrios de BDNF.

En una realización, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson.

En una realización, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Alzheimer.

25 En una realización, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En una realización, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la diabetes mellitus tipo 2.

En una realización, el tratamiento es un tratamiento oral, por ejemplo en forma de una bebida de malta o cualquier tipo de bebida que comprenda la levadura tratada.

30 La levadura tratada se puede distribuir de otra forma al sujeto en cualquier forma adecuada. El sujeto puede ser cualquier mamífero, tal como p. ej. seres humanos. La energía de EHF se transfiere de este modo al sujeto tratado en forma de levadura tratada estimulada externamente mediante radiación con EHF.

En un aspecto, la composición es obtenible por un método que comprende las etapas de: preparación de un medio de crecimiento; esterilización o pasteurización del medio de crecimiento; cultivo de las células de levadura en el medio de crecimiento, y tratamiento de la levadura con ondas electromagnéticas, en donde las ondas electromagnéticas se encuentra en el intervalo de 30 GHz a 300 GHz.

En una realización, las ondas electromagnéticas se encuentran dentro del intervalo de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 GHz, tal como 40 GHz, 41 GHz, 42 GHz, 42,2 GHz, 43 GHz, 44 GHz, 45 GHz, 46 GHz, 47 GHz, 48 GHz, 49 GHz, 50 GHz, 51 GHz, 52 GHz, 53 GHz, 54 GHz, o 55 GHz. En una realización, la frecuencia de oscilación es 42194 ± 10 MHz y se modula linealmente dentro de la banda de 100 MHz en torno a esta frecuencia. En una realización, la frecuencia de oscilación es 53534 ± 10 MHz y se modula linealmente dentro de una banda de 50 MHz en torno a esta frecuencia. Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido en la técnica, tal como un dispositivo terapéutico YAV-1, basado en un oscilador de diodos IMPATT. Las ondas electromagnéticas pueden tener una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , Como por ejemplo entre $0,004 \text{ mW/cm}^2$ y $0,2 \text{ mW/cm}^2$, p. ej. aproximadamente $0,1 \text{ mW/cm}^2$.

45 El efecto del tratamiento con EHF se muestra en la Fig. 1.

La Fig. 1A es una curva de crecimiento de las células no tratadas. N/N_0 (Eje Y) es la proporción del número de células de N en el cultivo con respecto al número de inicio N_0 , y t (en horas, eje X) es el tiempo de desarrollo del cultivo. La Fig. 1B es una curva de crecimiento de las células tratadas. Las frecuencias de las oscilaciones generadas por las células se pueden sincronizar mediante la correspondiente reorganización de las estructuras de información de las células, que causa diferencias en las duraciones del ciclo división de las células individuales que se van a eliminar prácticamente con el resultado de "etapas" sobre la curva de crecimiento. Resulta evidente a partir de la Fig. 1 B que después de cada ciclo de división del número de células se duplica de forma sincrónica, de manera que la dependencia del número de células del tiempo está representada por medio de una curva de etapas.

La Tabla 1 es una visión general del tiempo mínimo (t_0 , min) necesario para sincronizar la división celular de todas las células a diferentes niveles de densidad de potencia (P , mW/cm^2) con una frecuencia de radiación de 42,2 GHz.

Tabla 1

t_0 , min	P , mW/cm^2
126	0,005
103	0,009
81	0,015
60	0,026
49	0,040
38	0,077
36	0,130
34	0,209

5

La Tabla 2 es una visión general del tiempo requerido (t_0 , Min) para sincronizar la división celular del 15 por ciento de las células a diferentes niveles de densidad de potencia (P , mW/cm^2) con una frecuencia de radiación de 42,2 GHz.

Tabla 2

t_0 , min	P , mW/cm^2
111	0,003
86	0,006
65	0,012
45	0,024
38	0,037
33	0,052
31	0,074
27	0,130
26	0,200

10

Por lo tanto, en una realización, el tiempo de tratamiento con EHF se encuentra entre 20 y 120 minutos.

En una realización, el método comprende adicionalmente la etapa de crecimiento de las células de levadura tratadas en el medio de crecimiento. El crecimiento se puede interrumpir en cualquier momento, cuando se alcanza una concentración celular deseada.

ES 2 441 974 T3

De acuerdo con una realización específica, el medio de crecimiento es mosto, es decir, una bebida de malta tónica obtenida a partir de mosto y levadura. Se puede utilizar cualquier clase de levadura. Se puede utilizar cualquier clase de mosto. Sin embargo, en una realización, el mosto se obtiene de una fábrica de cerveza. En otra realización, el mosto se elabora a partir de malta de cebada. En otra realización más, el mosto se elabora a partir de productos concentrados de mosto.

Si el mosto se obtiene de una fábrica de cerveza o si se utilizan productos concentrados de mosto, se puede ajustar la fracción en peso de materia seca, es decir, con la siguiente fórmula:

$$W = Q * (C_o/C_d - 1)$$

donde W es el volumen en litros (L) de agua que se va a añadir para la dilución del mosto original, Q es el volumen (L) del mosto (de partida) original obtenido, es decir de una fábrica de cerveza o en forma concentrada; C_o es el contenido en extracto del mosto original en % en peso; y C_d es la fracción en peso de materia seca en el mosto diluido.

En una realización, la fracción en peso de materia seca en el mosto diluido puede ser de alrededor de 11% en peso (11% en peso del mosto), por ejemplo de 10,5% en peso a 11,4% en peso.

Si el mosto se elabora a partir de malta de cebada, la cantidad de materia prima necesaria para la producción de 100 L de mosto se puede calcular es decir, con la fórmula:

$$C = \frac{wf * \rho * cc * 100 * 100}{(E_{avg} - L_B) * (100 - B)}$$

donde C es el consumo específico de malta, en kg/100 L de agua; wf es la fracción en peso de la materia seca en el mosto original en % en peso; ρ es la razón de densidad del mosto, en g/100 g; cc es el coeficiente de compresión entre el volumen de mosto y el volumen de la bebida final; E_{avg} es el contenido de malta utilizada, en % en peso; L_B representa las pérdidas de contenido, en %; y B representa las pérdidas de volumen, en %.

En una realización, el mosto producido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas se esteriliza en una cámara de autoclave con una presión de 0,05 MPa durante 20 minutos. El mosto puede almacenarse a continuación en contenedores sellados hasta 6 meses a temperaturas entre 18 y 20°C.

De acuerdo con otra realización, el mosto producido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas también se puede pasteurizar por ejemplo calentándolo entre 70 y 75°C durante más de 30 minutos. El mosto se puede almacenar a continuación en contenedores sellados hasta 2 semanas a temperaturas entre 18 y 20°C.

De acuerdo con una realización, *S. cerevisiae* se hace revivir mediante suspensión en un pequeño volumen de mosto al 11% en peso esterilizado. Es importante que otros microorganismos no contaminen el mosto.

El cultivo revivido se inocula con posterioridad en varias de placas Petri con mosto agarizado, para obtener cultivo de levadura pura. Esto se puede confirmar mediante microscopio.

Antes del tratamiento con EHF, la levadura de una de las placas con cultivo puro estéril se transfiere al tubo que contiene mosto al 11% en peso estéril, por ejemplo entre 10 y 12 ml. Los cultivos se desarrollan hasta que aparezca espuma, típicamente de 25 a 28°C durante 20 a 24 horas.

El cultivo de levadura se trata a continuación en un campo de EHF. Esto se puede realizar cargando en primer lugar placas Petri estériles con suspensión de levadura. La placa se cubre a continuación y se coloca en una unidad de EHF. Dicha unidad puede ser cualquier unidad de generación de oscilaciones electromagnéticas en el intervalo de EHF. Tiempo de tratamiento con EHF es preferiblemente menor de 60 minutos. La densidad de potencia de las oscilaciones de EHF es preferiblemente de aproximadamente 0,1 mW/cm². La frecuencia de oscilación está dentro del intervalo de 30 a 300 GHz. Las ondas electromagnéticas pueden estar dentro del intervalo de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 GHz, tal como 40 GHz, 41 GHz, 42 GHz, 42,2 GHz, 43 GHz, 44 GHz, 45 GHz, 46 GHz, 47 GHz, 48 GHz, 49 GHz, 50 GHz, 51 GHz, 52 GHz, 53 GHz, 54 GHz, o 55 GHz. En una realización, la frecuencia de oscilación es 42194 ± 10 MHz y se modula linealmente dentro de una banda de 100 MHz en torno a esta frecuencia. En una realización, la frecuencia de oscilación es 53534 ± 10 MHz y se modula linealmente dentro de una banda de 50 MHz en torno a esta frecuencia. Las ondas electromagnéticas pueden ser liberadas con cualquier dispositivo electrónico o fotónico conocido dentro de la técnica, tal como un dispositivo terapéutico YAV-1, basado en un oscilador de diodos IMPATT.

En una realización, la modulación de frecuencia de las ondas electromagnéticas es de 0% a aproximadamente 0,5% de la frecuencia media respectiva, tal como 0,5% de la frecuencia media respectiva.

Después del tratamiento en la unidad de EHF, la suspensión tratada anteriormente mencionada se transfiere a un tubo, tal como un tubo de 50 a 100 ml, que contiene mosto al 11% en peso estéril. Se deja que las

células se desarrollen hasta que aparezca espuma, típicamente durante 20 a 24 horas de 25 a 28°C. Este es el material de siembra.

5 El material de semilla se añade a continuación al mosto pasteurizado o esterilizado, típicamente de 2 a 3 L, cargado en contenedores (tubo, lata, etc.) de una capacidad nominal ligeramente mayor que la cantidad de mosto, típicamente de 4 a 5 L, y se cultiva hasta que se alcanza una concentración celular de 30 millones de células/ml, típicamente después de 20 a 24 horas de 25 a 28°C.

10 En otra realización, si se producen grandes volúmenes de bebida, se puede implementar el tratamiento anteriormente mencionado en varias fases mediante la adición del resultado de un ciclo de cultivo previo como material de siembra al mosto estéril en una proporción de 1:10 de material de siembra:mosto. De deja que las células se desarrollen hasta que aparezca espuma, típicamente durante 20 a 24 horas de 25 a 28°C. La última fase de la fase de producción de la bebida se considerará terminada cuando se logra una concentración de células no menor de 30 millones de células/ml.

15 Al término de la fase de producción la bebida está lista para su venta y puede ser transferida a recipientes de transporte adecuados, por ejemplo botellas o latas. Si se requiere almacenamiento, la bebida se puede enfriar a aproximadamente 2 a 4°C y después se puede almacenar, por ejemplo hasta tres días.

La invención se puede implementar de cualquier forma adecuada incluyendo productos alimenticios, piensos, otros productos de bebidas, etc., o cualquier combinación de estos, sin apartarse de la esencia de la invención.

20 Los elementos y componentes de una realización de la invención pueden ser implementados física, funcional y lógicamente de cualquier manera adecuada. De hecho, la funcionalidad se puede implementar en una única composición, en una pluralidad de composiciones o como parte de otras composiciones funcionales.

La composición se puede utilizar en un método para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos neurodegenerativos en un sujeto, tal como un ser humano.

Células de levadura tratadas

25 La siguiente es una realización instrumental de un procedimiento de producción. Sin embargo, son posibles muchos diferentes procedimientos de producción alternativos dentro del alcance de la invención, que serán reconocidos por un experto en la técnica.

El mosto se obtuvo de una fábrica de cerveza y la fracción en peso de materia seca en el mosto diluido se ajustó a 11% en peso (11% en peso de mosto).

30 El mosto se esterilizó en una cámara de autoclave con una presión de 0,05 MPa durante 20 minutos y se almacenó entre 18 y 20°C.

