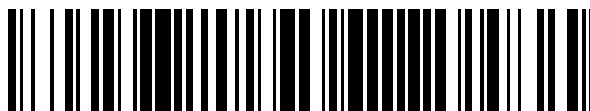


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 567**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2012 PCT/EP2012/064351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2012 E 12738122 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2734845**

54 Título: **Producción y uso de histamina bacteriana**

30 Prioridad:

21.07.2011 US 201161572742 P
19.07.2012 US 201213552686

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.12.2018

73 Titular/es:

BIOGAIA AB (100.0%)
Kungsbrogatan 3A P.O. Box 3242
103 64 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

VERSALOVIC, JAMES;
THOMAS, CARISSA MICHELLE y
CONNOLLY, EAMONN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 694 567 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

Producción y uso de histamina bacteriana

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método de selección de bacterias de ácido láctico probióticas específicas que producen histamina y al uso de tales cepas para suministrar efectos beneficiosos para el huésped.

10 Antecedentes de la invención

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura define los probióticos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". Actualmente, se usan varias bacterias diferentes como probióticos por ejemplo, bacterias productoras de ácido láctico tales como cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*.

Las bacterias productoras de ácido láctico no se usan sólo por su efecto beneficioso sobre la salud humana o animal, sino que también se usan ampliamente en la industria alimentaria para procedimientos de fermentación. La eficacia de los probióticos es específica de la cepa, y cada cepa puede contribuir a la salud del huésped a través de diferentes mecanismos. Los probióticos pueden impedir o inhibir la proliferación de patógenos, suprimir la producción de factores de virulencia por patógenos, o modular la respuesta inmunitaria de modo proinflamatorio o antiinflamatorio. El uso de diferentes cepas de las bacterias productoras de ácido láctico probióticas *Lactobacillus reuteri* es una terapia prometedora para la mejora de cólicos del lactante, alivio de eccema, reducción de episodios de enfermedad laboral, y supresión de infección por *Helicobacter pylori*. *L. reuteri* se considera un organismo endógeno del tracto gastrointestinal humano y está presente, por ejemplo, en la mucosa del cuerpo gástrico, el antro pilórico el duodeno y el íleon. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5,439,678, 5,458,875, 5,534,253, 5,837,238 y 5,849,289.

Cuando se hacen crecer células de *L. reuteri* en condiciones anaerobias en presencia de glicerol, producen la sustancia antimicrobiana conocida como reuterina (β -hidroxi-propionaldehído).

La relación entre un huésped y sus microbios es compleja, y para algunas bacterias, esta relación huésped:microbios ha estado en desarrollo a lo largo de muchos años de evolución conjunta. Esto parece ser especialmente cierto para *Lactobacillus reuteri*. Los presentes conocimientos de la relación mutualista entre microbios intestinales y el huésped humano es en su lactancia, pero ya se tiene perfecta conciencia de que el microbioma intestinal desempeña un papel esencial en el desarrollo del intestino y el sistema inmunitario, la nutrición, y están estableciéndose nuevos vínculos entre el microbioma intestinal y el cerebro. Se ha implicado disbiosis, la perturbación del microbioma intestinal normal, en una amplia gama de procesos patológicos incluyendo aquellos que afectan al entorno local del intestino, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y síndrome del intestino irritable (SII), y procesos patológicos en sitios alejados del intestino, tales como el síndrome metabólico. Se encuentra un potencial terapéutico importante dentro del microbioma intestinal, y la investigación pretende lograr un objetivo futuro de alterar la comunidad microbiana para prevenir y/o tratar distintos procesos patológicos.

Por tanto, existe la necesidad de entender tales interacciones específicas entre el hombre y los microbios relacionadas con una enfermedad específica u otras situaciones que influyen en la salud del huésped de modo que puedan seleccionarse las cepas probióticas más apropiadas y usarse para contrarrestar tales desarrollos.

Sumario de la invención

La invención en el presente documento proporciona un método de selección de una cepa de bacterias de ácido láctico probióticas para su uso en la producción local de histamina en un mamífero, en el que dicho método comprende examinar bacterias para determinar la presencia de un operón de histidina activo y seleccionar una cepa que tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina.

La invención también proporciona un producto que comprende células de una cepa de *Lactobacillus reuteri* que puede obtenerse mediante el método de selección según la invención, en el que dicho *Lactobacillus reuteri* cepa tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, para su uso en la producción local de histamina en un mamífero en el que la señalización de histamina mediante el receptor de H_2 suprime la producción de TNF y provoca de ese modo un efecto antiinflamatorio, y en el que dicho uso es en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios.

También se da a conocer en el presente documento un producto que comprende células de una cepa de bacterias de ácido láctico que puede obtenerse mediante los métodos de selección de la presente invención, en el que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, para su uso en la producción local de histamina en un mamífero, en el que dicho uso es en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios.

Por tanto, se da a conocer en el presente documento un método específico de producción de manera local de histamina en mamíferos, especialmente seres humanos. La producción local de histamina incluye, pero no se limita a, la producción en el tracto GI, aparato genitourinario (GU), cavidad bucal, en los pulmones y las vías respiratorias, en la piel etc., del cuerpo de mamífero seleccionando determinadas cepas de bacterias de ácido láctico. Las bacterias pueden suministrarse junto con determinados aminoácidos y/o azúcares, administrarse por separado o ya estar presentes en el sitio activo.

Un objeto principal de la presente invención es seleccionar cepas probióticas que pueden producir localmente histamina en diversas ubicaciones, incluyendo el tracto GI, aparato GU, la cavidad bucal, en los pulmones y las vías respiratorias, en la piel etc., del cuerpo de mamífero.

También se describen en el presente documento productos que contienen dichas cepas.

También se describe en el presente documento la administración de bacterias con la administración de histidina, o alimentos o composiciones que contienen histidina, para garantizar la generación local de histamina.

Por tanto, la presente invención se refiere a un nuevo método para seleccionar células bacterianas de ácido láctico que son útiles como probióticos y en terapia. Este nuevo método implica el examen y la selección para detectar cepas de bacterias de ácido láctico que tienen un operón de histidina activo y pueden producir histamina. Sorprendentemente, las cepas de bacterias de ácido láctico seleccionadas mediante este método son útiles como probióticos y en terapia, en particular en la producción de efectos antiinflamatorios, por medio de la producción local de histamina. Estos efectos de las bacterias son sorprendentes, tal como se comenta en otra parte del presente documento, previamente se evitaba de forma activa la presencia en productos alimenticios de bacterias productoras de histamina debido al riesgo reconocido para la salud, por ejemplo posibles efectos tóxicos. Por tanto, la administración a un mamífero de unas bacterias de ácido láctico que pueden dar la producción local de histamina, o en efecto, el examen y la selección de bacterias de ácido láctico para detectar tal capacidad de producción local de histamina basándose en la presencia de un operón de histidina activo y la capacidad para producir histamina va en contra de la intuición en esta enseñanza. En efecto, nunca antes se ha notificado que los probióticos produzcan histamina.

Por tanto, en su sentido más amplio, la presente invención proporciona un método de selección de una cepa de bacterias de ácido láctico probióticas para su uso en la producción local de histamina en un mamífero, en el que dicho método comprende examinar bacterias para determinar la presencia de un operón de histidina activo y seleccionar una cepa que tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina.

