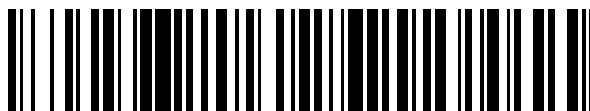


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 276**

51 Int. Cl.:

A23L 33/21 (2006.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A23K 20/163 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 16165862 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 3072398**

54 Título: **Expresión hipocámpica de Bifidobacterium longum y FNDC**

30 Prioridad:

15.04.2008 EP 08154550

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2018

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA;
ORNSTEIN, KURT y
CHERBUT, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 674 276 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

Expresión hipocámpica de *Bifidobacterium longum* y FNDC

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere en general a composiciones comestibles que incluyen probióticos. De manera más concreta la presente invención se refiere a composiciones comestibles que contienen *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, y a su uso para aumentar la expresión del FNDC en el hipocampo y/o para tratar o prevenir la ansiedad y trastornos relacionados.

10
15
20 Los trastornos de ansiedad afectan aproximadamente a 40 millones de adultos estadounidenses de 18 años o más. Esto supone en promedio alrededor del 18% de la población adulta. Un breve período de ansiedad puede ser causado, por ejemplo, por sucesos estresantes como exámenes o por circunstancias que se consideran un poco embarazosas. Sin embargo la ansiedad puede más duradera, por ejemplo de al menos medio año, y los estados de ansiedad pueden llegar a ser más graves e incapacitantes, si no se tratan. Los trastornos de ansiedad también pueden acompañar a otras enfermedades mentales o físicas, incluyendo el abuso de alcohol o sustancias. Los típicos trastornos de ansiedad son el trastorno de pánico, el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), el trastorno de estrés postraumático (TEPT), la fobia social (o trastorno de ansiedad social), las fobias específicas y el trastorno de ansiedad generalizada (TAG).

En la actualidad se dispone de algunas terapias para los trastornos relacionados con la ansiedad. Los trastornos de ansiedad se tratan en general con medicamentos tales como antidepresivos, ansiolíticos o bloqueadores beta.

25 Los medicamentos alteran la química cerebral y a veces tienen efectos secundarios graves. También pueden tener interacciones indeseables con los fármacos que se toman frecuentemente.

30 Los inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina (ISRS) alteran los niveles del neurotransmisor serotonina en el cerebro, que favorece la comunicación de las células cerebrales. Los ISRS tienen menos efectos secundarios que los antidepresivos más antiguos, pero a veces producen ligeros mareos o nerviosismo cuando las personas empiezan a tomarlos por primera vez. Algunas personas también experimentan disfunción sexual con los ISRS.

Los antidepresivos tricíclicos producen a veces mareos, somnolencia, sequedad de boca y aumento de peso.

35 Los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) son la clase más antigua de fármacos antidepresivos. Las personas que toman IMAO no pueden tomar varios alimentos y bebidas (incluyendo queso y vino tinto) que contienen tiramina o ciertos medicamentos. También pueden interactuar con la cafeína. Los IMAO también pueden producir confusión, alucinaciones, aumento de la sudoración, rigidez muscular, convulsiones, cambios de la presión sanguínea o del ritmo cardíaco y otras afecciones potencialmente mortales.

40 Las benzodiazepinas pueden causar somnolencia y los pacientes pueden acostumbrarse a ellas. A menudo se refieren síntomas de abstinencia al dejar de tomar benzodiazepinas. También aumentan la ingesta de alimentos y perjudican la memoria.

45 Los bloqueadores beta pueden evitar los síntomas físicos que acompañan a ciertos trastornos de ansiedad, sobre todo la fobia social.

50 Toda esta medicación puede producir efectos secundarios no deseados. Como hay una gran cantidad de personas afectadas en mayor o menor grado por trastornos relacionados con la ansiedad, sería deseable disponer de una composición que pudiera administrarse de manera segura, sin riesgo de efectos secundarios.

La patente WO2004098622 describe un método para tratar la depresión, que consiste en administrar a un sujeto una cepa bacteriana.

55 No obstante los presentes inventores han encontrado que la efectividad del tratamiento y/o prevención de la ansiedad o de los trastornos relacionados con la ansiedad depende del género y especie de bacteria utilizada.

60 Por tanto la presente invención tenía por objeto proporcionar al estado técnico una composición que llevara una cepa bacteriana efectiva, fácilmente disponible, económica y segura de administrar, sin efectos secundarios no deseados, que pudiera usarse para tratar o prevenir trastornos relacionados con una baja expresión hipocámpica del FNDC, tales como la ansiedad o los trastornos relacionados con la ansiedad.

65 Los presentes inventores han abordado esta necesidad. Se sorprendieron al ver que podían conseguir este objetivo de acuerdo con el contenido de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan con mayor detalle la idea de la presente invención.

Por tanto, una forma de ejecución de la presente invención es una composición comestible que lleva *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. La *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está disponible comercialmente.

5 La *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (BL999) se puede obtener, por ejemplo, de Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca comercial BB536. Se puede cultivar siguiendo cualquier método adecuado y prepararla para la encapsulación o para añadirla a productos en forma liofilizada o secada por atomización.

10 La presente invención se revela haciendo referencia a la cepa de *Bifidobacterium longum* preferida, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

La *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 se encontró particularmente efectiva.

“Comestible” significa un material que está aprobado para el consumo humano o animal.

15 El término “*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999” pretende incluir la bacteria, partes de la bacteria y/o un medio de cultivo fermentado por la bacteria.

20 La composición comestible puede ser un medicamento, pero preferiblemente se trata de una composición alimenticia, de una composición alimenticia para animales domésticos, de un suplemento dietético, de un producto nutracéutico y/o de una bebida.

25 Que la composición de la presente invención sea comestible tiene la ventaja de que puede distribuirse en farmacias y tiendas de parafarmacia, e incluso en supermercados corrientes, donde las composiciones son fácilmente asequibles a todo el mundo.

El sabor generalmente agradable de las composiciones alimentarias contribuirá aún más a la aceptación del producto. En particular es mucho más probable que los niños pequeños o las mascotas consuman fácilmente composiciones de sabor generalmente apreciado.

30 Como ejemplos de productos alimenticios aplicables a la presente invención cabe mencionar: yogurts, leche, leche aromatizada, helados, postres listos para comer, polvos para reconstituir p.ej. con leche o agua, bebidas lácteas de chocolate, bebidas de malta, platos listos para comer, platos o bebidas instantáneas para humanos o composiciones alimentarias que constituyen una dieta completa o parcial destinada a mascotas o al ganado.

35 Por consiguiente, en una forma de ejecución, la composición según la presente invención es un producto alimenticio destinado a humanos, a mascotas o al ganado. En particular la composición está destinada a animales seleccionados del grupo formado por perros, gatos, cerdos, ganado, caballos, cabras, ovejas, aves de corral o seres humanos, y en una forma de ejecución preferida la composición es un producto alimenticio destinado a especies adultas, en particular a adultos humanos.