La levadura, *S. cerevisiae* se hizo revivir mediante suspensión en un pequeño volumen de mosto al 11% en peso esterilizado en condiciones estériles.

35 La levadura se inoculó en varias placas Petri con mosto agarizado, para obtener un cultivo de levadura pura. Esto se confirmó por medio de microscopio.

Antes del tratamiento con EHF, la levadura de una de las placas con el cultivo puro estéril se transfirió al tubo que contenía 11 ml de mosto al 11% en peso estéril. Los cultivos se desarrollaron a 28°C durante 20 a 24 horas hasta que aparece espuma.

40 El cultivo de la levadura se trató a continuación en un campo de EHF. Esto se realizó cargando primero las placas Petri estériles con la suspensión de levadura. La placa se cubrió después y se colocó en una unidad de EHF, que generaba oscilaciones electromagnéticas en el intervalo de EHF. El tiempo de tratamiento con EHF fue de 40 minutos. La densidad de potencia de las oscilaciones de EHF se mantuvo próxima a 0,1 mW/cm². La frecuencia de oscilación fue de 53.534 ± 10 MHz y se moduló linealmente dentro de una banda de 50 MHz en torno a esta frecuencia. La radiación electromagnética se generó mediante un dispositivo terapéutico YAV-1, basado en un oscilador de diodos IMPATT.

45 Después del tratamiento en la unidad de EHF, la suspensión tratada anteriormente mencionada se transfirió a un tubo de 75 ml que contenía mosto al 11% en peso estéril. Se dejó que las células se desarrollaran durante 22 horas a 28°C hasta que aparece espuma. Este fue el material de siembra.

50 El material de semillas se añadió después a 3 L de mosto pasteurizado o esterilizado cargado en tubos con una capacidad nominal de 5 L y se cultivó hasta que se alcanzó una concentración celular de 30 millones de células/ml. Estas células de levadura tratadas se administraron a los ratones de acuerdo con lo siguiente.

Experimentación

A ratones tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) para inducir síntomas similares a los de enfermedades o trastornos neurodegenerativos se les administró una composición que comprendía células de levadura tratadas de acuerdo con lo anterior, junto con ejercicio.

5 Es bien conocido en la técnica que la MPTP conduce a síntomas similares a los de pacientes que padecen enfermedades o trastornos neurodegenerativos, tales como la bradicinesia, temblor de reposo y rigidez. La MPTP por sí misma no parece ser tóxica, pero se sabe que atraviesa la barrera hematoencefálica después de lo cual se produce una biotransformación en un metabolito tóxico que implica la monoamino oxidasa (MAO). La MAO es la primera etapa en la conversión de MPTP en el intermedio de 2,3-dihidropiridinio (MPDP+). El MPDP+ se oxida por impulsos, dando forma al ión de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+). El MPP+ es el metabolito tóxico más importante de la MPTP, que produce el efecto sintomático. En el modelo, la edad juega un papel vital cuando se inyecta MPTP en ratones, puesto que se sabe que muchas enfermedades o trastornos neurodegenerativos tienen un comienzo tardío en los seres humanos.

Materiales y métodos

15 Experimentos iniciales

Se utilizaron en el experimento en total, 90 ratones C57 BL/6 macho de dos meses de edad procedentes de Scanbur B & K, Sollentuna, Suecia, con un peso de 27 ± 2 g. Tras la llegada al laboratorio, se dejó que los ratones se aclimataran durante una semana en una sala con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad ($55 \pm 5\%$) y todos tuvieron acceso a alimento, gránulos R35 de Lantmännen, Suecia y agua del grifo *ad libitum*. Hubo un ciclo de luz-oscuridad constante (12 hr encendida/12 hr apagada; luces encendidas entre las 6:00 AM y las 6:00 PM) en la sala. Los ratones se dividieron en seis grupos, de 15 animales cada uno, y se alojaron en jaulas de policarbonato de laboratorio coronadas con alambre ($55 * 35 * 18$ cm). Las jaulas se marcaron con números con el fin de separarlos. En cada jaula había dos nidos en los que los ratones eran capaces de esconderse y dormir.

25 En total, se utilizaron 16 ruedas de ejercicio que medían 17,5 cm de diámetro, Deluxe de Living World. Para evitar que los ratones evitaran las ruedas, las ruedas se encerraron con paredes de plástico. Se cortó una pieza de revestimiento de plástico y se le dio el mismo diámetro que la rueda y se colocó en cada lado de la rueda, a un lado anclado con Velcro para permitir el ratón entrara y saliera de la rueda. Al otro lado de la rueda el plástico se pegó a la rueda de ejercicio.

30 Se utilizó un aparato de ensayo de la actividad motora que comprendía jaulas de ensayo para roedores Macrolon ($40 * 25 * 15$ cm). Cada cámara de ensayo, es decir, jaula de ensayo de la actividad motora, se colocó en una caja de madera a prueba de sonido con paredes de 12 cm de espesor y paneles frontales y una pequeña ventana de vidrio doble para permitir la observación. Cada caja tenía una iluminación tenue, toda ella situada dentro de dos series de rayos infrarrojos (a dos alturas diferentes, una baja y una alta, 2 y 8 cm, respectivamente, por encima de la superficie del serrín, de 1 cm de profundidad), se utilizó para medir la actividad motora espontánea y/o inducida por fármacos de los ratones con MPTP y de control (Rat-O-Matic, ADEA Electronic AB, Uppsala, Suecia). La distancia entre los haces de infrarrojos fue la siguiente: los haces del nivel inferior estaban separados a lo largo 73 mm y a lo ancho 58 mm con respecto a la cámara de ensayo; los haces del nivel superior se colocaron solamente próximos a cada lado largo de la cámara de ensayo con 28 mm de separación.

40 La Fig. 2A es una imagen de una vista lateral del aparato de ensayo de la actividad motora y la Fig. 2B es una vista frontal del mismo aparato. En un soporte base se colocan 20 jaulas y sensores. La jaula es una jaula de plástico transparente 21 con una tapa de aluminio perforada 22 en la parte superior. La jaula de plástico 21 está apoyada sobre un soporte elástico de caucho 23. Se monta un cabezal 24 en una palanca con un contrapeso y se sitúan varios detectores de infrarrojos (IR) 25 en la proximidad de la jaula de plástico 21.

45 Durante todos los ensayos, se distribuyó solución salina como vehículo. Cuando fue aplicable, se disolvió 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Research Biochemical Inc., Natick, MA, USA), en el vehículo antes de la distribución.

50 Del un modo similar, se disolvió L-dopa (Hässle, Mölndal, Suecia) en solución salina antes de la distribución. Se conoce en la técnica la L-dopa para el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos. El sistema neurotransmisor tiene en cuenta tres neurotransmisores, noradrenalina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5HT). El precursor de aminoácidos para DA, tirosina (TYR) es transportado al sistema nervioso desde el torrente sanguíneo por medio de una bomba de transporte activo. La TYR actúa dentro de la neurona sobre tres enzimas sucesivamente. En primer lugar la TYR actúa con hidroxilasa que regulan la síntesis NE. La tirosina hidroxilasa (TOH) convierte a continuación la TYR en dihidroxifenil-alanina (DOPA). La segunda enzima, DOPA descarboxilasa (DDC), actúa a continuación y convierte la DOPA en DA. La tercera enzima dopamina beta hidroxilasa convierte la DA en NE. Se conocen al menos cinco subtipos farmacológicos de receptores de DA. En PD el receptor de dopamina 2 (D2) es estimulado por agonistas dopaminérgicos tales como L-dihidroxifenil-alanina (L-dopa). La L-dopa, el precursor de la DA, es un aminoácido metabolizado a DA tanto periféricamente como centralmente. La L-dopa puede al contrario que la DA cruzar la barrera hematoencefálica, ya que la absorción de L-

dopa por el portador de L-aminoácido cruza la barrera hematoencefálica. La administración de L-dopa se combina con inhibidores de descarboxilasa para disminuir el metabolismo periférico. Después de algunos años de tratamiento el efecto de la L-dopa disminuye y los pacientes desarrollan discinesia, y/o síntomas de activación y desactivación. De todos modos, la L-dopa es el tratamiento más comúnmente utilizado en la técnica, y por lo tanto se utiliza aquí como referencia.

5 El total de 90 ratones macho C57 BL/6 de 2 meses de edad, se dividió en 6 grupos de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Descripción general de la subdivisión del ensayo.

Grupo	1 semana	Tratamiento	6 semanas
1		Vehículo	
2	rueda	Vehículo	rueda
3		MPTP	
4	rueda	MPTP	rueda
5		MPTP	levadura
6	rueda	MPTP	levadura + rueda

10 Después de la primera semana de aclimatación se administraron a los ratones de los grupos 1 y 2 2 * 2 ml/kg de vehículo y a los ratones de los grupos 3, 4, 5 y 6 se les administraron 2 * 40 mg/kg de MPTP, S.C., con un intervalo de 16 horas, para inducir los síntomas de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. Se permitió que los ratones que tenían que realizar ejercicio descansaran durante 3 días después del tratamiento antes de iniciarse el ejercicio en la rueda de ejercicio 30 min/día, 5 días/semana durante 6 semanas. El ejercicio se realizó en una sala para pruebas de comportamiento. Los ratones se colocaron en las ruedas de ejercicio agarrándolos por su cola y, después de eso, se fijó el plástico. Al final de cada sesión de ejercicio se retiró el plástico y se dejó que el ratón saliera de la rueda y caminará hacia su jaula de alojamiento por sí mismo. A los grupos 5 y 6 se les ofreció levadura tratada, 0,5 ml/sujeto que contenía un millón de células de levadura activadas, por vía oral dos veces por semana (lunes y jueves) durante 6 semanas simultáneamente con el ejercicio. Los grupos 3 y 4 se trataron de la misma manera que los grupos 5 y 6 a pesar de que no se les administró ningún tratamiento oral.

20 Después del período de ejercicio en la rueda los ratones se sometieron a ensayo para determinar la actividad motora en una sala de ensayo especialmente dispuesta. Esta sala de ensayo, en la que se colocaron 12 cámaras de ensayo de actividad ADEA, estaba bien aislada y se utilizó solo para este propósito. Los ratones se sometieron a ensayo de uno en uno durante una hora, y el ratón se colocó en el centro de la cámara. Se registraron los siguientes parámetros:

25 La variable LOCOMOCIÓN se midió por medio de la rejilla inferior haces de infrarrojos. Los recuentos se registraron solamente cuando el ratón deambulaba en el plano horizontal en torno a la jaula de ensayo.

30 La variable de EXPLORACIÓN AÉREA se registró durante todo el tiempo cuando se interrumpió al menos un haz del nivel alto, es decir, el número de recuentos fue proporcional a la cantidad de tiempo dedicado a la exploración aérea.

La variable ACTIVIDAD TOTAL se midió por medio de un sensor (un cabezal similar a una aguja de gramófono, montado sobre una palanca con un contrapeso) con el cual la jaula de ensayo era constantemente en contacto.

35 El sensor registró todos los tipos de vibraciones recibidas de la jaula de ensayo, tales como las producidas tanto por la locomoción como por la exploración aérea, así como las sacudidas, temblores, rascado y aseo personal.

Los tres parámetros de comportamiento se midieron más de tres períodos sucesivos de 20 minutos. Los parámetros de la actividad motora se sometieron a ensayo en un solo evento, a lo largo de tres períodos sucesivos de 20 minutos. Después de la actividad espontánea los ratones se sometieron a ensayo para determinar la actividad

inducida, que son los movimientos influenciados por el ejercicio y la Levadura tratada. A los ratones se les inyectó por vía subcutánea (s.c.) una dosis por debajo del umbral de L-dopa, 0,5 mg/kg. A continuación, los ratones se colocaron de uno en uno en las cámaras de ensayo de nuevo durante 4 h. Solamente se tuvo en cuenta la medición de las 3 últimas horas para excluir el movimiento resultante de la manipulación y el procedimiento de inyección.