El operón de histidina comprende tres genes (el cotransportador de histidina/histamina, la histidina descarboxilasa dependiente de piruvato tipo A (*HdcA*) y la histidina descarboxilasa dependiente de piruvato tipo B (*HdcB*)). Se cree que la actividad de cada uno de estos genes es importante para la presente invención. Por tanto, en los métodos de examen de la invención, se evalúan bacterias candidatas para determinar la presencia de los tres genes y se seleccionan las cepas positivas para los tres genes. Puede usarse cualquier método apropiado para la detección de la presencia de los tres genes, por ejemplo métodos genéticos tales como PCR. La producción de buenos niveles de histamina también puede ser un indicador de la presencia de los tres genes y la presencia de un operón de histidina activo. Por tanto, el método de selección de la invención también implica la etapa de selección de una cepa que puede producir histamina. Se prefieren las cepas con alto niveles de producción de histamina. Por tanto, en realizaciones preferidas se selecciona una cepa por su capacidad para producir histamina a un nivel mayor de 200, preferiblemente mayor de 250 o más preferiblemente mayor de 300 pg/ml, por ejemplo un nivel mayor de 350, 400, 450 ó 500 pg/ml. Tales valores se refieren generalmente a valores de histamina medidos en el sobrenadante de cepas en cultivo.

Los métodos apropiados de medición de niveles de producción de histamina los conocerá bien un experto en la técnica. El método de espectrometría de masas, más específicamente espectrometría de masas de triple cuadrupolo, se ejemplifica en el presente documento y se prefiere. Sin embargo, pueden usarse igualmente ELISA o inmunoensayos para evaluar y cuantificar la producción de histamina. Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, el método de selección implicará la etapa de detección de la cantidad o el nivel de histamina producida por una cepa candidata. Debido a los usos posteriores de las cepas que se seleccionan mediante los métodos de la invención, después de seleccionarse o aislarse cepas que producen histamina, otras realizaciones implicarán las etapas adicionales de cultivo o propagación de tales cepas, o posiblemente de almacenamiento de tales cepas para usos futuros.

Será necesario que tales etapas adicionales (y, en efecto, las etapas de selección de los métodos de la invención) generalmente se lleven a cabo en un medio de cultivo apropiado que soporta la producción de histamina. Los medios de cultivo preferidos contendrán una fuente de carbono apropiada que soportará la producción de histamina por dicha cepa. En realizaciones particularmente preferidas, los medios comprenderán glucosa como fuente de carbono y preferiblemente no contendrán sacarosa, o al menos sólo comprenderán sacarosa a un nivel tal que no comprometa significativamente la producción de histamina por la cepa. También puede proporcionarse histidina o un

análogo de histidina, opcionalmente junto con fuentes de otros aminoácidos.

En realizaciones preferidas, dicha cepa es una cepa de *Lactobacillus reuteri*.

- 5 Una vez que se ha seleccionado una cepa apropiada usando el método de la presente invención, entonces puede usarse para la producción local de histamina en un mamífero. Por tanto, dichas cepas también han de poder dar la producción local de histamina en un mamífero.

10 Por tanto, un aspecto adicional de la presente divulgación es un producto que comprende células de una cepa de bacterias de ácido láctico que puede obtenerse mediante el método de selección de la invención, en el que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, para su uso en la producción local de histamina en un mamífero. Tal como se expone en otra parte del presente documento, los usos de la invención son en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios, aunque también se describen en el presente documento usos en el tratamiento y/o la profilaxis de estados o enfermedades que se beneficiarán de la producción local de histamina. Por ejemplo, tal producción local de histamina puede dar como resultado un efecto antiinflamatorio.

20 Realizaciones alternativas de la invención proporcionan una cepa de *Lactobacillus reuteri* que puede producir histamina para su uso en la producción local de histamina en un mamífero, en la que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y en la que dicho uso es en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios y en la que la señalización de histamina mediante el receptor de H_2 suprime la producción de TNF y provoca de ese modo un efecto antiinflamatorio. Se describen características preferidas de esta cepa y sus usos en otra parte del presente documento.

25 También se describen métodos de tratamiento o métodos para la producción local de histamina en un mamífero, comprendiendo dichos métodos la administración de un producto que comprende células de una cepa de bacterias de ácido láctico que puede obtenerse mediante el método de selección de la invención, o la administración de una cepa de bacterias de ácido láctico en el que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, a dicho mamífero en una cantidad eficaz para permitir la producción local de histamina en dicho mamífero. Se describen características preferidas de la cepa y sus usos terapéuticos en otra parte del presente documento.

35 También se describe en el presente documento el uso de un producto que comprende células de una cepa de bacterias de ácido láctico que puede obtenerse mediante el método de selección de la invención, en el que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, en la fabricación de una composición o un medicamento para su uso en la producción local de histamina en un mamífero. También se describe en el presente documento el uso de una cepa de bacterias de ácido láctico, en el que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, en la fabricación de una composición o un medicamento para su uso en la producción local de histamina en un mamífero. Se describen características preferidas de la cepa y sus usos terapéuticos en otra parte del presente documento.

Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1 - Cuantificación de histamina en fracciones de HILIC-HPLC. Se usó espectrometría de masas de triple cuadrupolo para cuantificar la histamina presente en una gama seleccionada de fracciones de HILIC-HPLC. Las fracciones inhibitoras de TNF tenían las mayores cantidades de histamina de todas las fracciones examinadas.

50 Figura 2 - La histamina purificada y la histamina de *L. reuteri* 6475 inhiben la producción de TNF por el receptor de histamina H_2 . A. La histamina purificada inhibió significativamente la producción de TNF, un efecto que se bloquea por antagonistas específicos del receptor de H_2 de manera dependiente de la dosis. Unos medios condicionados (o sobrenadante) que contenían factores secretados de la cepa 6475 (incluyendo histamina) inhibieron significativamente la producción de TNF, un efecto que se bloquea por antagonistas específicos del receptor de H_2 . N=3, *valor de $p < 0,05$ en comparación con control de medios, **valor de $p < 0,05$ en comparación con histamina, ***valor de $p < 0,05$ en comparación con medios condicionados ATCC 6475, (CM) B. El lavado de sedimento celular de la cepa 6475 que contenía histamina suprimió la producción de TNF, un efecto que se bloqueó parcialmente por antagonistas específicos del receptor de H_2 . La fracción B3, que contiene histamina relativamente pura, inhibió la producción de TNF, un efecto que se bloqueó por completo por antagonistas específicos del receptor de H_2 . N=3, *valor de $p < 0,05$ en comparación con control de medios, **valor de $p < 0,05$ en comparación con el lavado de sedimento celular ATCC 6475 (CP), ***valor de $p < 0,05$ en comparación con la fracción B3.

60 Figura 3 - El operón de histidina es importante para el fenotipo inhibidor de TNF de *L. reuteri* 6475. A. El operón de histidina consiste en tres genes, el cotransportador de histidina/histamina, *hdcA* y *hdcB*. B. La mutación en un gen cualquier en el operón de histidina da como resultado una pérdida parcial de la supresión de TNF por *L. reuteri* 6475. N=9, *valor de $p < 0,05$ en comparación con control de medios, **valor de $p < 0,05$ en comparación con ATCC PTA 6475.

Figura 4 - *L. reuteri* 6475 redujo significativamente la pérdida de peso inducida mediante exposición a TNBS, la figura representa los datos de dos experimentos independientes, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 5 - *L. reuteri* 6475 disminuyó significativamente el daño macroscópico en el colon inducido mediante exposición a TNBS, la figura representa los datos de dos experimentos independientes, *p<0,05, ***p<0,001.

Figura 6 - *L. reuteri* 6475 redujo significativamente la concentración de SAA inducida mediante exposición a TNBS, la figura representa los datos de dos experimentos independientes, *p<0,05, ***p<0,001.

Figura 7 - el mutante *hdcA* produjo una capacidad disminuida para atenuar la colitis, la figura representa los datos de dos experimentos independientes, *p<0,05, **p<0,01.