40 La composición de la presente invención puede llevar además hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes filmógenos, agentes/materiales de encapsulación, materiales de pared/ envoltura, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes surfactantes, solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, compuestos auxiliares, agentes dispersantes, humectantes, coadyuvantes de proceso (disolventes), fluidificantes, agentes enmascaradores del sabor, espesantes, gelificantes, antioxidantes y agentes antimicrobianos. La composición también puede contener aditivos y adyuvantes farmacéuticos convencionales, excipientes y diluyentes, incluyendo, sin limitarse a ellos, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, tampones, lubricantes, colorantes, cargas y similares. En todos los casos, dichos componentes adicionales se seleccionarán teniendo en cuenta su idoneidad para el destinatario previsto.

La composición puede ser una fórmula nutricionalmente completa.

55 La composición según la presente invención puede incluir una fuente proteica.

60 Se puede usar cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas lácteas, proteínas cárnicas y proteínas de huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de ellas. Se prefieren en particular las proteínas lácteas, como la caseína y el suero de leche, y las proteínas de soja.

65 Las proteínas pueden ser intactas o hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede convenir el aporte de proteínas parcialmente hidrolizadas (con un grado de hidrólisis comprendido entre el 2 y el 20%), por ejemplo para sujetos humanos y/o animales con riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se necesitan proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis se puede realizar como se desee y tal como se conoce en el estado técnico. Por ejemplo, se puede preparar un hidrolizado de proteína de suero de leche hidrolizando enzimáticamente

la fracción de suero en una o más etapas. Si la fracción de suero lácteo utilizada como material de partida está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis, lo cual permite que el grado de bloqueo de lisina disminuya aproximadamente del 15% en peso de lisina total hasta menos de aproximadamente el 10% en peso de lisina, por ejemplo hasta aproximadamente el 7% en peso de lisina, y esto mejora enormemente la calidad nutricional de la fuente proteica.

La composición también puede contener una fuente de carbohidratos y una fuente de grasa.

Si la composición incluye una fuente de grasa, ésta proporciona preferiblemente un 5% hasta 40% de la energía de la composición, por ejemplo del 20% hasta el 30% de la energía. Se puede conseguir un perfil adecuado utilizando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol alto en oleico.

Se puede añadir una fuente de carbohidratos a la composición.

La fuente de carbohidratos proporciona preferiblemente del 40% al 80% de la energía de la composición. Se puede usar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de ellos. Si se desea también puede agregarse fibra dietética. La fibra dietética atraviesa el intestino delgado sin ser digerida por los enzimas y actúa como agente volumétrico y laxante natural. La fibra dietética puede ser soluble o insoluble y en general se prefiere una mezcla de los dos tipos. Como fuentes adecuadas de fibra dietética cabe citar: soja, guisantes, avena, pectina, goma guar, goma guar parcialmente hidrolizada, goma arábica, fructooligosacáridos, oligosacáridos ácidos, galactooligosacáridos, sialil-lactosa y oligosacáridos derivados de leches animales. Una mezcla preferida de fibras es una combinación de inulina con fructooligosacáridos de cadena más corta. Cuando la composición lleva fibra, su contenido está comprendido preferiblemente entre 2 y 40 g/l de la composición tal como se consume, con mayor preferencia entre 4 y 10 g/l.

La composición también puede contener minerales y micronutrientes tales como trazas de elementos y vitaminas, de acuerdo con las recomendaciones de organismos gubernamentales como el USRDA. Por ejemplo, una dosis diaria de la composición puede contener uno o más de los siguientes micronutrientes dentro de los intervalos indicados: 300 hasta 500 mg de calcio, 50 hasta 100 mg de magnesio, 150 hasta 250 mg de fósforo, 5 hasta 20 mg de hierro, 1 hasta 7 mg de cinc, 0,1 hasta 0,3 mg de cobre, 50 hasta 200 µg de yodo, 5 hasta 15 µg de selenio, 1000 hasta 3000 µg de beta caroteno, 10 hasta 80 mg de vitamina C, 1 hasta 2 mg de vitamina B1, 0,5 hasta 1,5 mg de vitamina B6, 0,5 hasta 2 mg de vitamina B2, 5 hasta 18 mg de niacina, 0,5 hasta 2,0 µg de vitamina B12, 100 hasta 800 µg de ácido fólico, 30 hasta 70 µg de biotina, 1 hasta 5 µg de vitamina D, 3 hasta 10 µg de vitamina E.

Si se desea puede incorporarse a la composición uno o más emulsionantes de grado alimentario, por ejemplo ésteres de ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos, lecitina y mono- y diglicéridos. Análogamente pueden incluirse sales y estabilizantes adecuados.

La composición se puede administrar, preferiblemente, por vía oral o enteral, por ejemplo en forma de un producto en polvo reconstituible con leche o con agua.

Según una forma de ejecución preferida de la presente invención, la composición comprende al menos otro tipo de microorganismo de grado alimentario.

Son microorganismos de "grado alimentario" aquellos que son seguros para ser utilizados en alimentos.

Los microorganismos de grado alimentario son, preferentemente, bacterias o levaduras de grado alimentario. Las bacterias de grado alimentario se pueden seleccionar del grupo formado por bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de ellas. Como levadura de grado alimentario se puede usar por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* y/o *Saccharomyces boulardii*.

Las bacterias de grado alimentario pueden ser bacterias probióticas.

"Probiótico" se refiere a los preparados o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso en la salud o bienestar del huésped (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. y otros "Probiotics: how should they be defined [*Probióticos: cómo deben definirse*]" Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10).

Las bacterias probióticas se eligen preferiblemente del grupo formado por bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de ellas. Las bacterias probióticas pueden ser cualquier tipo de bacteria de ácido láctico o de bifidobacteria con características probióticas comprobadas. Por ejemplo, también pueden tener la capacidad de promover el desarrollo de una microbiota intestinal bifidogénica.

Se pueden seleccionar probióticos adecuados del grupo formado por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* o mezclas de ellos, en particular del grupo formado por *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus*

reuteri o mezclas de ellos, preferiblemente del grupo formado por *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM 1-1225), *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM 1-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2705; CNCM 1-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM 1-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM 1-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB10415) y mezclas de los mismos.

En una forma de ejecución preferida de la presente invención la composición contiene además al menos un prebiótico. "Prebiótico" se refiere a sustancias alimenticias destinadas a promover el crecimiento de bacterias probióticas en los intestinos.

Así, los prebióticos pueden promover el crecimiento de ciertas bacterias de grado alimentario, en concreto de bacterias probióticas en los intestinos, y por tanto aumentar el efecto del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Además hay varios prebióticos que tienen una influencia positiva, p.ej. en la digestión.

El prebiótico se selecciona preferiblemente del grupo formado por oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina, fibras dietéticas o mezclas de ellos.

El *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 se puede emplear como bacteria viva y también como especie bacteriana inactivada.

Es preferible que al menos una parte del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está vivo en la composición y que llegue preferiblemente vivo al intestino. De esta manera puede persistir en el intestino y aumentar su efectividad por multiplicación. También puede ser efectivo interactuando con las bacterias comensales y/o el huésped.

Para productos alimenticios especialmente esterilizados o para medicamentos, por ejemplo, puede ser preferible que el *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no esté vivo en la composición. Por tanto, en una forma de ejecución de la presente invención al menos una parte del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no está vivo en la composición.