5 Después de llevar a cabo los ensayos, los ratones se dislocaron cervicalmente y se diseccionaron rápidamente las regiones del cuerpo estriado y se almacenaron a -80°C hasta que se llevó a cabo el análisis neuroquímico.

10 El análisis neuroquímico se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-CE) para analizar DA y la carbidopa patrón interno. El cuerpo estriado congelado se pesó y se homogeneizó en 1 ml de ácido perclórico 0,1 M. La carbidopa se añadió como patrón interno. Después de la centrifugación (10.000 rpm, es decir, 12.519 * g, 4°C, 15 min) y la filtración, se diluyó un volumen de 0,05 ml del producto homogeneizado 104 con la fase móvil y se inyectaron 20 µl en el HPLC-CE. El sistema de HPLC consistió en un Bischoffpump modelo 2250 (Bischoff, Alemania), un automuestreador/autoinyector equipado con una bandeja de refrigeración mantenida a 5°C (Midas, Spark Holanda), una columna analítica (Reprosil-Pur, C18-AQ, 250 * 4 mm, 5 µm equipado con una columna de seguridad (A. Maisch, Alemania) mantenida a 30°C, y un detector de múltiples electrodos Coulochem It ESA equipado con una célula de análisis dual modelo 5011-A (ESA Analytical, Chelmsford, MA, USA) que funcionaba a un potencial de oxidación de +300 mV. La fase móvil, pH 3,0 ± 0,1, consistió en NaH₂PO₄ 100 mM, ácido 1-octanosulfónico 0,5 mM, EDTA 1 mM y metanol del 10%. La velocidad de flujo fue de 0,7 ml/min.

20 Los datos de locomoción espontánea, la exploración aérea y la actividad total a lo largo de 3 períodos consecutivos de 20 minutos en las cámaras de ensayo de actividad se sometieron a un diseño ANOVA de parcelas divididas, bien conocido en la técnica. Los resultados de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado y el efecto reparador de 5 mg/kg de L-dopa sobre la locomoción, la exploración aérea y la actividad total, la suma de las últimas 3 de 4 horas (el efecto de la inyección s.c. excluida la primera hora) se sometieron a un diseño ANOVA de una vía. Se llevó a cabo el ensayo por pares post-hoc entre los diferentes grupos de tratamiento con la prueba HSD de Tukey, bien conocida en la técnica. En todo momento, se mantuvo un nivel de significación de 1%, a menos que se indique lo contrario.

Experimentos adicionales

Estudio de recuperación 1

30 Tres semanas después de la llegada, se administró a dos grupos (n = 10) de ratones de acuerdo con lo anterior MPTP (40 mg/kg, s.c.) y a dos grupos se les administró solución salina (Vehículo, 2 ml/kg) el Viernes de la cuarta semana después de la llegada. Se mantuvieron administraciones similares de MPTP o Vehículo cada Viernes de la quinta, sexta y séptima semana después de la llegada. En cada caso, se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento en las cámaras de ensayo de actividad antes de la administración de MPTP/Vehículo (ensayos 1-5). Al mismo tiempo, durante las semanas cuarta a séptima y la semana octava un grupo con Vehículos y uno con MPTP recibieron sesiones de ejercicios de 30 minutos durante cuatro días a la semana (lunes-jueves). Después de esto, terminaron las sesiones de ejercicio, pero todos los ratones se sometieron a ensayo durante las semanas 10 y 12 (Ensayos 6 y 7: viernes). El experimento se diseñó para examinar si una dosis única semanal de MPTP (40 mg/kg), en lugar de la dosis de 2 x 40 mg/kg separada por 24 horas convencional, proporcionaría o no un incremento hipocinésico progresivo cuando el ensayo de actividad se producía una semana después de la administración de MPTP. El experimento se diseñó también para someter a ensayo si un régimen consecutivo de cuatro días de ejercicio en la rueda de funcionamiento atenuaría o no los efectos hipocinésicos de la neurotoxina. La Tabla 4 presenta el diseño experimental y el tratamiento de ratones a los que se administraba MPTP o Vehículo, con o sin cinco semanas de ejercicio de rueda de ejercicio.

45 Tabla 4. Diseño experimental y el tratamiento de ratones a los que se administra MPTP o vehículo, con o sin seis semanas de ejercicio rueda de ejercicio.

		Vehículo	MPTP	Veh + Ejer	MPTP + Ejer
1 ^a -3 ^a semana	Aclimatación y exposición a las ruedas de ejercicio				
	Lunes	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Martes	jaula	Jaula	Ejer	Ejer

ES 2 441 974 T3

		Vehículo	MPTP	Veh + Ejer	MPTP + Ejer
4ª semana	Miércoles	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Jueves	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
Ensayo 1 .	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *
	Lunes	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Martes	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
5ª semana	Miércoles	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Jueves	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer
Ensayo 2 .	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *
	Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Martes	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
6ª semana	Miércoles	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Jueves	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
Ensayo 3 .	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *
	Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Martes	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
7ª semana	Miércoles	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer
	Jueves	jaula	Jaula	Ejer	Ejer
Ensayo 4 .	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP *
	Lunes	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
	Martes	jaula	Jaula	jaula	Jaula
8ª semana	Miércoles	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
	Jueves	jaula	Jaula	jaula	Jaula

		Vehículo	MPTP	Veh + Ejer	MPTP + Ejer
Ensayo 5	Viernes	Prueba	Prueba	Prueba	Prueba
10 ^a semana	Mar-jue	30 min SMA ensayo (Ensayo 6) + 120 min Ensayo L-Dopa			
12 ^a semana	Mar-jue	30 min-SMA Ensayo (Ensayo 7) + 120 min Ensayo L-Dopa			
14 ^a semana		Sacrificio + disección del cuerpo estriado			
* MPTP (40 mg/kg) ■ Actividad motora espontánea a lo largo de 60 min					

Estudio de recuperación 2

En un segundo estudio de la recuperación, a los ratones se les administraron dosis únicas semanales de MPTP (1 x 40 mg/kg, s.c.), después de un ensayo de la actividad motora espontánea, que siguió a 4 días consecutivos de actividad en la rueda de ejercicio (véase la Tabla 5, a continuación), a lo largo de cuatro semanas consecutivas, con un procedimiento similar durante la 5^a semana excepto que no hubo administración de MPTP después del ensayo de la actividad motora. Después de esto, todos los ratones se dejaron durante dos semanas sin tratamiento ni ejercicio en la rueda de ejercicio y después sometieron a ensayo de nuevo en el ensayo motor espontáneo seguido del ensayo de la actividad motora inducida por L-dopa. Después de otras dos semanas sin tratamiento ni ejercicio en la rueda de ejercicio, todos los ratones fueron sometidos a una prueba final del ensayo motor espontáneo seguido del ensayo de la actividad motora inducida por L-Dopa (véase la Tabla 5, a continuación). A la semana siguiente, los ratones con MPTP y Vehículos se sacrificaron y las regiones del cuerpo estriado se diseccionaron para el análisis neuroquímico.

Después de esto, todos los ratones se dejaron durante dos semanas sin tratamiento ni ejercicio en la rueda de ejercicio y a continuación se sometieron a ensayo de nuevo en el ensayo motor espontáneo seguido del ensayo de la actividad motora inducida por L-dopa. Después de esto, todos los ratones se mantuvieron en condiciones de ejercicio en la rueda de ejercicio o de ubicación sedentaria en jaulas de plexiglás a lo largo de las siguientes nueve semanas, pero se sometieron a ensayo a intervalos de dos semanas, en donde se evaluaron tanto la actividad motora espontánea (Ensayos 1 a 14) como la actividad inducida por L-Dopa (Ensayos 1-5, durante las semanas 6, 8, 10, 12 y 14 del experimento). A la semana siguiente (semana 15), y los ratones con MPTP y vehículos se sacrificaron y se diseccionaron el córtex frontal, el córtex parietal, el hipocampo y las regiones del cuerpo estriado para el análisis neuroquímico de DA y BDNF. De acuerdo con este diseño, solo un grupo con vehículos (los no ejercitados estaban incluidos) demostró que el ejercicio en la rueda de ejercicio no producía alteraciones de comportamiento en los animales a los que se había inyectado vehículo.

Tabla 5. Se llevó a cabo el diseño experimental y el tratamiento de los ratones a los que se había administrado MPTP o Vehículo, con o sin tres semanas de ejercicio en la rueda de ejercicio. Se indican los ensayos de actividad motora espontánea a lo largo intervalos de 60 min y los ensayos con L-Dopa por debajo del umbral.

Tiempo y Ensayo	Día	Vehículo	MPTP	MPTP + Ejercicio
	Lunes	Jaula	Jaula	Ejer
	Martes	Jaula	Jaula	Ejer
Semana 1-4	Miércoles	Jaula	Jaula	Ejer
	Jueves	Jaula	Jaula	Ejer

Tiempo y Ensayo	Día	Vehículo	MPTP	MPTP + Ejercicio
Ensayo 1-4 *	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP ☑	Ensayo + MPTP ☑
	Lunes	Jaula	Jaula	Ejer
	Martes	Jaula	Jaula	Ejer
Semana 5-8	Miércoles	Jaula	Jaula	Ejer
	Jueves	Jaula	Jaula	Ejer
Ensayo 5-8 *	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo	Ensayo
	Lunes	Jaula	Jaula	Ejer
	Martes	Jaula	Jaula	Ejer
Semana 9-14	Miércoles	Jaula	Jaula	Ejer
	Jueves	Jaula	Jaula	Ejer
Ensayo 9-14 *	Viernes	Ensayo + sal	Ensayo	Ensayo

☑ MPTP (40 mg/kg) inyectado durante las primeras cuatro semanas

* Actividad motora espontánea a lo largo de 60 min

** L-Dopa (5 mg/kg, sc) después de una habituación de 60 minutos a las jaulas de ensayo

5 Estudio de restauración

Se realizó un estudio de la restauración, en donde a los ratones se les administraron dosis únicas semanales de MPTP (1 x 30 mg/kg, sc), después de un ensayo de actividad motora espontánea, sin actividad en la rueda de ejercicio, a lo largo de las dos primeras semanas consecutivas, pero iniciando el ejercicio en la rueda de ejercicio en la tercera semana para el Grupo de MPTP + Ejer (2), el grupo MPTP + Ejer (4) continuó sin ejercicio en la rueda de ejercicio durante las tercera y cuarta semanas, pero recibió ejercicio en la rueda de ejercicio desde la quinta semana en adelante. Con posterioridad, se mantuvo el procedimiento de la rueda de ejercicio para los grupos MPTP + Ejer (2) y MPTP + Ejer (4) durante la 5^a a 10^a semanas, excepto que no hubo una administración adicional de MPTP después del Ensayo de actividad motora. Durante todos los períodos de 30 minutos en los que dejó que los grupos MPTP + Ejer (2) y MPTP + Ejer (4) se ejercitaran en la rueda de ejercicio, los ratones en los grupos con Vehículo y MPTP estuvieron en jaulas individuales colocadas en la misma sala durante períodos de 30 min. Después de esto, se dejó a todos los ratones sin tratamiento o ejercicio en la rueda de ejercicio durante dos semanas y a continuación se volvieron a someter a ensayo en el ensayo motor espontáneo seguido del ensayo de la actividad motora inducida por L-dopa. Después de esto, todos los ratones se mantuvieron en condiciones de ejercicio de rueda de ejercicio o de ubicación sedentaria en jaulas de plexiglás a lo largo de las siguientes nueve semanas, pero se sometieron a ensayo a intervalos de dos semanas, en los que se evaluaron tanto la actividad motora espontánea (Ensayos 1 a 14) como la actividad inducida por L-Dopa (Ensayos 1-5, durante las semanas 6, 8, 10, 12 y 14 del experimento). En la siguiente semana (semana 15), los ratones con MPTP y Vehículo se sacrificaron y se diseccionaron el córtex frontal, el córtex parietal, el hipocampo y la regiones del cuerpo estriado para el análisis neuroquímico de DA y BDNF. De acuerdo con este diseño, solo un grupo con vehículo (sin incluir ejercicio) demostró que el ejercicio en la rueda de ejercicio no producía alteraciones del comportamiento en los animales a los que se había inyectado vehículo. La tabla 6 es una visión general del diseño experimental y el tratamiento de ratones a los que se ha administrado MPTP o Vehículo, con o sin tres semanas de ejercicio en la rueda de ejercicio como se

ES 2 441 974 T3

había llevado a cabo en el Experimento II. Se indican los ensayos de actividad motora espontánea a lo largo de intervalos de 60 minutos y los ensayos con L-Dopa por debajo del umbral.