Figura 8 - el mutante *hdcA* produjo una capacidad disminuida para atenuar la colitis, la figura representa los datos de dos experimentos independientes, *p<0,01, **p<0,001.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

Los inventores del presente documento han hallado que un grupo seleccionado de lactobacilos, incluyendo determinadas cepas de *Lactobacillus reuteri* producen localmente histamina en condiciones de crecimiento específicas, y que tal histamina producida beneficiará al huésped, por ejemplo, reduciendo la inflamación.

Histamina

La histamina es un compuesto nitrogenado orgánico implicado en varios procesos asociados con la salud procesos de un mamífero, incluyendo respuestas inmunitarias locales así como regular la función fisiológica en el intestino y actuar como neurotransmisor. Como parte de una respuesta inmunitaria frente a patógenos foráneos, se produce histamina por basófilos y mastocitos. La histamina puede derivar de la descarboxilación del aminoácido histidina, una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa.

Las bacterias pueden producir histamina usando enzimas histidina descarboxilasas no relacionadas con las que se encuentran en eucariotas. Hasta ahora, tal producción de histamina por determinadas cepas bacterianas se ha considerado un riesgo para la salud más que un posible beneficio para los seres humanos. Por ejemplo, la intoxicación por escombroides, una forma de enfermedad no infecciosa de transmisión alimentaria, se debe a la producción de histamina por bacterias en alimentos en mal estado, particularmente pescado. Las bebidas y los alimentos fermentados contienen de manera natural pequeñas cantidades de histamina debido a una conversión similar realizada por bacterias o levaduras de fermentación. El suministro de determinadas cantidades controladas de histamina de bacterias seleccionadas puede proporcionar, sorprendentemente, efectos beneficiosos más que los efectos perjudiciales que podrían esperarse a partir de los estudios mencionados anteriormente.

Los receptores de histamina son una clase de receptores acoplados a proteínas G con histamina como su ligando endógeno. Existen cuatro receptores de histamina conocidos; receptor de H₁ (H1R), receptor de H₂ (H2R), receptor de H₃ (H3R) y receptor de H₄ (H4R).

Vannier *et al.* (Histamine Suppresses Gene Expression and Synthesis of Tumor Necrosis Factor α via Histamine H2 Receptors; J Exp Med. 1 de julio de 1991;174(1):281-4) mostraron que la síntesis inducida por LPS de TNF- α en células mononucleares de sangre periférica se suprimió por histamina y sugieren además que la liberación de histamina desde mastocitos puede limitar la extensión de reacciones inflamatorias e inmunitarias al suprimirse la síntesis local de citocinas en células que portan el receptor de H₂.

Se ha dado a conocer previamente la actividad antiinflamatoria de la histamina por Wang *et al.* (Histamine Antagonizes Tumor Necrosis Factor (TNF) Signaling by Stimulating TNF Receptor Shedding from the Cell Surface and Golgi Storage Pool; J. Biol. Chem. 278(24): 21751-21760), que mostraron que la histamina provoca pérdida transitoria de TNFR1 de superficie, liberación aumentada de TNFR1 y movilización de moléculas de TNFR1 desde el aparato de Golgi en células endoteliales humanas en cultivo. La inyección de histamina en piel humana injertada en ratones inmunodeficientes provocó la liberación de TNFR1 y disminuyó la inducción mediada por TNF de moléculas de adhesión endoteliales.

Vannier *et al.* y Wang *et al.* no mencionaron nada sobre el uso de cepas bacterianas productoras de histamina como probióticos ni sobre cómo seleccionar las cepas basándose en sus capacidades de producción de histamina para asegurar determinados beneficios para la salud del huésped, tales como efectos antiinflamatorios.

Se usa Ceplene, una forma de calidad farmacéutica de diclorhidrato de histamina, para la prevención de recidiva en pacientes a los que se les diagnosticó leucemia mieloide aguda (AML). Ceplene se administra junto con dosis bajas de la citocina de activación inmunitaria interleucina-2 (IL-2) en la fase posterior a la remisión de AML, es decir cuando los pacientes han completado la quimioterapia inicial. Algunos estudios han mostrado que Ceplene/IL-2 puede inducir destrucción mediada por el sistema inmunitario de células leucémicas. El tratamiento, inyecciones

subcutáneas, se administra en ciclos de 3 semanas por los pacientes en el domicilio durante 18 meses. Los efectos secundarios de Ceplene incluyen cefalea y sofocos transitorios. Sería ventajoso que los pacientes recibiesen histamina producida localmente, cuando fuese necesario, en vez de inyecciones subcutáneas; esta estrategia de suministro puede lograrse administrando histamina derivada de bacterias al paciente usando las cepas seleccionadas según esta invención.

Se sabía previamente que las bacterias gram-negativas forman histamina, por ejemplo, en pescado y carne crudos tras una temperatura indebida y que las bacterias gram-positivas provocan el deterioro por histamina de alimentos fermentados tales como quesos, salchichas, miso, salsa de soja, cerveza y vino. Ha resultado difícil la identificación de bacterias productoras de histamina en alimentos.

También se ha asociado previamente *Lactobacillus reuteri* con la producción de histamina, Casas *et al.* (Validation of the Probiotic Concept: Lactobacillus reuteri Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals.; 2000, ISSN 0891-060X) informan de que dos cepas de *L. reuteri* en manos de Straub *et al.* (Z Lebensm Unters Forsch(1995) 201: 79- 82) han mostrado que descarboxilan L-histidina para formar histamina y los autores advierten en contra del uso de tales cepas para la fermentación de alimentos y como probióticos.

Trip *et al.* (HdcB, a novel enzima catalyzing maturation of pyruvoil-dependent histidine decarboxylase; Molecular Microbiology (2011) 79(4), 861-871) que hace referencia a tres tipos de organización genética de loci de descarboxilación de histidina entre bacterias gram-positivas productoras de histamina. El mayor grupo se halla en las bacterias de ácido láctico incluyendo *L. hilgardii* 0006, *L. buchneri* B301, *L. reuteri* F275 y *T. halophilus*. Se ha mostrado que *Lactobacillus hilgardii* 0006 produce histamina, en un estudio realizado por Lucas *et al.* (Histamine-Producing Pathway Encoded on an Unstable Plasmid in Lactobacillus hilgardii 0006; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 2005, vol. 71, n.º 3, págs. 1417-1424), afirman además que la histamina es un contaminante que aparece en varios productos durante el crecimiento de bacterias no deseadas. Lucas *et al.* han realizado un examen de una colección de bacterias de ácido láctico del vino para identificar los genes implicados en la ruta de producción de histamina de una bacteria gram-positiva del vino.

Se ha aislado una cepa productora de histamina de *Lactobacillus buchneri* de queso suizo que se había implicado en un brote de intoxicación histaminica (Summer *et al.* Isolation of histamine-producing Lactobacillus buchneri from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak.; Applied and Environmental Microbiology (1985), vol. 50, número 4, págs. 1094-1096).

Calles-Enríquez *et al.* (Sequencing and Transcriptional Analysis of the Streptococcus thermophiles Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential hdcA Expression; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, sept. 2010, vol. 76, n.º 18, págs. 6231-6238) describen cepas productoras de histamina de *Streptococcus thermophiles*, un cultivo iniciador termófilo usado para la producción de yogur y determinadas variedades de queso. Indican además que la presencia de cepas con la capacidad para descarboxilar histidina podría dar como resultado productos que contienen histamina producidos durante la fabricación o durante el almacenamiento antes del consumo y esto subyace a la importancia de usar sólo cepas negativas para histamina en la fabricación de productos lácteos fermentados.

Aunque se conociera previamente que algunos *Lactobacillus* pueden producir histamina, ciertamente no se sabía que la capacidad para producir histamina es un factor clave para asegurar determinados beneficios para la salud de su huésped, por ejemplo propiedades antiinflamatorias de determinadas cepas de *Lactobacillus*.