El *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 será efectivo a cualquier concentración.

Para la composición de la presente invención se prefiere en general que una dosis diaria de composición contenga entre 10^4 y 10^{12} ufc (unidades formadoras de colonias) de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Una dosis diaria particularmente adecuada de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está comprendida entre 10^5 y 10^{11} ufc, con mayor preferencia entre 10^7 y 10^{10} ufc.

La composición de la presente invención también puede contener entre 10^2 y 10^{10} ufc, preferiblemente entre 10^3 y 10^8 unidades formadoras de colonias, con mayor preferencia entre 10^5 y 10^8 ufc de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por gramo de peso seco de composición.

En el caso del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 inactivado es preferible en general que la composición de la presente invención lleve entre 10^2 y 10^{10} células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por gramo del peso seco de composición. Una dosis particularmente adecuada de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 es de 10^3 hasta 10^8 células no replicantes, con mayor preferencia de 10^5 hasta 10^8 células no replicantes por gramo de peso seco de composición.

Los presentes inventores se sorprendieron en particular al encontrar que la composición de la presente invención se podía usar con éxito para aumentar significativamente la expresión del FNDC en el hipocampo.

El FNDC (factor neurotrófico derivado del cerebro) es un factor de crecimiento procedente de una familia única de factores de crecimiento polipeptídicos que influyen en la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte de células neuronales y no neuronales. El FNDC y los otros factores neurotróficos, p.ej. FCN (factor de crecimiento nervioso), NT-3 (neurotrofina-3) y NT-4 (neurotrofina-4) son esenciales para la salud y el bienestar del sistema nervioso y median en actividades de orden superior tales como aprendizaje, memoria y comportamiento, además de su intervención en la supervivencia celular. Las alteraciones de los niveles de neurotrofina han sido relacionadas con trastornos de tipo neurodegenerativo, tales como las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson, y también de tipo psiquiátrico, incluyendo la depresión y el abuso de sustancias (Chao y otros, 2006, Clin. Sci., 110: 167-173).

Por tanto una forma de ejecución de la presente invención es la composición comestible que contiene *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 y/o su medio de cultivo para incrementar la expresión del FNDC en el hipocampo.

La presente invención también se refiere al uso de la composición arriba descrita en la preparación de una formulación para incrementar la expresión del FNDC en el hipocampo.

Por consiguiente el *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 y/o la composición de la presente invención se pueden emplear para tratar o prevenir trastornos relacionados con una expresión disminuida del FNDC en el hipocampo. La administración de una dosis efectiva de *Bifidobacterium longum*, en particular de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, también ayudará a atenuar la disminución de la expresión del FNDC en el hipocampo.

Por consiguiente la composición de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir la ansiedad y/o los trastornos relacionados con ella, así como sus síntomas.

El trastorno relacionado con la ansiedad puede seleccionarse del grupo formado por depresión, abuso de sustancias, como por ejemplo abuso de alcohol, abuso de cocaína, abuso de opiáceos, comer compulsivamente y efectos nocivos del estrés tales como trastornos del sueño y alteraciones cognitivas.

El *Bifidobacterium longum* ATCC BAA999 y/o la composición de la presente invención también se puede emplear en particular para reducir la cantidad de medicación necesaria para tratar o prevenir los trastornos relacionados con una expresión disminuida del FNDC en el hipocampo.

Para los especialistas en la materia es obvio que las características descritas en esta exposición se pueden combinar libremente de cualquier modo, sin apartarse del alcance de la presente invención tal como está revelada. En particular, todas las características de la composición descritas en la presente invención son aplicables al empleo de la misma y viceversa.

Otras características y ventajas de la presente invención se deducen de los siguientes ejemplos y figuras:

La figura 1 muestra el resultado de una prueba de la caja negra/caja iluminada: tiempo total pasado en la caja iluminada y tiempo de latencia para volver a entrar en la caja iluminada, y de una prueba de descenso de escalón, con ratones infectados de *Trichuris muris* (Tm). Tm-medio y Tm-B. longum son ratones infectados de Tm tratados respectivamente con medio fresco (control negativo) y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; como comparación se muestra un grupo de Tm tratado con una cepa de *L. rhamnosus* (L. rh).

La figura 2 muestra los resultados de la hibridación in situ en la región del hipocampo cerebral de ratones infectados de *Trichuris muris* (Tm). Tm-B. longum son ratones infectados de Tm tratados con *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; como comparación se muestra un grupo de Tm tratado con una cepa de *L. rhamnosus*. La cuantificación de las señales de S³⁵ se realizó por autorradiografía y análisis de imágenes (panel superior derecho).

La figura 3 muestra los resultados obtenidos de la inflamación del colon medidos mediante el ensayo de actividad de mieloperoxidasa (panel izquierdo) e infiltración de células mononucleares (panel derecho) en ratones infectados de *Trichuris muris* (Tm). Tm-medio y Tm-B. longum son ratones infectados con Tm tratados respectivamente con medio reciente (control negativo) y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; como comparación se muestra un grupo de Tm tratado con una cepa de *L. rhamnosus*.

La figura 4 muestra el resultado de una prueba de la caja negra/caja iluminada: tiempo total pasado en la caja iluminada y tiempo de latencia para volver a entrar en la caja iluminada, y de una prueba de descenso de escalón, con ratones afectados de colitis crónica inducida por DSS. DSS-medio y DSS-B. longum son ratones con colitis inducida por DSS tratados respectivamente con medio fresco (control negativo) o *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

La figura 5 muestra los resultados de la hibridación in situ en la región del hipocampo cerebral de ratones afectados de colitis crónica inducida por DSS. DSS-medio y DSS-B. longum son ratones con colitis inducida por DSS tratados respectivamente con medio fresco (control negativo) o *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. La cuantificación de las señales de S³⁵ se realizó por autorradiografía y análisis de imágenes (panel superior derecho).

La figura 6 muestra los resultados obtenidos de la inflamación del colon medidos mediante el ensayo de actividad de mieloperoxidasa (panel izquierdo) e infiltración de células mononucleares (panel derecho) en ratones afectados de colitis crónica inducida por DSS. DSS-medio y DSS-B. longum son ratones con colitis inducida por DSS tratados respectivamente con medio fresco (control negativo) o *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

La figura 7 muestra el resultado de una prueba de comportamiento similar a la ansiedad (prueba de descenso de escalón) efectuada con ratones afectados de colitis crónica inducida por DSS y tratados además con medio fresco (MRS, control negativo) o varias especies de *Bifidobacterium*. La cepa de *B. longum* ensayada fue *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; para comparar se muestran los resultados obtenidos con cepas de *B. lactis*, *B. animalis* y *B. infantis*.