Tabla 6. El diseño experimental y el tratamiento de los ratones administrarse MPTP o vehículo, con o sin las tres semanas de ejercicio rueda para correr se llevó. Se indican pruebas de actividad motora espontánea más de 60 min intervalos y subliminales pruebas L-Dopa.

5

	Vehículo	MPTP	MPTP + Ejer (3 ◊)	M + Ejer (3 ◊) + Y	M + Ejer (5 ◊)	M + Ejer (5 ◊) + Y
Lunes	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
Semana 1	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
Viernes: T1 ☉	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP
Lunes	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
Semana 2	jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula	Jaula
Viernes: T2 ☉	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP
Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
Semana 3	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
Viernes: T3 ☉	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP
Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula

ES 2 441 974 T3

	Vehículo	MPTP	MPTP + Ejer (3 ◊)	M + Ejer (3 ◊) + Y	M + Ejer (5 ◊)	M + Ejer (5 ◊) + Y
Semana 4	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Jaula	Jaula
Viernes: T4 ☉	Ensayo + sal	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP	Ensayo + MPTP
Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Semana 5 y 6	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Vier.v5:	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Vier.v6: T5 *	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Mier.7 y 8	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Vier.s7:	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Vier.s8: T6 *	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
Lunes	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	Jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
	jaula	Jaula	Ejer	Ejer + Y	Ejer	Ejer + Y
Viernes s: T7 *	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
Semana 10: Vie T8 *	Levadura tratada, sin ejercicio					

	Vehículo	MPTP	MPTP + Ejer (3 ◊)	M + Ejer (3 ◊) + Y	M + Ejer (5 ◊)	M + Ejer (5 ◊) + Y
Semana 11	Ensayo Neuroquímico					

☐ SMA sólo;

* SMA + L-Dopa

3 ◊ = Ejer + levadura tratada comienza s.3; 5 ◊ = Ejer + levadura tratada comienza s.5

Resultados y Discusión

5 Experimentos iniciales

La administración de MPTP, a ratones de 6 semanas de edad, dio como resultado la siguiente alteración del contenido de DA en el cuerpo estriado en función del tratamiento posterior, revelada por el análisis de HPLC 7 semanas después del tratamiento con MPTP. La administración de MPTP desencadenó una disminución del contenido de DA en el cuerpo estriado, en comparación con el grupo con vehículo. Por lo tanto, el ANOVA de una vía indicó efectos significativas Entre Grupos para el contenido de DA en el cuerpo estriado $F(5, 30) = 35,92, p < 0,0001$. La Fig. 3 ilustra el contenido de DA en el cuerpo estriado. El eje y representa el nivel de dopamina en ng/mg de peso neto. A lo largo del eje x, se muestran las diferentes muestras en forma de columnas. La columna 31 es solo vehículo (muestra de control), grupo 1. La columna 32 es vehículo combinado con ejercicio, grupo 2. La columna 33 es MPTP 40 mg/kg, grupo 3. La columna 34 es MPTP 40 mg/kg combinado con ejercicio, grupo 4. La columna 35 es MPTP 40 mg/kg combinado con levadura tratada, grupo 5. La columna 36 es MPTP 40 mg/kg combinado con levadura tratada y ejercicio, grupo 6.

Las columnas demuestran que la levadura tratada tiene un efecto sobre el nivel de dopamina en el cuerpo estriado, puesto que los ratones del grupo 5 tiene niveles más altos que los ratones del grupo 3. La levadura tratada combinada con ejercicio proporciona un efecto aún mayor, como se muestra mediante la columna 6.

El ensayo por pares utilizando la prueba HSD de Tukey reveló las siguientes diferencias: la MPTP disminuyó el contenido de DA en todos los grupos tratados en comparación con el vehículo. El ejercicio tuvo un efecto antagónico parcial sobre el descenso, pero no se observó ningún efecto adicional a partir de la levadura tratada. La administración de vehículo o MPTP seguida de ejercicio a lo largo de períodos de 30 minutos 5 días consecutivos cada semana y/o un suplemento con levadura tratada dos veces a la semana durante 6 semanas restablecieron parcialmente la hipoactividad debida a MPTP. Por sí sola la levadura tratada no afectó el efecto hipocinésico de MPTP. Por lo tanto, el ANOVA de parcelas divididas indicó interacciones significativas Tratamiento * Tiempo: Locomoción: $F(10, 108) = 57,21, p < 0,0001$; Exploración aérea: $F(10, 108) = 89,56, p < 0,0001$, y actividad total: $F(10, 108) = 89,56, p > 0,0001$. La Fig. 4 representa las medias y los valores de DT para la locomoción, la exploración aérea y la actividad total.

El ensayo por pares utilizando la prueba HSD de Tukey reveló diferencias entre los diferentes tratamientos posteriores con MPTP y el grupo con vehículo. En los ratones con vehículo hubo una clara disminución de la actividad en todos los comportamientos espontáneos durante el período de 60 min. Tal disminución es un perfil normal del comportamiento espontáneo. El vehículo más ejercicio no difirió del vehículo no acompañado. La hipoactividad producida por tratamiento con MPTP en comparación con el tratamiento con vehículo caracterizado por recuentos reducidos de locomoción, exploración aérea y actividad total no se vio afectada por la levadura tratada sola. Por el contrario, el ejercicio solo restauró parcialmente la locomoción durante el 1^{er} y 2^o períodos. Asimismo la combinación, ejercicio más levadura tratada, restauró parcialmente la locomoción en el primer y segundo períodos, junto con un efecto restaurador de la exploración aérea. Para la locomoción durante el primero periodo y la exploración aérea segundo período la levadura tratada más ejercicio redujo significativamente la hipoactividad en comparación con el ejercicio solo.

Se estudió el comportamiento inducido después de la exposición a una dosis por debajo del umbral de 5 mg/kg de L-dopa. Esta dosis de L-dopa no cubre por sí misma los efectos sobre los ratones hipoactivos pretratados con 40 mg/kg de MPTP. La suma de los recuentos de locomoción, exploración aérea y el actividad total de la medición de las 3 últimas de las 4 horas (excluida la actividad producida por la manipulación y la inyección durante la primera hora) del comportamiento inducido se sometió a un ANOVA de una vía. Se descubrieron efectos Significativos Entre Grupos:

Locomoción $F(5, 54) = 44,19, p < 0,0001$; Exploración aérea $F(5, 54) = 33,50, p < 0,0001$ y actividad total $F(5, 54) = 25,69, p < 0,0001$.

La Fig. 4 resume los resultados. Se muestran las medias y los valores de DT para la locomoción (Fig. 4A), la exploración aérea (Fig. 4B) y la actividad total (Fig. 4C) para las 3 horas después de la administración de L-dopa.

La levadura tratada produjo una adición significativa de locomoción y exploración aérea combinada con el ejercicio. Las letras (mayúscula 0.01 y minúscula 0.05) indican diferencias significativas, donde A representa la comparación entre el ejercicio y la falta de ejercicio y B, entre los grupos que recibieron levadura tratada. El ensayo por pares utilizando la prueba HSD de Tukey reveló las siguientes diferencias: la L-dopa no mostró ningún efecto beneficioso sobre los ratones tratados con MPTP sin ejercicio o solo post-tratamiento con levadura tratada. Los grupos con ejercicio y ejercicio + levadura tratada fueron significativamente menos hipoactivos para las tres variables en comparación con la falta de ejercicio y la levadura tratada solos. La levadura tratada produjo una adición significativa de la locomoción y la exploración aérea cuando se combinó con el ejercicio.

El presente estudio examinó la predisposición para el ejercicio físico en forma de ejercicio diario en la rueda de ejercicio por sí solo o combinado con levadura tratada, para restaurar, aunque sea parcialmente, la hipocinesia, y los déficits neuroquímicos en general y el agotamiento de DA en particular inducidos por la administración de MPTP (2 * 40 mg/kg). Los resultados se resumen de la siguiente manera:

1. La hipocinesia debida a la administración de MPTP se restauró parcialmente por medio del ejercicio diario, cuyo efecto se incrementó a través del ejercicio en la rueda de ejercicio combinado con levadura tratada.

2. La hipocinesia inducida por MPTP, después de la estimulación con L-dopa, fue restaurada parcialmente por medio del ejercicio diario, cuyo efecto se incrementó a través del ejercicio en la rueda de ejercicio combinado con levadura tratada.

3. El agotamiento de DA inducido por MPTP a una dosis alta (2 * 40 mg/kg) fue restablecido parcialmente por medio del ejercicio diario, pero una combinación de ejercicio en la rueda de ejercicio y levadura tratada no aumentó visiblemente el efecto restaurador.

En el ensayo actividad espontánea, seis semanas de ejercicio en la rueda de ejercicio aumentaron significativamente la locomoción, pero no la exploración aérea ni la actividad total, para los ratones tratados con una dosis baja de MPTP, durante períodos de ensayo tanto de 0-20 min como de 20-40 en las cámaras de ensayo actividad. La combinación de ejercicio en la rueda de ejercicio y levadura tratada, dos veces por semana a lo largo de un período de seis semanas, aumentó de manera manifiesta la actividad motora de los ratones tratados con MPTP para los 3 parámetros. De acuerdo con una teoría no limitante de los autores de la presente invención, la levadura tratada continúa la generación de oscilaciones después de que el sujeto entra en tratamiento. Cuando la levadura tratada entra en contacto con las células del sujeto, se cree que se atraen entre sí y se conectan a causa de las fuerzas dipolo-dipolo entre ellas. Sobre las membranas de las células del sujeto de tratamiento, que carecen de simetría eléctrica, se pueden formar subestructuras que a su vez forman campos eléctricos de EHF. Las células con funciones alteradas y la célula estimulada externamente pueden, al entrar en contacto, formar un sistema unido temporal donde se pueden producir procesos de recuperación. Tales procesos son análogos a los que ocurren en las células con funciones alteradas, pero ya que la célula inyectada en el organismo desde el exterior posee una considerable energía de EHF, el intercambio de energía entre tal célula y la célula se requiere recuperación conduce al enriquecimiento de la última con la energía de EHF de manera que se acelera su recuperación. Después de la recuperación, la correspondiente célula del organismo se vuelve simétrica. La interacción entre tal célula y las células tratadas externamente se interrumpe y, en consecuencia, la extracción de energía de EHF de las células tratadas externamente se detiene.