Ni se conoce ni resulta obvio a partir de la técnica anterior que esto pueda usarse para el examen y la selección de determinadas cepas probióticas de *Lactobacillus*.

Mastocitos

Un mastocito (también conocido como labrocito o célula cebada) es una célula residente de varios tipos de tejidos y contiene muchos gránulos ricos en histamina y heparina. Aunque son más conocidos por su papel en la alergia y anafilaxia, los mastocitos también desempeñan un importante papel protector, al estar implicados, por ejemplo, de manera íntima en la cicatrización de heridas y la defensa frente a patógenos.

Los mastocitos están presentes en la mayor parte de tejidos que rodean de manera característica los vasos sanguíneos y nervios, y son especialmente prominentes cerca de los límites entre el mundo exterior y el medio interno, tal como la piel, la mucosa de los pulmones y el tracto digestivo, así como en la boca, conjuntiva y nariz.

En reacciones alérgicas, los mastocitos permanecen inactivos hasta que se une un alérgeno a IgE ya en asociación con la célula. Otros eventos de activación de membrana pueden o bien sensibilizar los mastocitos para su posterior desgranulación o bien pueden actuar en sinergia con la transducción de señales de FcεRI. La histamina de tal granulación dilata vénulas poscapilares, activa el endotelio y aumenta la permeabilidad de vasos sanguíneos. La liberación de histamina conduce a edema (hinchazón) local, calor, enrojecimiento y la atracción de otras células inflamatorias al sitio de liberación. También irrita las terminaciones nerviosas (lo que conduce a picor o dolor). Los

signos cutáneos de la liberación de histamina son la reacción de “eritema y ronchas”. El bulto y enrojecimiento inmediatamente tras una picadura de un mosquito son un buen ejemplo de esta reacción, que se produce segundos después de la exposición del mastocito a un alérgeno. Las otras actividades fisiológicas de los mastocitos se entienden mucho menos. Varias series de indicios sugieren que los mastocitos pueden tener un papel bastante fundamental en la inmunidad innata: pueden elaborar un amplia variedad de citocinas importantes y otros mediadores inflamatorios tales como TNF α , expresan múltiples “receptores de reconocimiento de patrones” que se cree que están implicados en el reconocimiento de amplias clases de patógenos, y ratones sin mastocitos parecen ser mucho más susceptibles a una variedad de infecciones.

Considerando la toxicidad de la histamina bacteriana en alimentos y el hecho de que se recomienda evitar cepas productoras de histamina en productos fermentados (véanse ejemplos adicionales en Calles-Enríquez *et al.* Sequencing and Transcriptional Analysis of the *Streptococcus thermophilus* Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential *hdcA* Expression; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, sept. 2010, vol. 76, n.º 18, págs. 6231-6238) no puede considerarse que sea obvio usar determinadas cepas seleccionadas de *Lactobacillus* para la producción local de histamina en el tratamiento y/o la profilaxis de diversas enfermedades.

La relación entre un huésped y sus microbios es compleja, como también lo es para determinados tipos de células propias de un mamífero, tales como los mastocitos. Esta relación huésped:microbios ha estado en desarrollo a lo largo de muchos años de evolución conjunta, esto incluye la producción por los microbios de diversos metabolitos que pueden beneficiar al huésped a nivel nutricional, a nivel inmunológico etc., actúan como antagonistas totales o parciales, agonista, desensibilización etc. de receptores específicos u otros procesos. Por tanto, también existe la necesidad de entender tales interacciones específicas entre el hombre y los microbios relacionadas con una enfermedad específica u otras situaciones que influyen en la salud del huésped de modo que puedan seleccionarse las cepas probióticas más apropiadas y usarse para contrarrestar tales desarrollos.

Los inventores del presente documento han hallado que un grupo seleccionado de lactobacilos, incluyendo determinadas cepas de *Lactobacillus reuteri* produce localmente histamina en condiciones de crecimiento específicas. Y que tal histamina producida localmente, al contrario de la creencia anterior, beneficiará al huésped de múltiples maneras incluyendo la reducción de la inflamación.

También se describen en el presente documento productos que contienen dichas cepas junto con una fuente de carbono específica, para tener un producto simbiótico.

Otros objetos y ventajas resultarán más evidentes a partir de la siguiente divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

La administración de las cepas de bacterias de ácido láctico, seleccionadas en conformidad con el presente método, a un mamífero dará como resultado histamina producida localmente que podría ser beneficiosa por diversos motivos.

Un objeto principal de la presente invención es proporcionar un método de selección de cepas de bacterias de ácido láctico que asegure un buen efecto antiinflamatorio. Podrían usarse estas cepas para el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios, puesto que el operón de histidina y la producción de histamina son esenciales para la capacidad antiinflamatoria de determinadas bacterias de ácido láctico. Preferiblemente, pueden usarse las cepas para el tratamiento y/o la profilaxis de procesos inflamatorios en el tracto GI, aparato GU, la cavidad bucal, en los pulmones y las vías respiratorias, en la piel etc., del cuerpo de mamífero, incluyendo pero sin limitarse a colitis, EII, SII, diverticulosis, gingivitis, vaginitis etc. Se sabía previamente que la histamina mediante el receptor de H₂ puede reducir la expresión génica de TNF-alfa. Además, los mastocitos pueden elaborar una amplia variedad de citocinas importantes y otros mediadores inflamatorios tales como TNF-alfa. Sin embargo, no se sabía previamente que el operón de histidina, y la producción local de histamina de tales cepas seleccionadas podrían ser beneficiosos para el huésped y es, por ejemplo, un factor clave en la capacidad antiinflamatoria de cepas seleccionadas de *L. reuteri*. Tampoco se conocía previamente usar *L. reuteri* seleccionada según el presente método en tratamientos que requieren histamina.

Según la invención, productos y cepas para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios son *Lactobacillus reuteri*, en particular *Lactobacillus reuteri* 6475 (ATCC PTA 6475). En otras realizaciones de la invención, la cepa usada no es *Lactobacillus reuteri* 6475 (ATCC PTA 6475).

Los usos terapéuticos de las cepas, los productos y las composiciones de la invención tal como se definen en el presente documento dan como resultado generalmente la reducción o el alivio de la enfermedad relevante o los síntomas de la enfermedad, por ejemplo pueden dar como resultado una reducción significativa de los niveles de inflamación en el mamífero. Por ejemplo, la histamina producida localmente puede activar receptores de H₂ en células epiteliales intestinales así como células inmunitarias para suprimir la inmunidad mucosa del huésped, por ejemplo mediante la inhibición de citocinas proinflamatorias. Por tanto, la presente invención permite la conversión de un componente dietético (histidina) en histamina en el sitio de actividad y la modulación local de la respuesta inmunitaria del huésped (por ejemplo, en el intestino). Puede observarse que tal producción local de histamina proporcionada por la presente invención puede proporcionar ventajas reales con respecto, por ejemplo, a la

ingestión oral u otras formas de administración de histamina, especialmente dado el hecho de que no se defendería tal ingestión oral debido a los riesgos para la salud y efectos tóxicos reconocidos.

En particular en lo que se refiere a enfermedades inflamatorias del intestino, los usos terapéuticos de las cepas, los productos y las composiciones de la invención pueden dar como resultado una reducción significativa de las úlceras y el daño intestinal (por ejemplo, daño en el colon) medidos, por ejemplo, mediante un método convencional tal como la puntuación de Wallace, una reducción significativa de la pérdida de peso o una reducción significativa de la inflamación del intestino, por ejemplo el colon.