Ejemplos:

Los ratones infectados crónicamente con el parásito *Trichuris muris* mostraron un aumento del comportamiento similar a la ansiedad en dos pruebas conductuales: 1) en la prueba de la caja negra/caja iluminada los animales infectados pasaron menos tiempo en la caja iluminada y aumentó su tiempo de latencia para volver a entrar en la caja iluminada; 2) en la prueba de descenso de escalón la infección aumentó el tiempo de latencia para bajar de la plataforma (fig. 1). El efecto en el comportamiento se correlacionó con una recuperación del descenso mediado por *Trichuris muris* de los niveles de FNDC en el hipocampo, observada solamente en los ratones tratados con *B. longum* (fig. 2). Por el contrario, el tratamiento con *B. longum* y con *L. rhamnosus* redujo la actividad de mieloperoxidasa y la infiltración mononuclear previamente inducida por la infección de *Trichuris muris* (fig. 3), lo cual indica que la normalización del comportamiento era independiente del efecto antiinflamatorio de la bacteria.

El efecto del *B. longum* se confirmó en el modelo murino de colitis crónica inducida por DSS. Aunque en menor medida que el impacto debido a la infección por *Trichuris muris*, el DSS aumentó la ansiedad (fig. 4) y tendió a disminuir los niveles de FNDC en el hipocampo (fig. 5). El tratamiento de ratones DSS con *B. longum* disminuyó la ansiedad incluso por debajo de los niveles de los ratones control, como lo demuestra en la prueba de la caja negra/caja iluminada un aumento del tiempo total pasado en la caja iluminada y una disminución del tiempo para volver a entrar en ella y del número de cruces (fig. 4) y también una reducción del tiempo de latencia para bajar de la plataforma observado en la prueba de descenso de escalón (fig. 4). Asimismo, de acuerdo con las pruebas de comportamiento, el tratamiento con *B. longum* aumentó los niveles de FNDC en el hipocampo respecto a los niveles basales (fig. 5). Análogamente a lo observado en el modelo de infección por *Trichuris muris*, el *B. longum* rebajó la inflamación del colon (fig. 6).

Para determinar si la capacidad del *B. longum* para recuperar la conducta alterada era común a otras bifidobacterias medimos el efecto en el comportamiento del *B. longum* en paralelo con otras tres especies de *Bifidobacterium*: una *B. lactis*, una *B. animalis* y una *B. infantis*, empleando el modelo de colitis inducida por DSS y la prueba de descenso de escalón (fig. 7). Aparte del *B. longum* ninguna de las otras especies de *Bifidobacterium* ensayadas fue capaz de reducir el tiempo de latencia para bajar de la plataforma, lo cual indica claramente que esta particularidad del *B. longum* no es extrapolable a otras especies del género *Bifidobacterium*.

Materiales y métodos:

Condiciones de cultivo bacteriano

Los probióticos fueron cultivados bajo condiciones anaeróbicas en caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS, BioMerieux) (bifidobacterias con 0,5% de cisteína). Tras 24 h a 37°C se estimó el número de bacterias midiendo la densidad óptica a 600 nm ($1 \text{ DO}_{600} = 10^8$ bacterias/ml). Las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación a 5000 X g durante 15 minutos a 4°C y después se resuspendieron a una concentración de 10^{10} /ml en su medio de cultivo agotado. Se conservaron alícuotas de 1 ml congelados hasta su uso.

Animales

Se adquirieron ratones macho BALB/c o AKR (Harlan, Canadá) de 6-8 semanas de edad y se alojaron en una unidad convencional específica libre de patógenos en la Instalación central de animales de la universidad McMaster. Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de cuidado de animales de la universidad McMaster.

Diseño

Infección crónica por *Trichuris muris* (véase figure 8, panel A):

Se administró por sonda a ratones AKR macho *T. muris* (300 huevos/ratón) ($n = 26$) o placebo ($n = 9$). Los ratones infectados se sometieron luego a una administración diaria de *L. rhamnosus*, *B. longum* o MRS fresco por sonda desde el día 30, durante 10 días. A los ratones no infectados se les administró MRS fresco diariamente desde el día 30 hasta el día 40. Al final de la administración de probióticos o de placebo los ratones se sometieron a pruebas de caja negra/ caja blanca y de descenso de escalón. A continuación se sacrificaron los ratones y se obtuvieron muestras de tejido. Las muestras de colon se fijaron en formalina para análisis histológico o se congelaron rápidamente para determinar la MPO. Los cerebros se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron para la hibridación in situ.

Colitis crónica por DSS (véase figura 8, panel B):

Se trataron ratones AKR macho ($n = 20$) con tres ciclos de dextrano sulfato sódico al 3% (MP Biomedicals, Solon, Ohio, EUA) (un ciclo consta de 1 semana de DSS seguida de 1 semana de periodo de lavado). El grupo adicional de ratones ($n = 10$) solo recibió agua potable con placebo. A los ratones infectados se les administró diariamente por sonda *B. longum* u otras *Bifidobacterias* durante 2 semanas en el último ciclo de tratamiento con DSS. A los ratones

de control se les administró diariamente por sonda MRS durante 2 semanas. Al final de la administración de probióticos o placebo los ratones se sometieron a pruebas de caja negra/caja blanca y/o de descenso de escalón. A continuación se sacrificaron los ratones y se obtuvieron muestras de tejido. Las muestras de colon se fijaron en formalina para análisis histológico o se congelaron rápidamente para determinar la MPO. Los cerebros se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron para la hibridación in situ.

Pruebas de comportamiento

Caja negra/caja iluminada (véase figura 8, panel C):

El comportamiento de ansiedad de los ratones se evaluó individualmente usando el sistema de caja negra/caja blanca descrito en la literatura. En resumen, cada ratón se colocó en el centro de una caja blanca iluminada (de 30 x 30 cm) conectada por una abertura (de 10 x 3 cm) a una caja negra más pequeña (de 30 x 15 cm). Con una cámara de video digital se grabó durante 10 minutos el comportamiento locomotor de cada ratón en una caja blanca y se almacenó en un ordenador para analizarlo fuera de línea. Varios parámetros fueron evaluados por un observador ciego, incluyendo el tiempo total pasado en la caja blanca, el tiempo de latencia para volver a entrar en la caja blanca (tiempo pasado en la caja negra después de la primera entrada) y el número de cruces (número de idas de la caja negra a la caja blanca).

Prueba de descenso de escalón (véase figura 8, panel D):

El comportamiento de ansiedad se evaluó mediante la prueba de descenso de escalón tal como está descrita en la literatura. En resumen, cada ratón se colocó en el centro de una plataforma elevada (7,5 cm de diámetro, 3 cm de altura) situada sobre el centro de un suelo negro. El tiempo de latencia para bajar de la plataforma se midió con un cronómetro; la duración máxima de la prueba fue de 5 min.

Histología

Las muestras de colon se fijaron en formalina al 10% y luego se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los portaobjetos se examinaron al microscopio óptico para valorar la infiltración inflamatoria aguda y crónica.