Los déficits funcionales graves en ratones tratados con una dosis elevada de MPTP y sometidos a continuación a estimulación con L-Dopa se restauraron mediante ejercicio en la rueda de ejercicio; el efecto restaurador del ejercicio solo fue incompleto, en oposición al ocasionado por una combinación de ejercicio y levadura tratada. Los déficits de la actividad que se acumulan a partir de la dosis elevada de MPTP excluían la exploración aérea (Fig. 4); sin embargo, los comportamientos en forma de locomoción y de actividad total que siguieron a la dosis por debajo del umbral de L-dopa se restauraron completamente mediante un período de 6 semanas de ejercicio en la rueda de ejercicio.

La Fig. 5 son diagramas que muestran la media y los valores de DT para la locomoción (Fig. 5A), la exploración aérea (Fig. 5B) y la actividad total (Fig. 5C), respectivamente, 3 horas después de la administración de L-Dopa. La levadura tratada proporciona una adición significativa de la locomoción y la exploración aérea combinada con el ejercicio. Las letras (mayúscula 0,01 y minúscula 0,05) indican diferencias significativas, donde A representa la comparación entre el ejercicio y la falta de ejercicio y B, entre los grupos tratados con levadura tratada.

La levadura tratada, pueden también tener efecto sobre la progresión de enfermedades o trastornos neurodegenerativos, con o sin combinación con el ejercicio.

Otros experimentos

Estudio de recuperación 1

La Fig. 6 muestra la actividad motora espontánea. El régimen de ejercicio atenuó el déficit de actividad motora de MPTP. La levadura tratada (levadura) indujo la recuperación casi total de la actividad espontánea.

La Fig. 7 muestra la actividad inducida por L-dopa. El régimen de ejercicio atenuó el déficit de actividad motora de MPTP. La levadura tratada (levadura) indujo la recuperación casi completa de la actividad inducida por L-Dopa.

5 La Fig. 8 muestra los resultados del análisis de la dopamina. Hubo una marcada recuperación del nivel de dopamina en el grupo tratado con levadura tratada (levadura).

Estudio de recuperación 2

La Fig. 9 muestra los resultados referentes a la actividad motora espontánea. El régimen de ejercicio atenuó el déficit de la actividad motora de MPTP. La levadura tratada (levadura) indujo una recuperación completa de la actividad espontánea.

10 La Fig. 10 muestra la actividad inducida por L-dopa. La levadura tratada (levadura) produjo una recuperación completa de la actividad inducida por L-Dopa.

La Fig. 11 muestra los resultados del análisis de dopamina. La levadura tratada (levadura (1)) proporcionó la recuperación completa de nivel de dopamina en el cuerpo estriado de ratón.

15 La Fig. 12 muestra los resultados del análisis BDNF. La levadura tratada indujo una expresión máxima de BDNF (grupo MpExMa) en comparación con los grupos con ejercicio solo (MPEXer) y con levadura no tratada (MPEXM). (Grupo MpExMa > grupos MPEXM, MPEXer > Grupo MPTP).

Estudio de Restauración

La Fig. 13 muestra la actividad motora espontánea. La levadura tratada (levadura) indujo efectos restauradores marcados sobre la actividad espontánea después de 2 administraciones de MPTP.

20 La Fig. 14 muestra la actividad inducida por L-dopa. La levadura tratada (levadura) indujo efectos restauradores completos sobre la actividad inducida por L-Dopa después de 2 administraciones de MPTP.

La Fig. 15 muestra los resultados del análisis de dopamina. La levadura tratada (levadura) indujo efectos restauradores marcados sobre el nivel de dopamina después de 2 administraciones de MPTP.

25 En las reivindicaciones, el término "comprende/que comprende" no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Además, aunque se enumeran individualmente, se puede implementar una pluralidad de medios, elementos o etapas del método por ejemplo, una sola unidad.

30 Adicionalmente, aunque se pueden incluir características individuales en diferentes reivindicaciones, éstas se pueden combinar posiblemente de manera ventajosa, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o ventajosa. Además, las referencias en singular no excluyen la pluralidad. Los términos "un", "una", "uno", "primero", "segundo", etc., no se oponen a la pluralidad. Los signos de referencia en las reivindicaciones se proporcionan simplemente como ejemplo clarificador y no se deben interpretar como limitantes del alcance de las reivindicaciones en modo alguno.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende células de levadura tratadas con, o desarrolladas a partir de células de levadura tratadas con ondas electromagnéticas en el intervalo de 30 GHz a 300 GHz para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos neurodegenerativos.
- 5 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas ondas electromagnéticas se encuentran en el intervalo de aproximadamente 35 GHz a aproximadamente 65 GHz, tal como 40 GHz, 41 GHz, 42 GHz, 42,2 GHz, 43 GHz, 44 GHz, 45 GHz, 46 GHz, 47 GHz, 48 GHz, 49 GHz, 50 GHz, 51 GHz, 52 GHz, 53 GHz, 54 GHz, o 55 GHz.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichas ondas electromagnéticas tienen una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , por ejemplo entre $0,004 \text{ mW/cm}^2$ y $0,2 \text{ mW/cm}^2$.
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas ondas electromagnéticas se modulan en una frecuencia dentro del intervalo de 0% a aproximadamente 0,5% de la frecuencia media.
- 15 5. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tiempo de tratamiento es de entre 20 minutos y 130 minutos.
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células de levadura son *Saccharomyces*, tales como *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha enfermedad o trastorno neurodegenerativo es la diabetes mellitus tipo 2.
- 25 10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tratamiento es un tratamiento oral.
11. Un método para preparar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:
 - preparar un medio de crecimiento;
 - 30 esterilizar o pasteurizar dicho medio de crecimiento;
 - desarrollar células de levadura en dicho medio de crecimiento; y
 - tratar dichas células de levadura con las ondas electromagnéticas, en donde dichas ondas electromagnéticas se encuentran en el intervalo de 30 GHz a 300 GHz.
- 35 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde las ondas electromagnéticas se encuentran en el intervalo de aproximadamente 35 GHz a aproximadamente 65 GHz, tal como 40 GHz, 41 GHz, 42 GHz, 42,2 GHz, 43 GHz, 44 GHz, 45 GHz, 46 GHz, 47 GHz, 48 GHz, 49 GHz, 50 GHz, 51 GHz, 52 GHz, 53 GHz, 54 GHz, o 55 GHz.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde dichas ondas electromagnéticas tienen una densidad de potencia por debajo de 1 mW/cm^2 , por ejemplo entre $0,004 \text{ mW/cm}^2$ y $0,2 \text{ mW/cm}^2$.
- 40 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde dichas ondas electromagnéticas se modulan en una frecuencia en el intervalo de 0% a aproximadamente 0,5% de la frecuencia media.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el tiempo de tratamiento se encuentra entre 20 minutos y 130 minutos.
- 45 16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende adicionalmente la etapa de desarrollar dichas células de levadura tratadas en dicho medio de crecimiento.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde dicho medio de crecimiento es mosto.

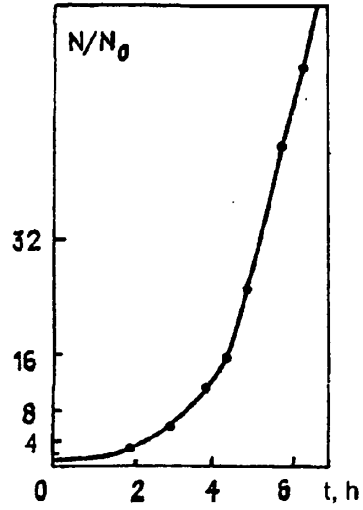


Fig. 1A

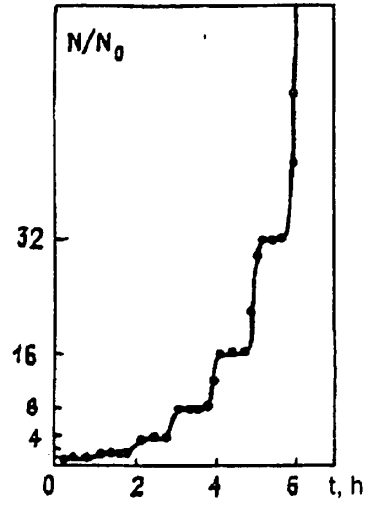


Fig. 1B

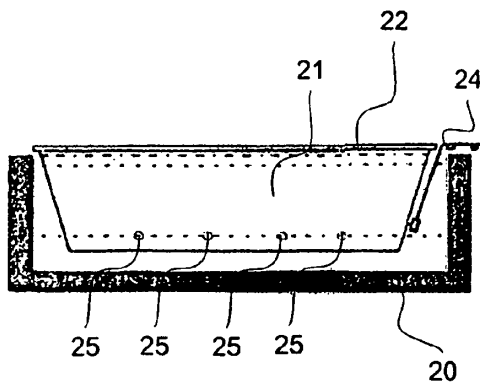


Fig. 2 A

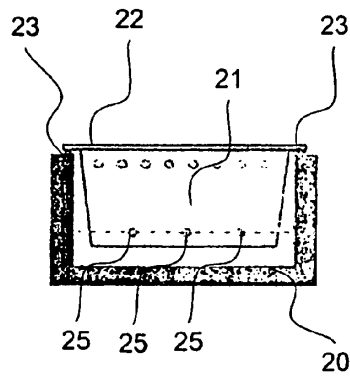


Fig. 2 B

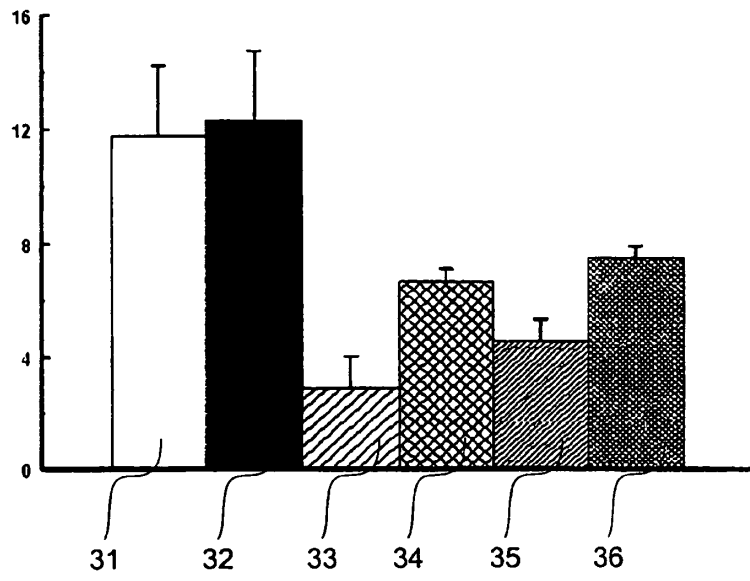
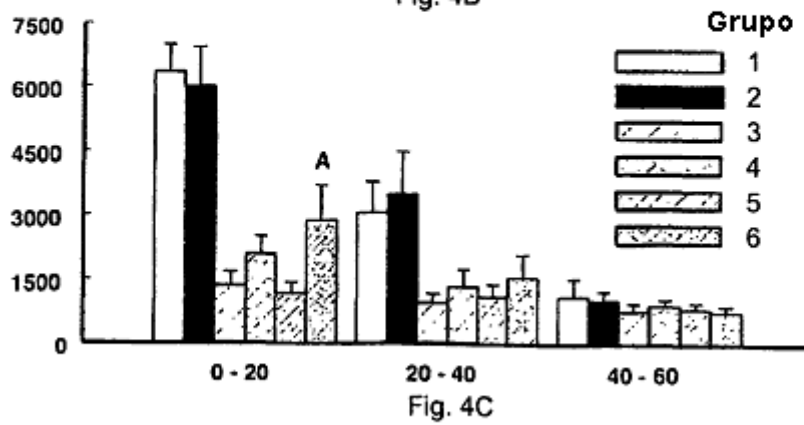
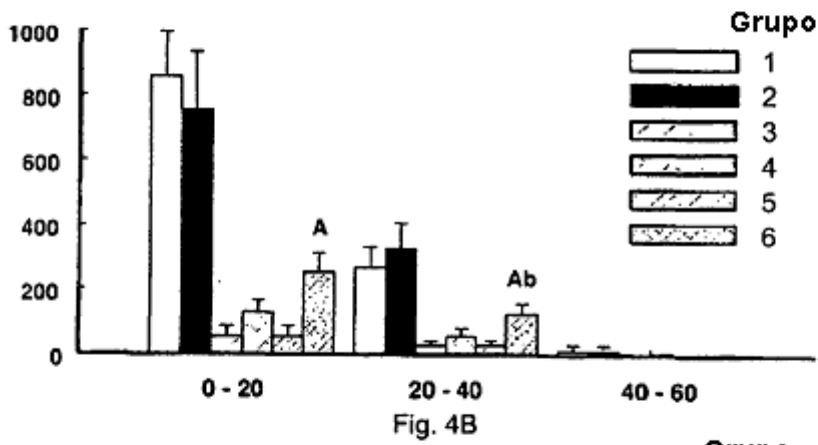
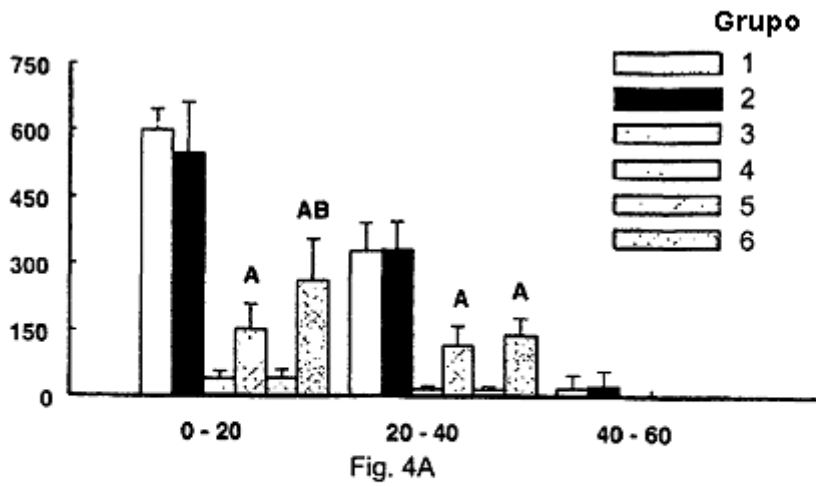