Tal reducción o alivio de la enfermedad o los síntomas de la misma puede medirse mediante cualquier ensayo apropiado. Preferiblemente, la reducción o el alivio de la enfermedad o los síntomas es estadísticamente significativo, preferiblemente con un valor de probabilidad de $<0,05$. Tal reducción o alivio de la enfermedad o los síntomas se determina generalmente en comparación con una población o un individuo de control apropiado, por ejemplo un mamífero sano o un mamífero no tratado o tratado con placebo.

Un modo apropiado de administración y formulación de las cepas, etc., se elige dependiendo del sitio en el que se desea la producción local de histamina. Un modo de administración preferido es por vía oral, sin embargo, para algunos tratamientos será igualmente apropiada la administración tópica o alguna otra forma de administración a la piel, el recto, la vagina o las encías, o será apropiada la inyección intravenosa o intramuscular.

Aunque los ejemplos del presente documento demuestran el uso de cepas de la invención y dosis apropiadas de las mismas para tratar colitis, se apreciará que esto es únicamente un ejemplo de los estados inflamatorios que pueden tratarse según la presente invención y que pueden elegirse dosis apropiadas de las cepas, los productos y las composiciones de la invención tal como se definen en el presente documento dependiendo de la enfermedad que va a tratarse, el modo de administración y la formulación en cuestión.

Pueden usarse mezclas dietéticas que comprenden histidina para garantizar la presencia de histidina y aumentar de ese modo la eficacia de las bacterias. Puede administrarse histidina sola o junto con las bacterias.

Una posibilidad para garantizar el suministro por las bacterias de histidina es ingerir alimentos ricos en histidina, incluyendo pero sin limitarse a proteína de soja, queso, huevo, pollo y cerdo.

El operón de histidina en bacterias ha mostrado mejorar la capacidad de crecimiento en condiciones de bajo pH o limitación de fuente de energía (Calles-Enriquez *et al.*) pero no se ha asociado el operón de histidina con las características antiinflamatorias de determinadas cepas de *L. reuteri*.

También se describe en el presente documento que las cepas seleccionadas según el presente método pueden usarse terapia contra el cáncer. Se ha usado histamina en combinación con IL-2 para el tratamiento de AML. También se describe en el presente documento que las cepas pueden usarse para dar como resultado histamina producida localmente que en combinación con IL-2 podría usarse para el tratamiento de AML.

Otro objeto de la presente invención es usar las cepas seleccionadas para reducir la alergia alimentaria, otras reacciones alérgicas u otras enfermedades autoinmunitarias. Tal como se sabía previamente, los aumentos sistémicos de histamina son una consecuencia de alergia por la granulación de mastocitos. Cuando se administran cepas seleccionadas según esta invención a un receptor, la histamina producida localmente conducirá a un efecto de desensibilización que reducirá la alergia u otras enfermedades autoinmunitarias.

También es un objeto de la presente invención usar las cepas de bacterias de ácido láctico productoras de histamina para reducir el riesgo de diarrea del turista. Los pacientes tratados con bloqueantes de histamina corren un riesgo aumentado de tener diarrea del turista, podría neutralizarse este riesgo aumentando administrando las bacterias de ácido láctico seleccionadas según el presente método.

Aún otro objeto de la presente invención es usar las cepas seleccionadas en el tratamiento de EM. Se ha propuesto que la histamina es una molécula importante para desarrollar nuevos tratamientos para EM y las cepas seleccionadas de conformidad con la presente invención proporcionarán al paciente histamina.

Aún otro objeto de la presente invención es usar bacterias productoras de histamina como tratamiento antiinflamatorio de la piel usando histidina y análogos de histidina disponibles en la piel. Puesto que la histidina es un sustrato para ácido urocánico que produce la piel mediante irradiación UV y el ácido urocánico tiene propiedades antiinflamatorias en la piel.

Otro objeto es usar tales cepas seleccionadas para inhibir la activación de ERK1/2

Otro objeto de la invención es para inhibir TNF alfa

Otro objeto de la invención es para reducir la inflamación, localmente o de manera sistémica

También se describe en el presente documento el uso de las cepas dadas a conocer para potenciar la exocitosis de vesículas sinápticas inhibiendo ERK1/2

- 5 También se describe en el presente documento el uso de las cepas dadas a conocer para fomentar la autorrenovación de células madre embrionarias humanas inhibiendo ERK1/2

También se describe en el presente documento el uso de las cepas dadas a conocer para inducir la expresión de ABCA1 en macrófagos y el flujo de salida de colesterol inhibiendo ERK1/2

- 10 También se describe en el presente documento el uso de las cepas dadas a conocer para reducir la hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca inhibiendo ERK1/2

- 15 También se describe en el presente documento el uso de las cepas dadas a conocer para reducir la proliferación de determinadas cánceres incluyendo leucemia (por ejemplo, AML) o melanoma maligno. Por tanto, también se describe en el presente documento que podrían tratarse tales cánceres usando las cepas, los productos y las composiciones descritos en el presente documento.

- 20 También se describe en el presente documento el uso de cepas seleccionadas para producir histamina en determinadas condiciones como neurotransmisor, por ejemplo, en interacciones del aparato GU con el SNC, y también señalización neural en dolor local. Este papel como neurotransmisor puede ampliarse a efectos sobre la motilidad intestinal (para tratar el estreñimiento o la diarrea) y a la señalización de dolor en el intestino.

- 25 También se describe en el presente documento el uso de cepas seleccionadas para influir en el eje intestino-cerebro ya que las LAB seleccionadas producirán histamina y afectarán a la percepción y señalización de dolor visceral en el sistema nervioso entérico. Por tanto, también se da a conocer en el presente documento el tratamiento y/o la profilaxis de cualquier enfermedad que se beneficie de la producción local de histamina o el tratamiento y/o la profilaxis de cualquier enfermedad que pueda tratarse con la administración local de histamina.

- 30 También se describen en el presente documento productos que contienen dichas cepas, y productos que contienen dichas cepas junto con una fuente de carbono específica, para tener un producto simbiótico, que a través de la estimulación específica de la cepa productora de histamina, potenciará los efectos.

- 35 También se describen en el presente documento productos que comprenden dichas cepas junto con histidina, incluyendo análogos de histidina o composición o productos que contienen histidina. Preferiblemente tal mezcla se administra por vía oral en una cápsula protectora para la liberación del contenido en el tracto GI bajo para garantizar la supervivencia tanto de la histidina como de las bacterias en el sitio de acción.

- 40 Es un objeto adicional de la invención combinar la administración de dichas cepas con una dieta rica en histidina.

- Un aspecto aún adicional de la invención proporciona un producto para los usos terapéuticos definidos en otra parte del presente documento, en el que dicho uso comprende además la administración de al menos un agente terapéutico o nutricional adicional. En tales realizaciones, un agente terapéutico adicional puede ser cualquier agente adicional que es útil en el tratamiento de la enfermedad en cuestión, por ejemplo es un agente antiinflamatorio o un agente inmunoterápico adicional tal como, por ejemplo, una quimiocina o citocina (por ejemplo, IL-2).

- 50 En realizaciones preferidas, dicho agente adicional comprende histidina o un análogo de histidina, una fuente de carbono apropiada que soporta la producción de histamina por la cepa bacteriana, o una combinación de los mismos.

- 55 Dichos agentes adicionales pueden administrarse junto con las cepas de la invención o pueden administrarse por separado. Además, dichos agentes adicionales pueden administrarse al mismo tiempo que las cepas de la invención o en puntos de tiempo diferentes. Los momentos y los regímenes de administración adecuados pueden determinarse fácilmente por el experto dependiendo del agente adicional en cuestión.