Ensayo de actividad de mieloperoxidasa

Para evaluar la inflamación intestinal aguda se efectuó un ensayo de actividad de mieloperoxidasa (MPO) en tejidos congelados del modo anteriormente descrito. La actividad MPO se expresa en unidades por mg de tejido, donde una unidad de MPO se define como la cantidad del enzima capaz de convertir 1 μ mol de peróxido de hidrógeno en agua durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Hibridación in situ en el CNS

Los niveles de FNDC en el hipocampo se evaluaron por hibridaciones in situ, usando sondas de ARN marcadas con S^{35} en cortes de cerebro congelados de la manera arriba descrita (Whitfield y otros, 1990; Foster y otros, 2002). En resumen, los cerebros se extrajeron y se congelaron rápidamente por inmersión en 2-metilbutano a $-60^{\circ}C$ y se guardaron a $-70^{\circ}C$. Los cortes coronales de 12 μ m de grosor realizados con criostato se montaron sobre portaobjetos recubiertos de gelatina, se secaron y se conservaron a $-35^{\circ}C$. Los cortes de tejido se fijaron con formaldehído al 4%, se acetiló con anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina-HCl 0,1 M, a pH 8,0, se deshidrató y se deslipidó con cloroformo. La sonda ribonucleótida antisentido para FNDC se transcribió a partir del plásmido linealizado usando el sistema Riboprobe (Promega Biotech, Burlington, ON) con α - S^{35} -UTP (actividad específica > 1000 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA) y las polimerasas T3 y T7 respectivamente. Las sondas radiomarcadas se diluyeron en un tampón de hibridación (NaCl 0,6 M, Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0, 10% de sulfato de dextrano, 0,01% de ADN de esperma de salmón fragmentado, 0,05% de ARN total de levadura tipo XI, 0,01% de ARNt de levadura, 1x solución de Denhardt) y se aplicaron sobre los cortes cerebrales (aproximadamente 500.000 CPM/corte). Los portaobjetos se incubaron durante la noche a $55^{\circ}C$ en una cámara humidificada. Para restringir la unión no específica de la sonda, los portaobjetos se lavaron en 20 μ g/ml de solución de RNasa durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de 1 hora en 2 X SSC a $50^{\circ}C$, 0,2 X SSC a 55° y $60^{\circ}C$ respectivamente. Los portaobjetos se deshidrataron y se secaron al aire para autorradiografiarlos. Los portaobjetos y los patrones de plástico de C^{14} se colocaron en casetes de rayos X sobre una película (BioMax MR, Eastman Kodak, Rochester, NY) durante 5 días y se revelaron (procesador de rayos X Kodak Medical). Las imágenes de la película autorradiográfica de los cortes cerebrales y los patrones se digitalizaron con una cámara de estado sólido dotada de una lente Nikon de 60 mm, usando el programa QCapture (Qicam; Quorum Technologies Inc., Guelph, ON) y un sistema de análisis de imágenes basado en ordenador Macintosh con el programa Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). La transmitancia de la luz a través de la película se midió perfilando la estructura en el monitor. Para el ARNm de FNDC, la transmitancia se convirtió a niveles de radiactividad usando la curva de Rodbard aplicada a los patrones. Los DPM calculados se multiplicaron luego por el área para producir una medición de densidad integrada. Las ilustraciones se hicieron directamente a partir de las imágenes capturadas.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar o medianas con rangos intercuartiles, según corresponda. Los datos se analizaron utilizando ANOVA bidireccional y prueba t pareada o no apareada, según correspondiera. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Aquí se revela:

1. Una composición comestible que contiene *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
2. Composición de acuerdo con el párrafo 1, la cual es una composición alimenticia, una composición de comida para mascotas, un suplemento dietético, una bebida y/o una composición medicinal.
3. Composición de acuerdo con uno de los párrafos 1-2, que además contiene al menos otro tipo de bacterias de grado alimentario, seleccionadas preferentemente del grupo formado por bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de ellas.
4. Composición de acuerdo con uno de los párrafos 1-3, que además contiene al menos un prebiótico.
5. Composición de acuerdo con el párrafo 4, en la cual el prebiótico se elige del grupo formado por oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina, fibras dietéticas o mezclas de ellos.
6. Composición de acuerdo con uno de los párrafos 1-5, en la cual al menos una parte del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está vivo en la composición.
7. Composición de acuerdo con uno de los párrafos 1-5, en la cual al menos una parte del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no está vivo en la composición.
8. Composición de acuerdo con uno de los párrafos 1-7, la cual contiene entre 10^4 y 10^{10} células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por dosis diaria.
9. Composición de acuerdo con uno de los párrafos 1-7, la cual contiene entre 10^2 y 10^8 células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por g de peso seco de la composición.
10. Composición de acuerdo con los párrafos 1-9 para incrementar la expresión del FNDC en el hipocampo.
11. Composición de acuerdo con el párrafo 10 para tratar o prevenir la ansiedad y/o los trastornos relacionados con ella.
12. Composición de acuerdo con el párrafo 11, en que el trastorno relacionado con la ansiedad se selecciona del grupo formado por depresión, abuso de sustancias, como por ejemplo abuso de alcohol, abuso de cocaína, abuso de opiáceos, comer compulsivamente y efectos nocivos del estrés tales como trastornos del sueño.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición comestible que lleva *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 para tratar o prevenir los trastornos relacionados con una menor expresión del FNDC en el hipocampo, siendo los trastornos relacionados con una menor expresión del FNDC la ansiedad y/o trastornos relacionados con la ansiedad seleccionados del grupo formado por el trastorno de pánico, el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), el trastorno de estrés postraumático (TEPT), el trastorno de ansiedad social, el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), la depresión, el abuso de sustancias, la alimentación compulsiva y los efectos nocivos del estrés.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que es una composición alimenticia, una composición de comida para mascotas, un suplemento dietético, una bebida y/o una composición medicinal.
- 15 3. Composición según una de las reivindicaciones 1-2, que además contiene al menos otro tipo de bacterias de grado alimentario, seleccionadas preferentemente del grupo formado por bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de ellas.
- 20 4. Composición según una de las reivindicaciones 1-3, que además contiene al menos un prebiótico.
- 5 5. Composición según la reivindicación 4, en la cual el prebiótico se elige del grupo formado por oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina, fibras dietéticas o mezclas de ellos.
- 25 6. Composición según una de las reivindicaciones 1-5, en la cual al menos una parte del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está vivo en la composición.
- 30 7. Composición según una de las reivindicaciones 1-5, en la cual al menos una parte del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no está vivo en la composición.
- 35 8. Composición según una de las reivindicaciones 1-7, la cual contiene entre 10^4 y 10^{10} células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por dosis diaria.
9. Composición según una de las reivindicaciones 1-7, la cual contiene entre 10^2 y 10^8 células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por g de peso seco de la composición.
10. Composición según una de las reivindicaciones 1-9 para incrementar la expresión del FNDC en el hipocampo.
11. Composición según una de las reivindicaciones 1-10 para tratar o prevenir la ansiedad.
- 40 12. Composición según una de las reivindicaciones 1-10, en que el trastorno relacionado con la ansiedad se elige del grupo formado por depresión, abuso de sustancias, como por ejemplo abuso de alcohol, abuso de cocaína, abuso de opiáceos, alimentación compulsiva y efectos nocivos del estrés, tales como trastornos del sueño y alteraciones cognitivas