Fig. 3



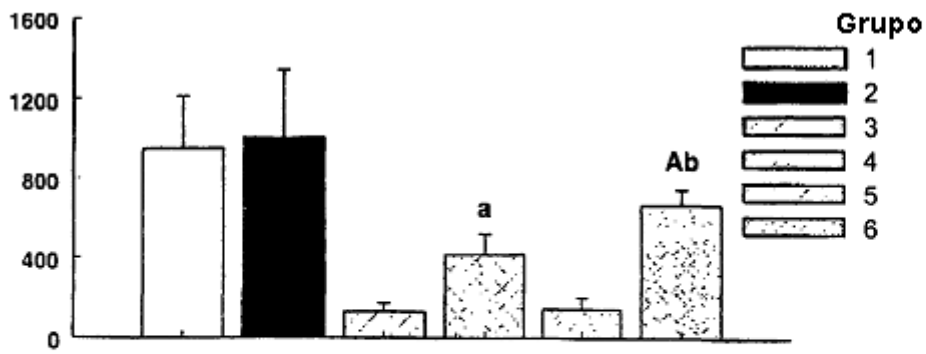


Fig. 5A

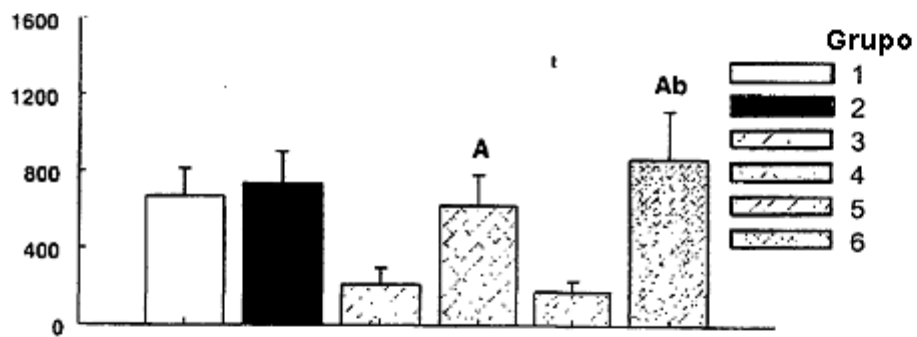


Fig. 5B

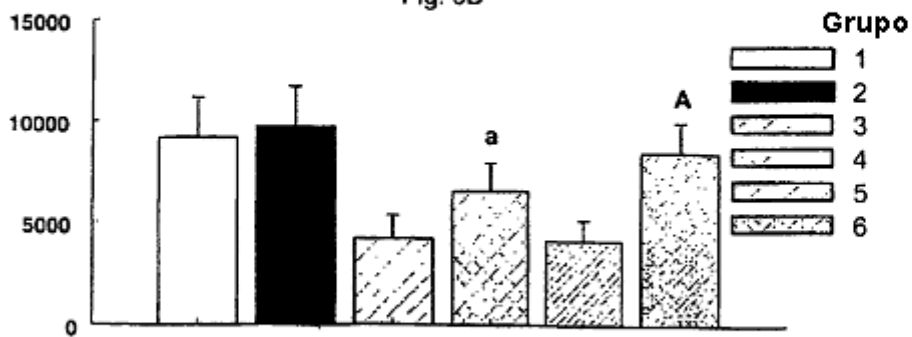
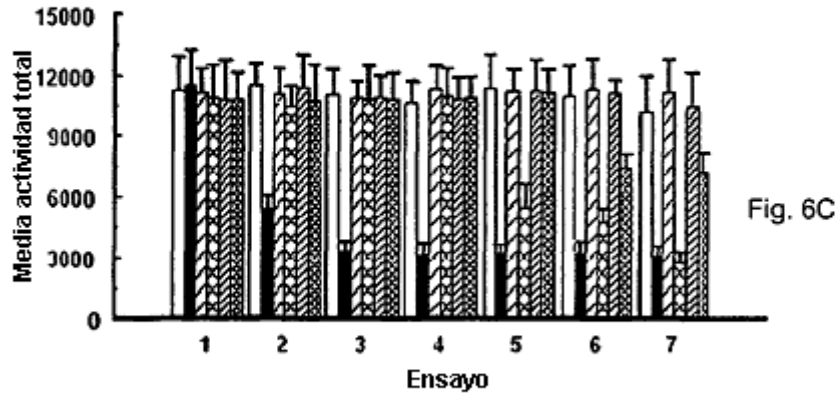
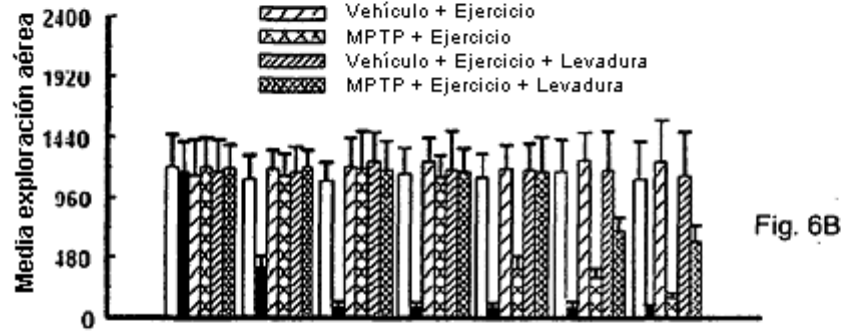
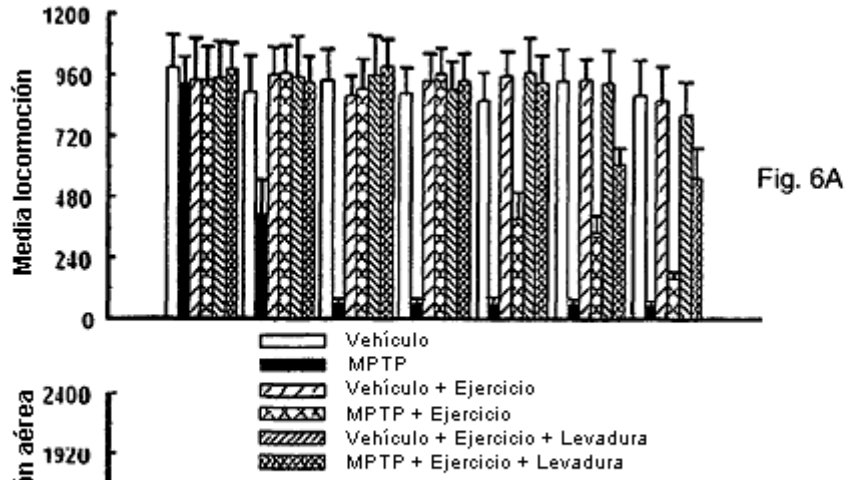
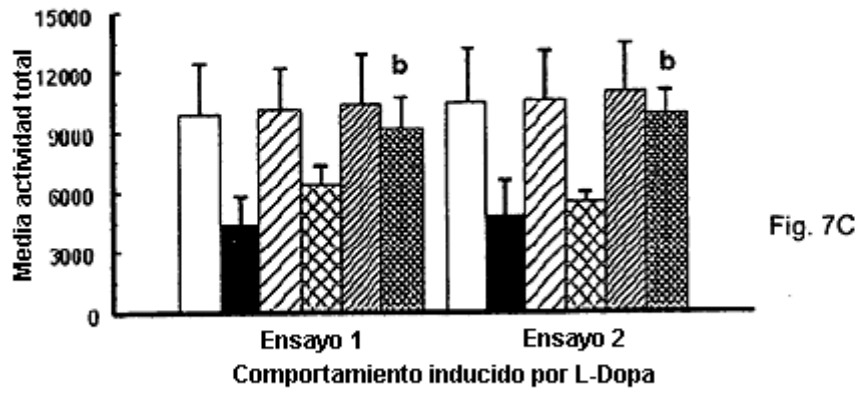
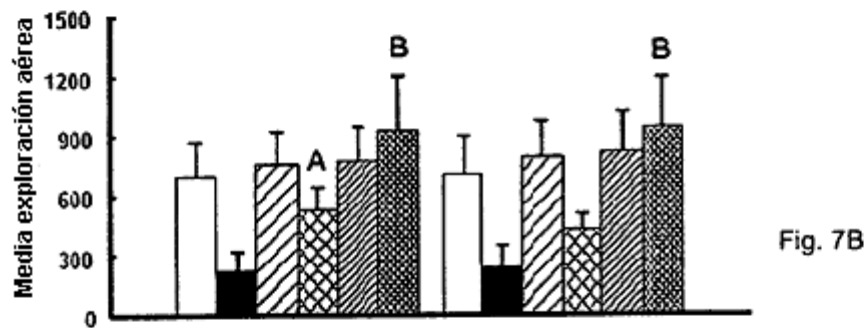
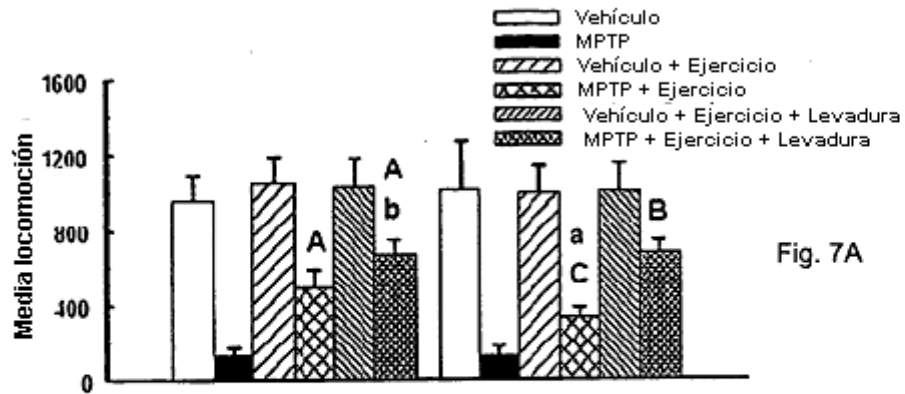