También se describe en el presente documento una composición que comprende:

- 60 (i) una cepa de bacterias de ácido láctico que puede obtenerse mediante el método de selección de la invención (o una cepa de bacterias de ácido láctico que puede producir histamina tal como se define por lo demás en el presente documento), en el que dicha cepa de bacterias de ácido láctico tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina; y

- 65 (ii) al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en una fuente de carbono apropiada que soporta la producción de histamina por dicha cepa, una fuente de histidina o análogo de histidina, y una combinación de los mismos.

En los usos de la invención descritos en el presente documento, preferiblemente dicha histidina o dicho análogo de histidina está en forma de un complemento alimenticio o producto alimenticio que contiene histidina o análogo de histidina, o dicha fuente de carbono comprende glucosa. Preferiblemente, dicha fuente de carbono no comprenderá sacarosa, o al menos sólo comprenderá sacarosa a un nivel tal que no comprometerá significativamente la producción de histamina por la cepa. Opcionalmente, también pueden proporcionarse fuentes de otros aminoácidos.

También descritas en el presente documento, las cepas definidas en la parte (i) pueden combinarse con un componente adicional que es útil en el tratamiento de la enfermedad en cuestión, es decir un agente terapéutico adicional, por ejemplo un agente antiinflamatorio o un agente inmunoterápico adicional tal como, por ejemplo, una quimiocina o citocina (por ejemplo, IL-2).

Lactobacillus reuteri es una especie de bacteria de ácido láctico heterofermentativa que habita de manera natural en el intestino de seres humanos y animales. Algunas cepas de *L. reuteri* probióticas específicas suprimen de manera potente la producción de TNF α humano mientras que otras cepas de *L. reuteri* probióticas potencian la producción de TNF α humano.

La invención en el presente documento se hace posible mediante estudios mecanísticos de la cepa de *L. reuteri* probiótica 6475 y otras cepas que han demostrado su efecto sobre células mieloides humanas activadas. Se aislaron metabolitos de *L. reuteri* usando HILIC-HPLC, y se identificó histamina mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. La cuantificación de histamina mediante EM de triple cuadrupolo reveló que la cepa de *L. reuteri* 6475 produce concentraciones relativamente altas de histamina cuando se hace crecer en medios mínimos basados en glucosa. Algunos estudios transcriptómicos previos habían sugerido que dos genes en el operón de histidina de *L. reuteri* pueden desempeñar un papel en la inhibición de TNF por la cepa 6475. La mutagénesis dirigida de estos genes reveló que cada gen en el operón de histidina, el cotransportador de histidina/histamina, *HdcA* y *HdcB*, son importantes para el fenotipo inhibidor de TNF de la cepa 6475. Algunos estudios mecanísticos demostraron que la histamina inhibe TNF mediante señalización a través del receptor de H₂ pero no de H₁. La señalización a través del receptor de H₂ aumenta el AMPc intracelular, lo que activa PKA. La actividad de PKA es necesaria para la supresión de TNF por histamina. La histamina bloquea la activación de la ruta de señalización de MEK-ERK MAPK.

Se conoce mejor la histamina por sus efectos proinflamatorios en la alergia y anafilaxia, pero varios estudios han demostrado las funciones antiinflamatorias de la histamina. Algunos estudios *in vitro* han mostrado que la histamina puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, IL-1, IL-12 y TNF desde macrófagos y monocitos humanos estimulados con LPS y este efecto lo revierten antagonistas del receptor de H₂. Adicionalmente, la histamina puede estimular la producción de la citocina antiinflamatoria, IL-10, mediante el receptor de H₂. La señalización a través del receptor de H₂ da como resultado una expresión disminuida del receptor CD14, un receptor implicado en el reconocimiento de LPS, en la superficie de monocitos humanos. El receptor de TNF también se ve afectado por la histamina. La señalización a través del receptor de H₁ induce liberación tanto de TNFR1 y como de TNFR2. Algunos estudios *in vivo* también han revelado un papel antiinflamatorio para la histamina. El tratamiento con dimaprit, un agonista específico del receptor de H₂, redujo los niveles de TNF en plasma en modelos de ratón de choque endotóxico (exposición a LPS) y hepatitis (exposición a LPS más galactosamina). La histamina fue protectora en un modelo de ratón de lesión hepática inducida por LPS, y se atenuaron estos efectos en un ratón deficiente en receptor de H₂. En el intestino, la histamina puede ayudar a proteger frente a la infección bacteriana. La señalización a través del receptor de H₂ en placas de Peyer ayuda a prevenir la infección por *Yersinia enterocolitica*.

Puede determinarse el efecto de histamina mediante la expresión de receptores de histamina en la célula diana. En células T, el efecto de la histamina depende de qué receptor de histamina se activa.

Mediante la señalización a través del receptor de H₁, la histamina potencia respuestas de tipo T_H1 pero suprime respuestas tanto T_H1 como T_H2 mediante el receptor de H₂. Se realizó un estudio que examinaba la expresión de receptores de histamina en el tracto gastrointestinal humano. Muchos de los tipos de célula examinados expresaron múltiples receptores de histamina. Por ejemplo, las células inmunitarias, incluyendo macrófagos, expresaron altamente los receptores de H₁ y de H₂ y demostraron baja expresión del receptor de H₄. El aumento de los mastocitos y la histamina se han implicado en la hipersensibilidad visceral asociada con SII. El aumento del número y la actividad de los mastocitos cerca de la invasión mucosa colónica pueden dar como resultado una percepción intensificada de dolor abdominal. Un estudio con ketotifeno, un agente de estabilización de mastocitos, demostró un umbral de dolor aumentado en pacientes con SII, síntomas de SII disminuidos, pero sin cambio en el número o la actividad (determinados por la liberación de histamina y triptasa) de los mastocitos en tejido de biopsia rectal. Los efectos de ketotifeno en la mejora de SII pueden no ser el resultado de estabilizar los mastocitos, sino que podrían atribuirse a su otro papel como antagonista del receptor de H₁. Si se asocia la activación del receptor de H₁ con una respuesta proinflamatoria, el bloqueo de su actividad con ketotifeno puede permitir que la histamina producida o bien por los mastocitos o bien por la microbiota del intestino, tal como *L. reuteri*, realice la señalización únicamente a través del receptor de H₂. Tal como se ha demostrado en el presente documento, la señalización mediante el receptor de H₂ puede suprimir la producción de TNF y provocar un efecto antiinflamatorio. Este mecanismo de ketotifeno puede usarse para nuevas terapias que combinan antagonistas del receptor de H₁ con el efecto probiótico

general de una cepa de *L. reuteri*.

El cambio adicional de la fuente de carbono de los medios de crecimiento de glucosa a sacarosa es suficiente para suprimir el fenotipo inhibidor de TNF de una cepa seleccionada, por ejemplo la cepa de *L. reuteri* 6475. Además, se observó una regulación por disminución significativa de los tres genes en el operón de histidina con las condiciones de crecimiento con sacarosa.

La identificación de histamina como compuesto antiinflamatorio producido por cepas de *Lactobacillus* probióticas seleccionadas ayudará a determinar aplicaciones terapéuticas para tales cepas. Algunos estudios mecanísticos vincularon la activación del receptor de H₂ en células THP-1 con histamina y la supresión de la activación de ERK. La activación de ERK está implicada en muchas funciones celulares además de la producción de TNF. La activación de ERK está implicada en proliferación, tumorigénesis, diferenciación y supervivencia celular. Los resultados sugieren un papel de cepas seleccionadas tales como *L. reuteri* 6475 en la protección frente al cáncer al suprimir la inflamación, proliferación celular y apoptosis mediante la inhibición de la activación de ERK. Además, la histamina es un neurotransmisor conocido. La producción de histamina por cepas seleccionadas puede influir en la señalización en el sistema nervioso entérico, lo que tiene un impacto sobre la percepción del dolor y la motilidad intestinal. Para garantizar la producción de histamina en el sitio de acción, puede ser ventajoso proporcionar a las bacterias histidina. La histidina puede administrarse junto con las bacterias o sola, las dietas ricas en histidina también pueden aumentar la producción de histamina.