FIG. 1

Comportamiento de tipo ansioso

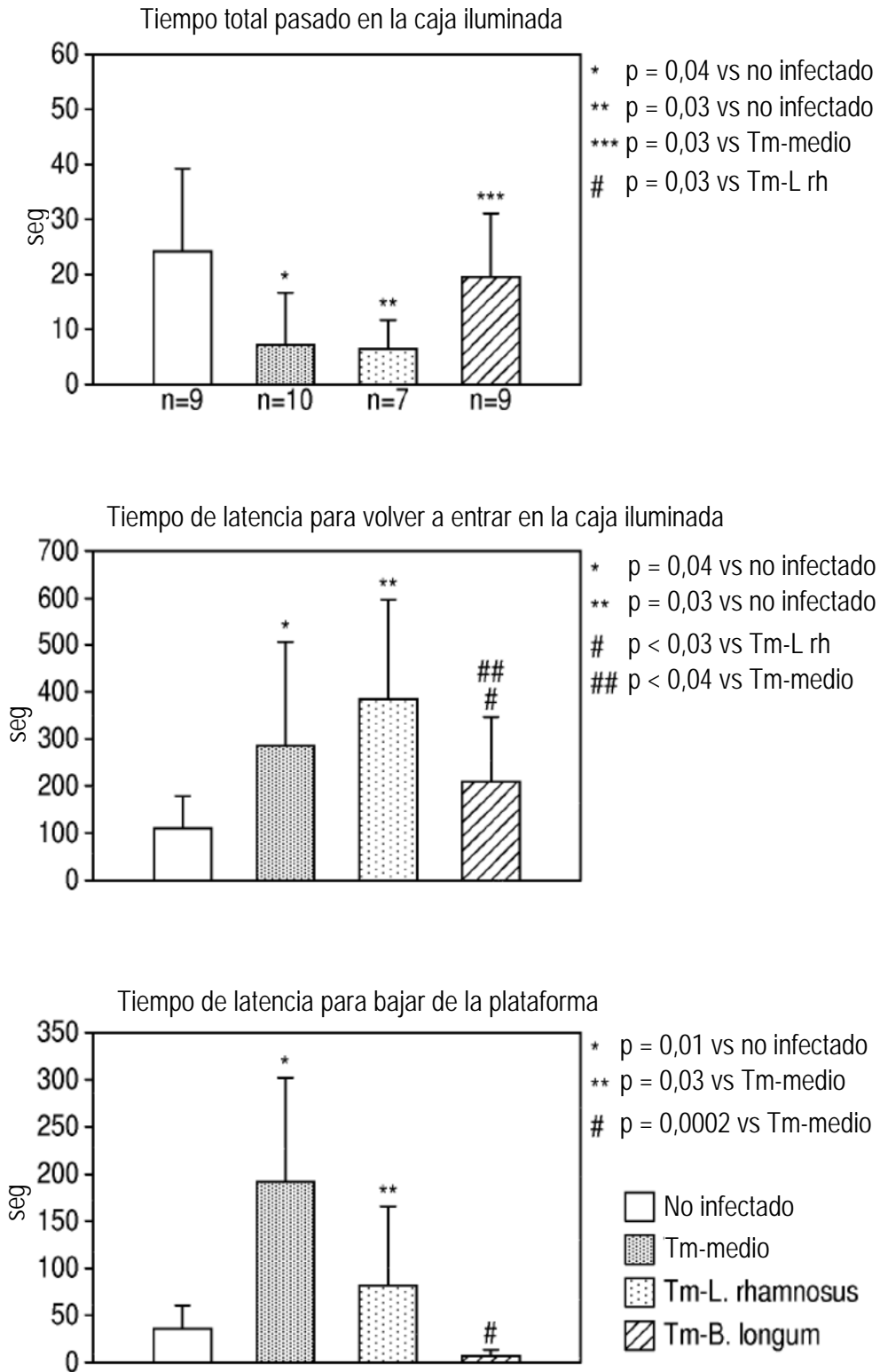


FIG. 2

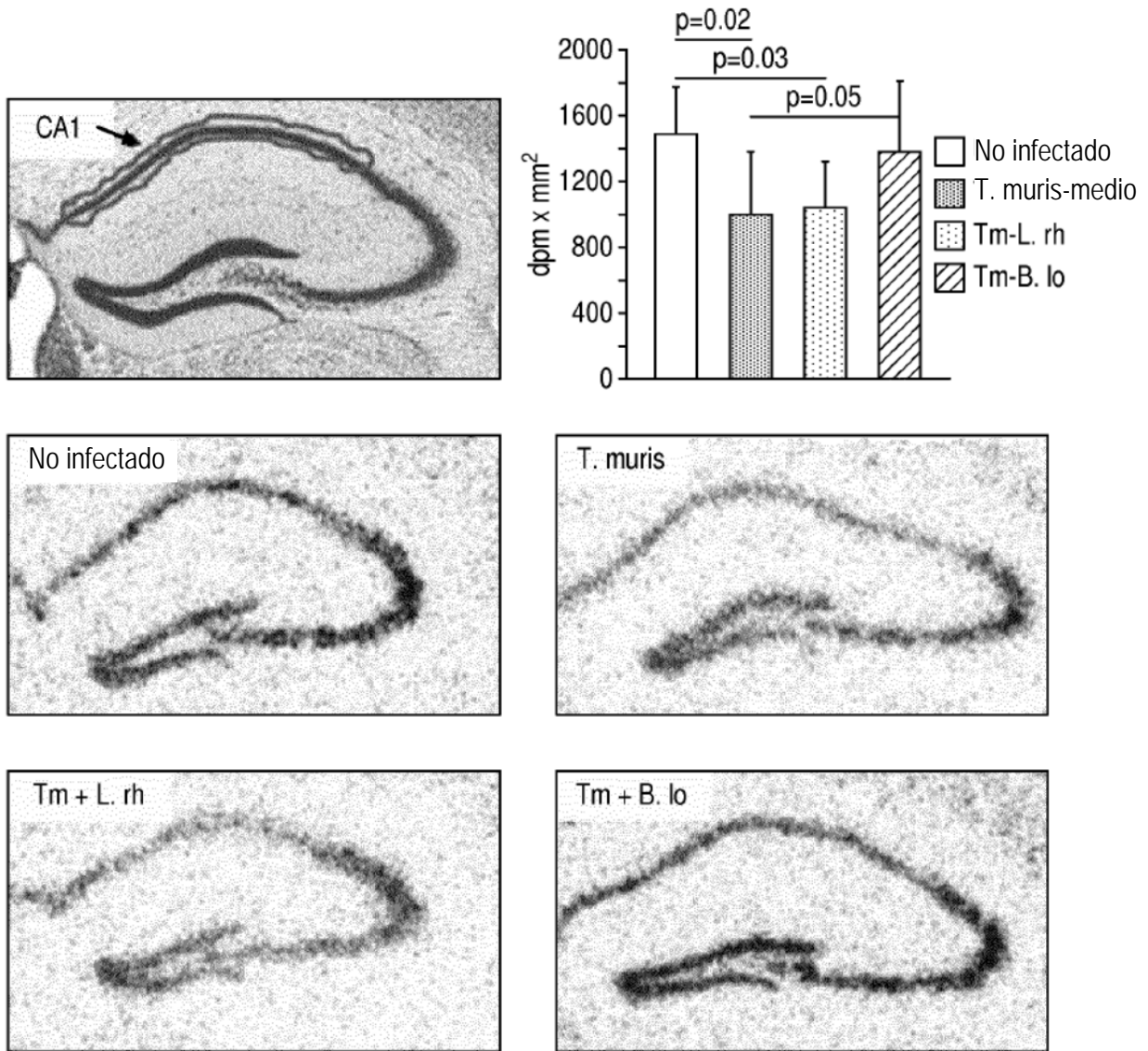


FIG. 3

Inflamación del colon