Fig. 5C





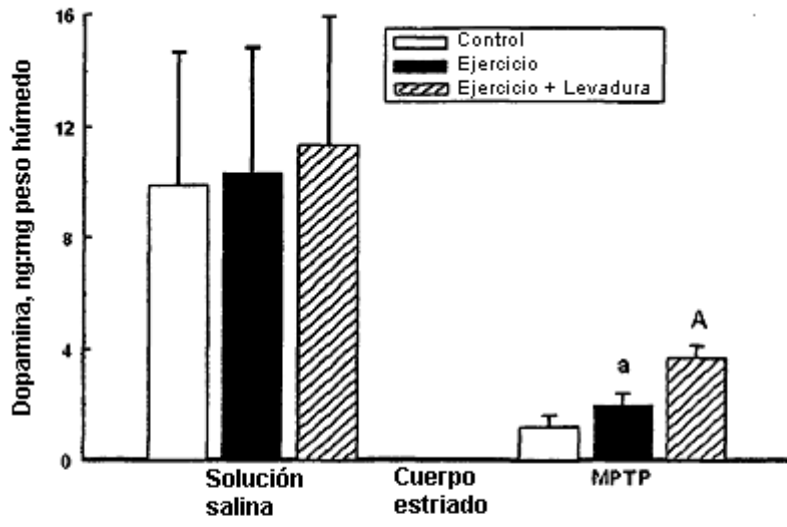
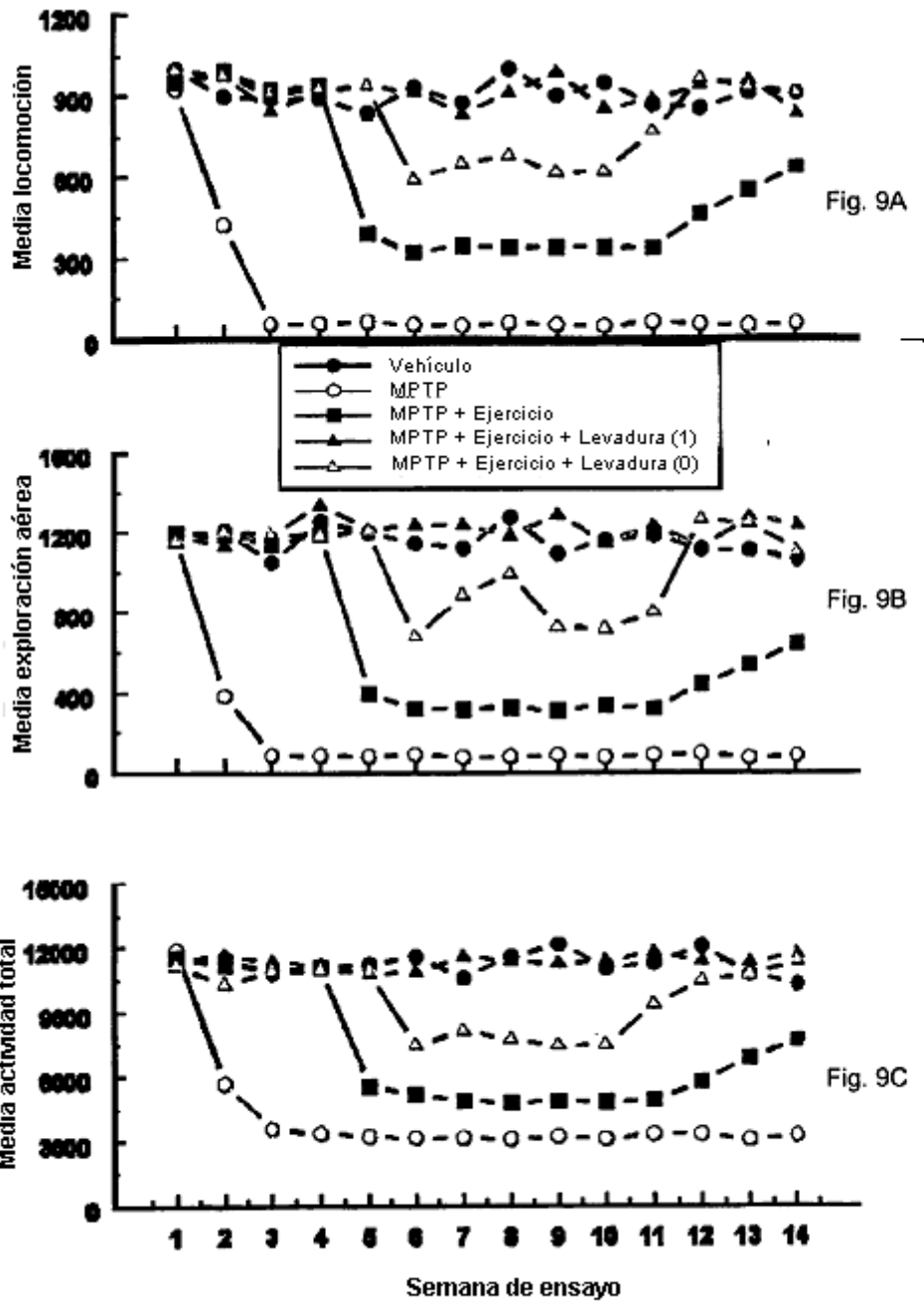
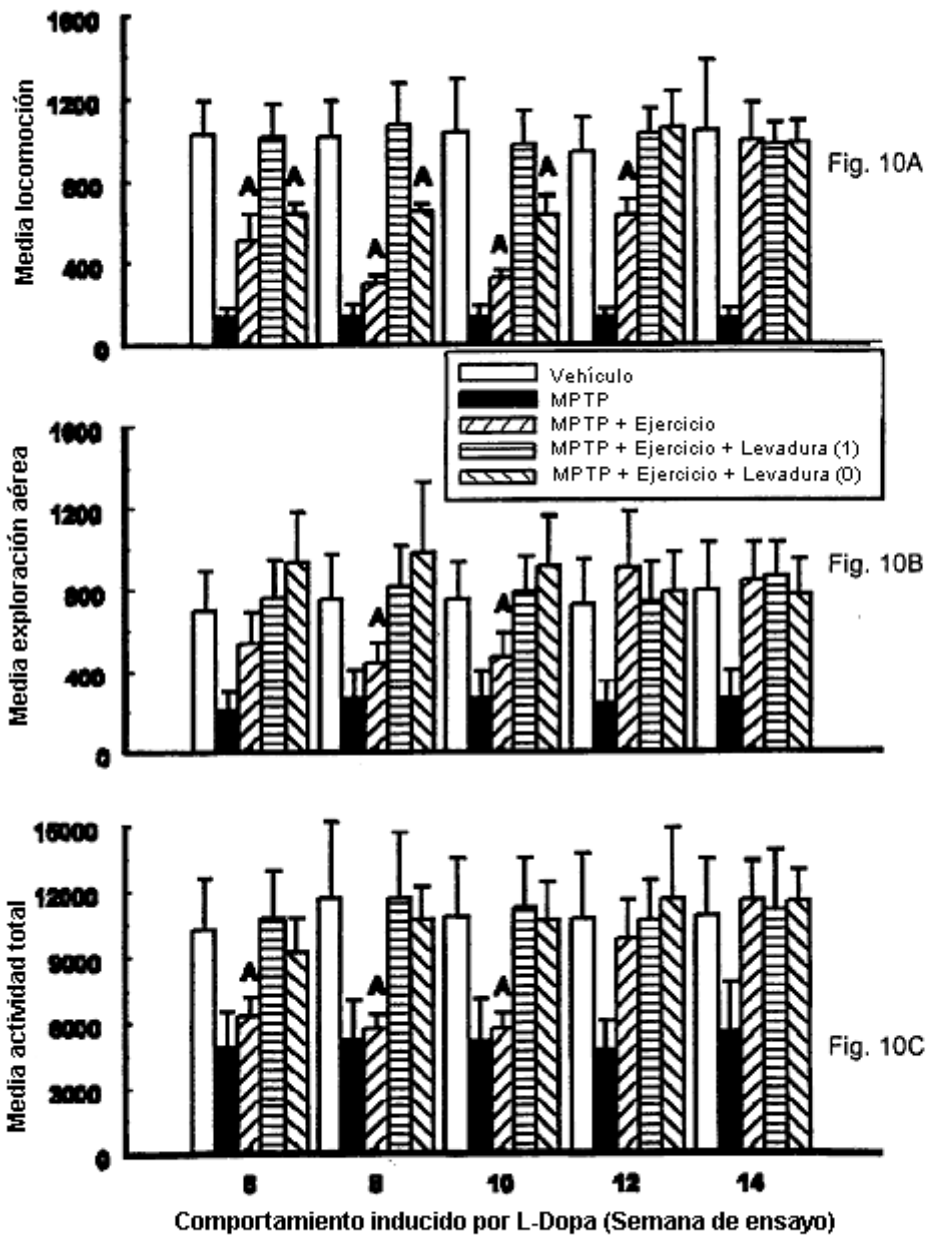