La presente invención proporciona determinadas cepas de *Lactobacillus reuteri* para su uso en la producción local de histamina, en el que dicho uso es en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios en los que la señalización de histamina mediante el receptor de H₂ suprime la producción de TNF y provoca de ese modo un efecto antiinflamatorio y un método de selección de tales cepas. También se dan a conocer en el presente documento determinadas cepas de bacterias de ácido láctico para su uso en la producción local de histamina, en las que dicho uso es en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios y un método de selección de tales cepas. Las bacterias se seleccionan usando un examen para el operón de histidina, sorprendentemente se ha mostrado que es esencial la presencia de un operón de histidina activo para diversos efectos beneficiosos tales como las propiedades inmunomoduladoras de cepas de bacterias de ácido láctico.

Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán obvios al lector y se pretende que estos objetos y ventajas estén dentro del alcance de la presente invención.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplos

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio

Cepas bacterianas	Descripción	Fuente
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475	Aislado de leche materna de una finlandesa	BioGaia AB (Raleigh, NC)
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::JP577	mutante de inserción	Este estudio
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::1229	mutante de inserción	Este estudio
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::1230	mutante de inserción	Este estudio
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::1231	mutante de inserción	Este estudio

Tabla 2. Análisis transcriptómico del operón de histidina en los mutantes de la cepa de *L. reuteri* 6475

Comparación	Gen <i>HdcB</i>		Histidina dependiente de descarboxilasa, piruvato tipo A (<i>HdcA</i>)		Cotransportador de histidina/histamina	
	Veces de cambio	Valor de p	Veces de cambio	Valor de p	Veces de cambio	Valor de p
CFAS*(23)/6475	-2,3	<0,05	-1,1	0,68	-1,2	0,36
THFS1*/6475	-1,33	0,60	-3,28	<0,05	-3,45	<0,001
Sacarosa [§] /glucosa	-11,8	<0,01	-30,1	<0,001	-5,5	<0,001
THFS2/6475	-	-	1,2	0,7	0,8	0,2
PocR/6475	-	-	2,4	0,10	1,3	0,66

*Mutantes de inserción que pierden la capacidad para inhibir la producción de TNF en comparación con la cepa de tipo natural 6475. CFAS: ciclopropano ácido graso sintasa, THFS1: tetrahidrofolato sintasa 1, THFS2: tetrahidrofolato sintasa 2.

[§] 6475 de tipo natural hecha crecer en LDIIIIS en comparación con 6475 de tipo natural hecha crecer en LDIIIIG. 6475 de tipo natural hecha crecer en LDIIIIS pierde la capacidad para inhibir la producción de TNF.

EJEMPLO 1: Producción de histamina por de lactobacilos seleccionados

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se describen todas las cepas bacterianas usadas en este estudio en la tabla 1. *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 es un aislado de leche materna de mujer finlandesa (disponible de ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Las cepas de *L. reuteri* ATCC PTA 6475, ATCC 6475 JP577, ATCC 6475 1229, ATCC 6475 1230 y ATCC 6475 1231 se denominarán cepas 6475, JP577, 1229, 1230 y 1231, respectivamente, en la totalidad de la presente divulgación. Se cultivaron las cepas de *L. reuteri* en condiciones anaerobias durante 16-18 h en medios de Man, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ), y se inocularon en 2 l de un medio semidefinido, LDMIII (DO₆₀₀ ajustada a 0,1), que se ha descrito previamente. La fuente de carbono fue o bien glucosa, LDMIII o bien sacarosa, LDMIIIS. Se hizo crecer el cultivo durante 24 h a 37°C en una estación de trabajo anaerobia (MACS MG-500, Microbiology International, Frederick, MD) a la que se le suministró una mezcla del 10% de CO₂, el 10% de H₂ y el 80% de N₂. Se tomaron muestras en diferentes momentos para seguir el crecimiento midiendo la DO₆₀₀. En la fase estacionaria (24 h), se sedimentaron las células desde el cultivo de 2 l (4000 x g, 10 min). Se almacenaron los sedimentos celulares y los sobrenadantes libres de células bacterianas a -20°C antes del procesamiento adicional para la separación mediante HPLC y las pruebas en un bioensayo de inhibición de TNF.

Línea celular y reactivos

Se realizaron experimentos *in vitro* con células THP-1 (línea celular monocitoide humana, ATCC, Manassas, VA) mantenida en RPMI (ATCC) y suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C, el 5% de CO₂. Se recibieron anticuerpos MEK1/2, fosfo-MEK1/2, ERK1/2 y fosfo-ERK1/2 y el inhibidor de MEK, U0126, de Cell Signaling Technology (Danvers, MA), y se recibió el anticuerpo de β -actina de Abcam (Cambridge, MA). Se recibieron todos los demás reactivos de Sigma (St. Louis, MO) a menos que se establezca de otro modo.

Separación mediante HILIC-HPLC de factores asociados a pared celular

Se lavaron sedimentos celulares (7 g) de la cepa 6475 hecha crecer o bien en LDMIII o bien en LDMIIIS, con 30 ml de acetonitrilo al 50%/ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% enfriado con hielo. Se centrifugó la suspensión celular durante 10 min, 4000 x g a 4°C. Se filtraron los sobrenadantes a través de filtros de membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (tamaño de poro de 0,45 μ m, Millipore, Bedford, MA), se liofilizaron y se resuspendieron en 10 ml de ácido fórmico al 0,1%. Se fraccionó por tamaño la muestra resuspendida, con unidades de filtro para centrífuga Amicon Ultra-15 usando la membrana Ultracel-3 (Millipore, Bedford, MA). Se concentró por secado el filtrado (9 ml) hasta 1 ml con un vacío de velocidad, y se usaron 0,75 ml para HILIC-HPLC. Se disolvió la muestra con acetonitrilo al 100% antes de hacerse correr por una columna PolyLC Hydroxyethyl con un gradiente de acetonitrilo al 100-0%, ácido fórmico al 0,1%. Se hizo correr la muestra durante 25 min y se recogieron 25 fracciones (A1-C1) a 10 ml/min/tubo. Se liofilizaron tres mililitros de cada fracción, se resuspendieron en 3 ml de ácido acético al 0,1%, y se liofilizaron de nuevo para pruebas en un ensayo de inhibición de TNF.

Bioensayo de inhibición de TNF y ELISA para TNF

Se esterilizaron por filtración sobrenadantes bacterianos (10 ml) de un cultivo de LDMIII de 24 h usando filtros de membrana de PVDF (tamaño de poro de 0,22 μ m, Millipore) y se fraccionaron por tamaño tal como se describió anteriormente. Se secó a vacío de velocidad un mililitro del filtrado <3 kDa y se resuspendió en medios RPMI. Estas muestras de sobrenadante procesadas se denominan medios condicionados. Se normalizaron todos los sobrenadantes en volumen hasta una DO₆₀₀ = 1,0. Se resuspendieron las fracciones liofilizadas de la separación mediante HILIC-HPLC en 400 μ l de bicarbonato de amonio 10 mg/ml, se secaron a vacío de velocidad, y se resuspendieron en 400 μ l de medios RPMI. Se sometieron a prueba los medios condicionados y las fracciones de lavado de sedimento celular para determinar su capacidad para modular la producción de TNF en células monocitoides. En resumen, se estimularon células THP-1 (aproximadamente 5x10⁴ células) para producir TNF mediante la adición de Pam3Cys-SKKKK x 3 HCl 100 ng/ml (EMC Microcollections, Tubinga, Alemania) tal como se describió previamente. Se añadieron inhibidores: los antagonistas del receptor de H₂, ranitidina y cimetidina (10⁻⁴ - 10⁻⁶ M), el antagonista del receptor de H₁, indometacina (10⁻⁵ - 10⁻⁶ M), el inhibidor de MEK, U0126 (10 μ M), y el inhibidor de PKA, H89 (diclorhidrato de N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinsulfonamida) (10⁻⁵ M), a las células THP-1 seguido por medios condicionados de *L. reuteri* o las fracciones de lavado de sedimento celular (al 5% v/v), histamina (10⁻⁵ M), o dibutilil-AMPc (10⁻³ - 10⁻⁷ M). Se incubaron las placas a 37°C y el 5% de CO₂ durante 3,5 h. Se sedimentaron las células THP-1 (3000 x g, 5 min, 4°C), y se usaron ELISA cuantitativos para determinar las cantidades de TNF en sobrenadantes de células THP-1 según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Mineápolis, MN).