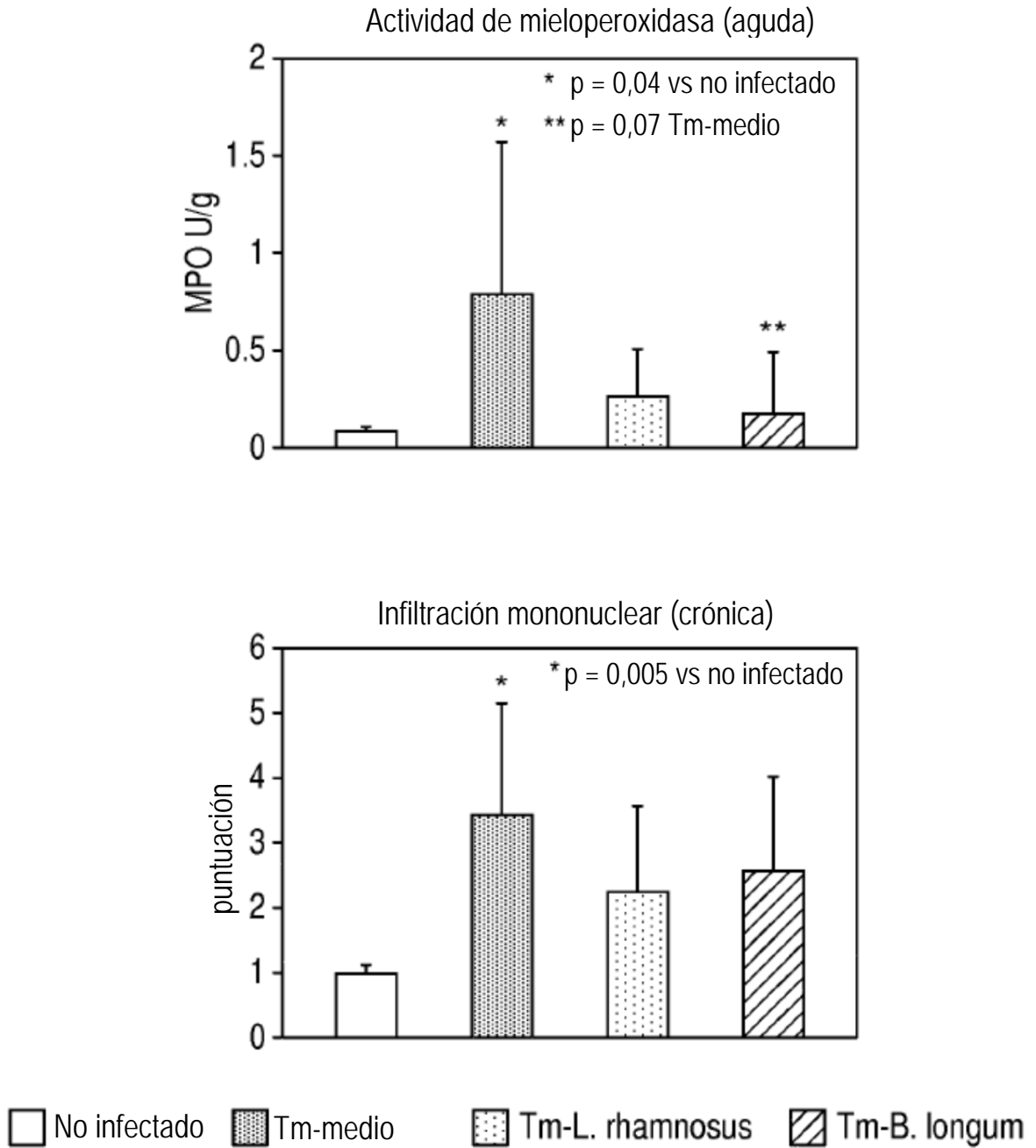


FIG. 4

Comportamiento de tipo ansioso

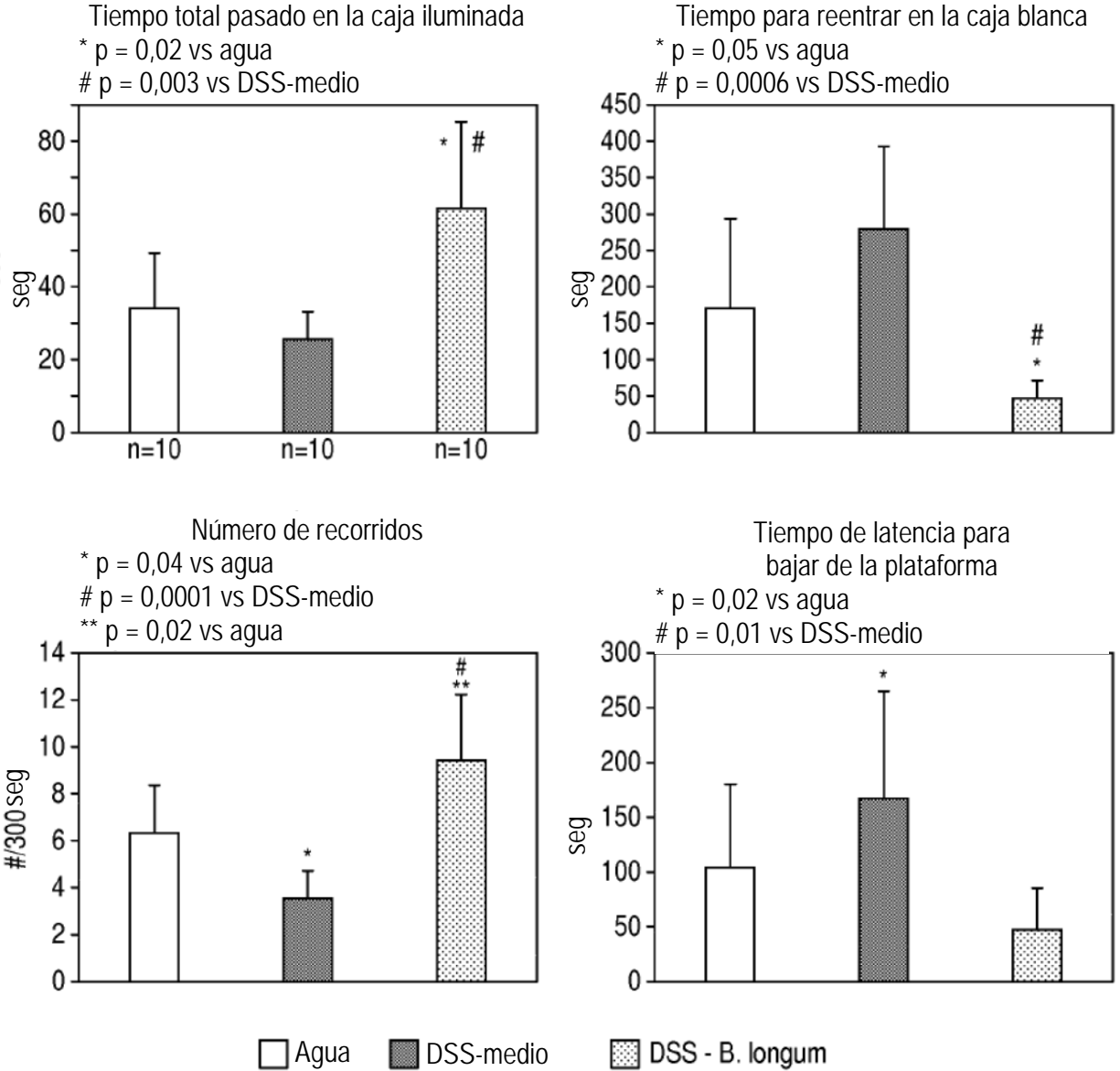


FIG. 5

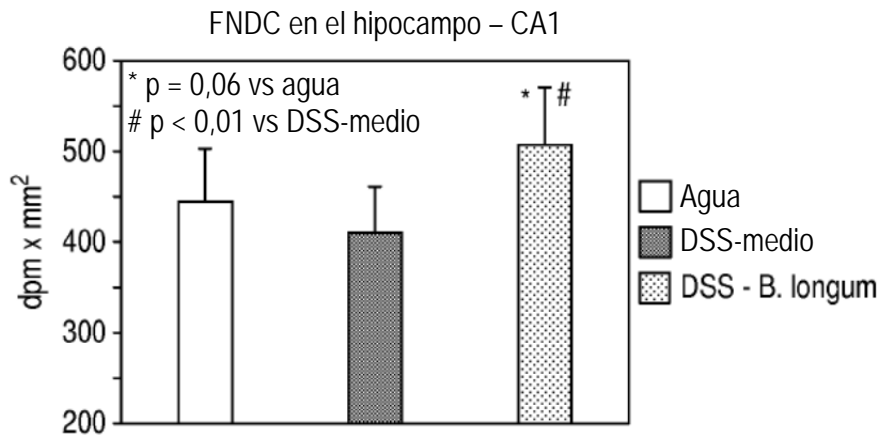


FIG. 6