Fig. 8





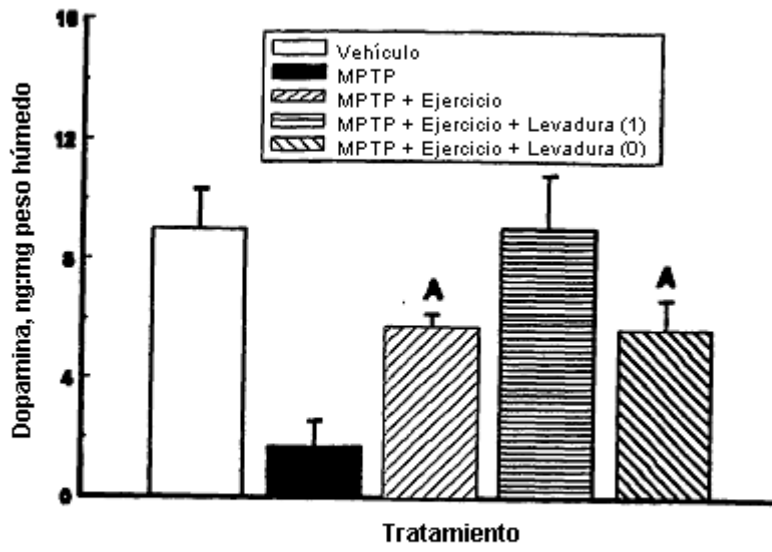


Fig. 11

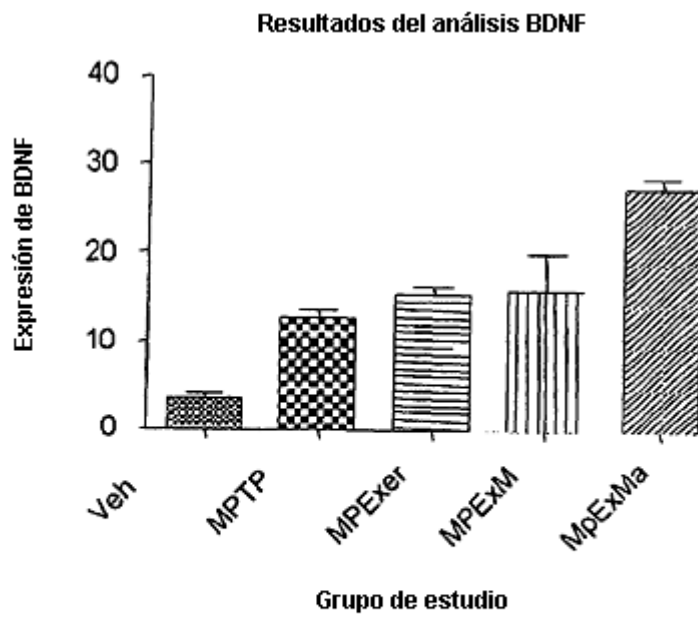
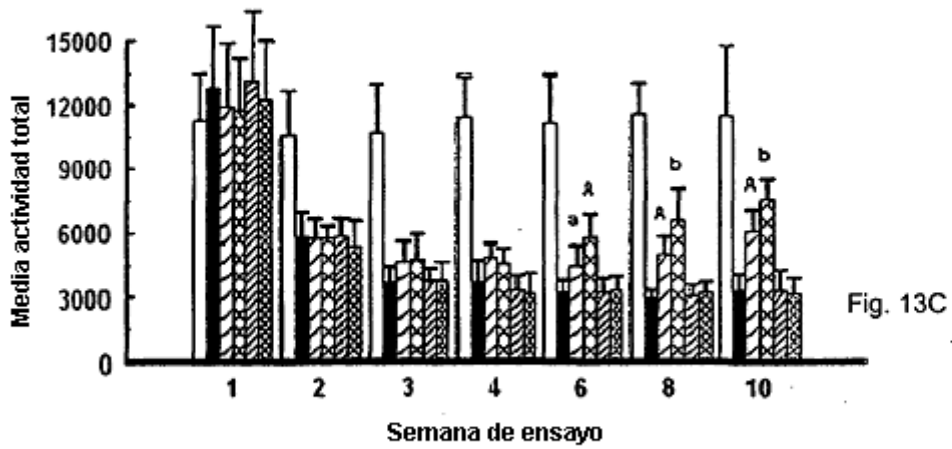
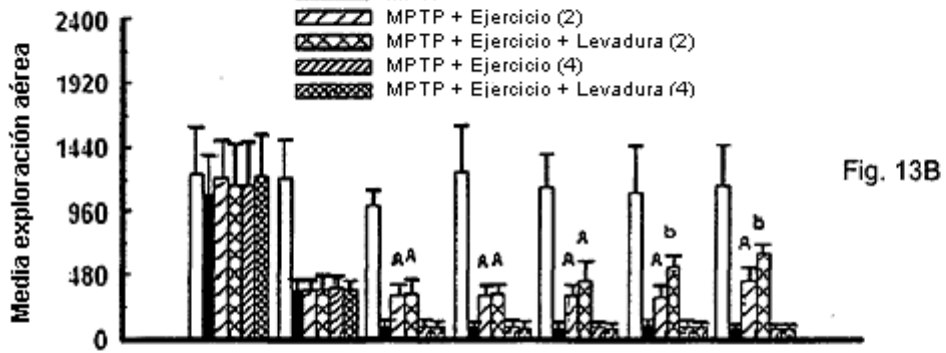
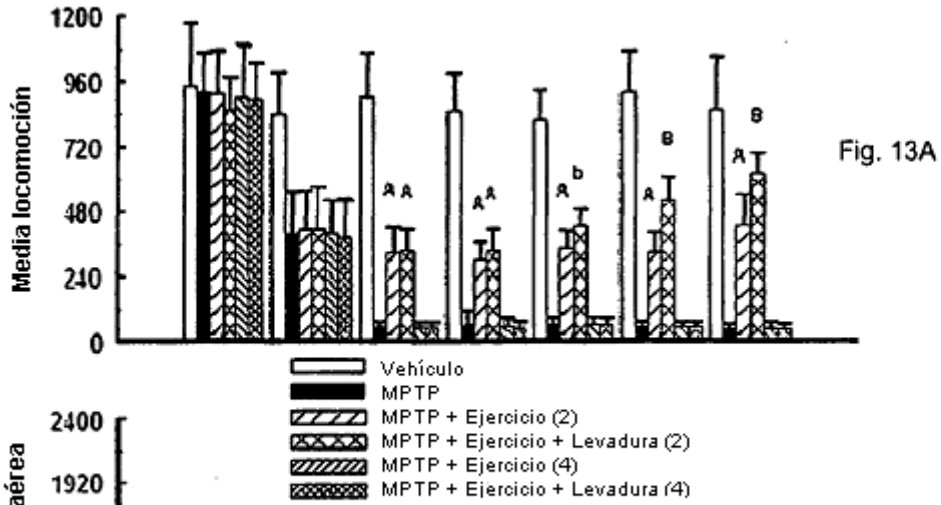
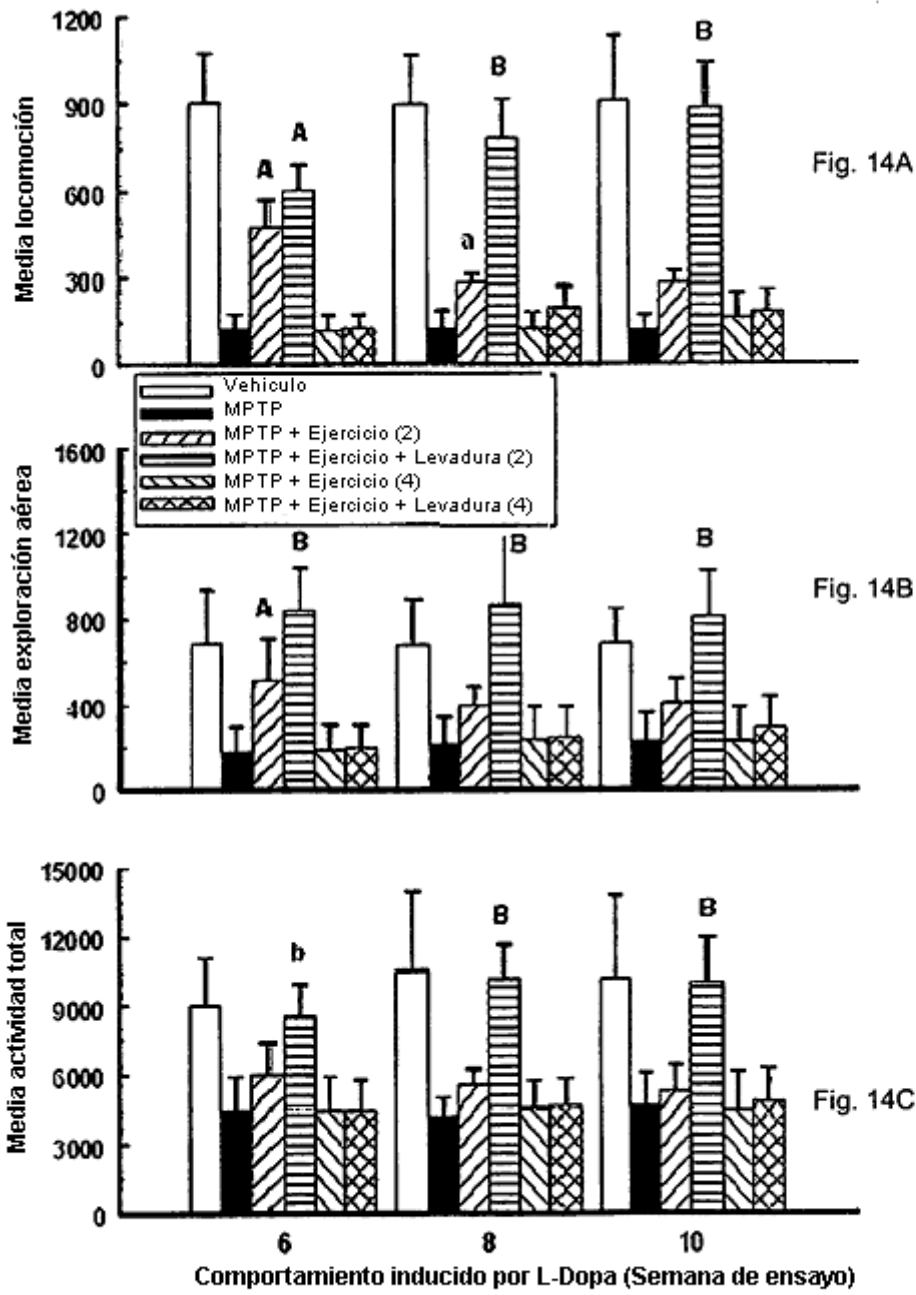


Fig. 12





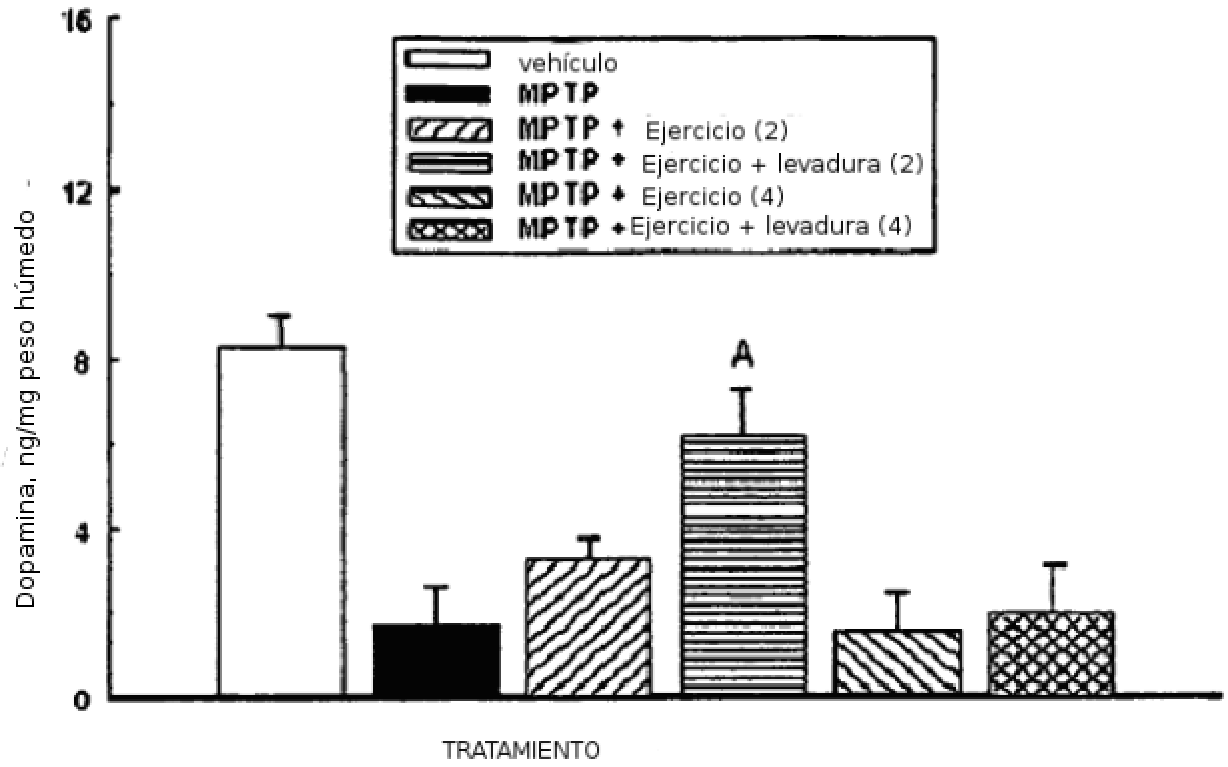


Fig. 15