Inflamación

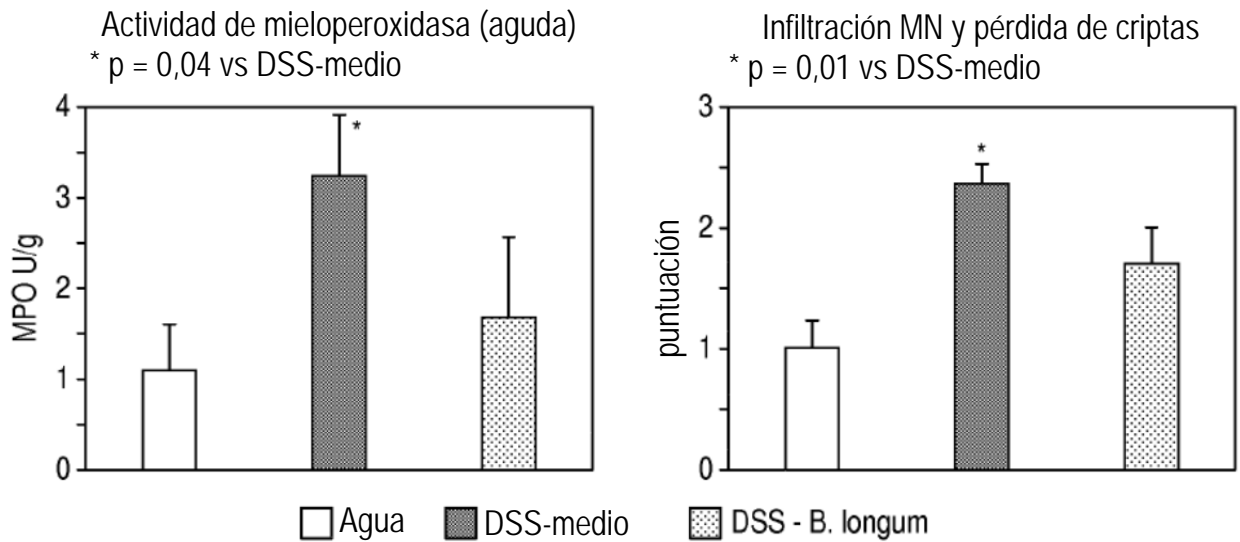


FIG. 7

Comportamiento de tipo ansioso
prueba de descenso de escalón

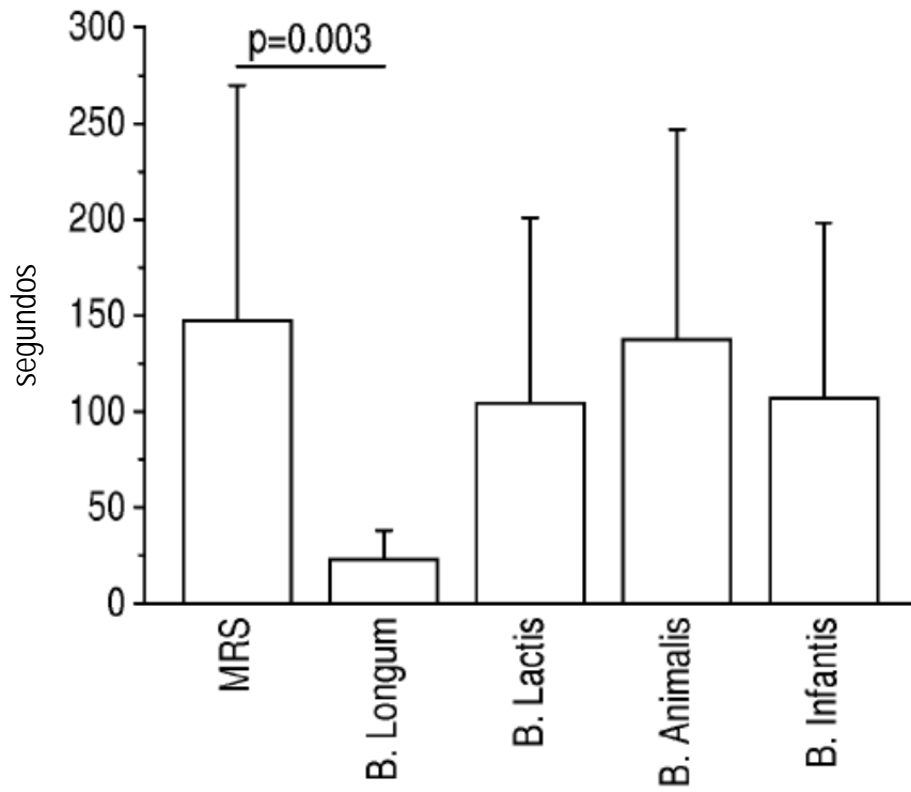


FIG. 8