Se aislaron compuesto(s) inhibidor(es) de TNF de L. reuteri 6475 usando cromatografía de líquido de interacción hidrófoba - cromatografía de líquido de alta resolución (HILIC-HPLC)

Se lavaron sedimentos de células bacterianas para retirar compuestos asociados de manera suelta con la superficie celular. Se separaron los componentes del lavado de sedimento celular basándose en su hidrofobicidad usando HILIC-HPLC, y se sometieron a prueba las 25 fracciones resultantes para determinar la retención del compuesto inhibidor de TNF. *L. reuteri* 6475 hecha crecer en un medio mínimo con glucosa como la única fuente de carbono produce factores inhibidores de TNF que quedaron retenidos en 3 fracciones independientes de HILIC-HPLC (B3, B5 y B6, datos no mostrados). *L. reuteri* 6475 hecha crecer con sacarosa como la única fuente de carbono pierde el fenotipo inhibidor de TNF y sirvió como control negativo. Ninguna de las fracciones de HILIC-HPLC lavado de sedimento celular con sacarosa de 6475 demostró una inhibición significativa de TNF (datos no mostrados).

Se identificó histamina en una fracción de HILIC-HPLC inhibidora de TNF mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas

Se analizó la fracción de HILIC-HPLC inhibidora de TNF, B3, mediante ^1H -RMN y se comparó con la fracción no inhibidora de TNF vecina, B4. Se observó una serie única de picos con un desplazamiento químico de entre 7,0-7,5 ppm, que es característica de un compuesto aromático, en la fracción B3 pero no en la fracción B4 (datos no mostrados). Se analizó adicionalmente esta agrupación de compuesto aromático con RMN bidimensional (2D) de coherencia heteronuclear cuántica simple (HSQC) para identificar sus componentes. Los compuestos aromáticos consistían en triptófano, fenilalanina, histamina, y un compuesto que no pudo identificarse. El triptófano y la fenilalanina son componentes de los medios de crecimiento bacteriano mientras que la histamina no lo es. Estos resultados se confirmaron usando un método de RMN 2D adicional, espectroscopía de correlación total (TOCSY). La histamina es una amina biogénica que se produce a partir de histidina por la histidina descarboxilasa por algunas bacterias fermentativas incluyendo lactobacilos. También se identificó histamina en la fracción B3 usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo por electropulverización (ESI TOF EM). La histamina no se modifica covalentemente basándose en su patrón de fragmentación en el análisis mediante EM/EM. El análisis de la fracción B3 correspondiente de *L. reuteri* 6475 hecha crecer en un medio de sacarosa con ESI TOF EM no reveló histamina. *L. reuteri* 6475 hecha crecer en un medio de glucosa produce histamina, que está presente en una fracción de HILIC-HPLC inhibidora de TNF.

Se cuantificó la histamina en fracciones de HILIC-HPLC seleccionadas usando espectrometría de masas de triple cuadrupolo

La espectrometría de masas de triple cuadrupolo es un método altamente sensible, establecido de cuantificación de compuestos moleculares pequeños. Se cuantificó la histamina en una gama seleccionada de fracciones de HILIC-HPLC de *L. reuteri* 6475 con glucosa (B2-B7) y sacarosa (B2-B9) así como el sobrenadante de cultivo bacteriano. Se correlacionaron altos niveles de histamina (>300 ng/ml) con la capacidad de las fracciones de HILIC-HPLC para inhibir TNF (figura 1). Se midieron bajos niveles de histamina en la mayor parte de las fracciones examinadas, incluyendo las de 6475 con sacarosa (figura 1). La capacidad de histamina para inhibir la producción de TNF parece depender de la concentración.

La histamina sintética y la histamina producida por L. reuteri 6475 inhiben la producción de TNF por el receptor de H_2

La histamina puede inhibir significativamente la producción de TNF desde células monocitoides humanas activadas por TLR2 (THP-1) (figura 4A). La histamina puede señalizar a través de cuatro receptores de histamina diferentes, sin embargo, las células monocitoides expresan altos niveles de los receptores de H_1 y de H_2 solamente. Algunos estudios previos han mostrado efectos de histamina sobre la producción de TNF por el receptor de H_2 . Se usaron antagonistas específicos de los receptores de H_1 y de H_2 para determinar qué receptor estaba mediando el efecto de histamina sobre células THP-1. Los antagonistas específicos del receptor de H_2 , ranitidina y cimetidina, pudieron bloquear la inhibición de TNF por histamina de manera dependiente de la concentración (figura 2A). El análisis mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos del receptor de H_2 reveló que las células THP-1 expresan altamente el receptor de H_2 (datos no mostrados). Un antagonista específica del receptor de H_1 , indometacina, no tuvo efecto sobre la inhibición de TNF por histamina (figura 2A). La histamina bloquea la producción de TNF desde células THP-1 activadas por TLR2 mediante señalización a través del receptor de H_2 . Los medios condicionados de *L. reuteri* 6475 que contienen histamina inhiben significativamente TNF en comparación con el control de medios, y este efecto se bloquea parcialmente por antagonistas del receptor de H_2 pero no del receptor de H_1 (figura 2A). Un bloqueo parcial de la supresión de TNF indica que la histamina presente en medios condicionados de 6475 se señala por el receptor de H_2 pero que también pueden estar presentes en los medios condicionados otros factores inhibidores de TNF que actúan a través de mecanismos alternativos. El lavado de sedimento celular que contiene histamina de la cepa 6475 también suprime la producción de TNF (figura 2B). Tal como se observa con medios condicionados de 6475, los antagonistas del receptor de H_2 bloquean parcialmente el efecto del lavado de sedimento celular de 6475 (figura 2B), lo que sugiere que están presentes múltiples inmunomodulinas en el lavado de sedimento celular sin fraccionar. Los efectos de la fracción inhibidora de TNF, B3, que contiene grandes cantidades de la histamina purificada, se bloquearon por completo mediante la adición de antagonistas del receptor de H_2 (figura 2B).

EJEMPLO 2

Selección de cepas productoras de histamina

Identificación/selección de bacterias productoras de histamina

5 Se cultivaron las cepas que iban a someterse a prueba y posiblemente seleccionarse, en condiciones anaerobias durante 16-18 h en medios de Man, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ), y se inocularon en 2 l de un medio semidefinido, LDMIII (DO₆₀₀ ajustada a 0,1). La fuente de carbono era glucosa, LDMIIIG. Se hizo crecer cada cultivo durante 24 h a 37°C en una estación de trabajo anaerobia (MACS MG-500, Microbiology International, Frederick, MD) a la que se le suministró una mezcla del 10% de CO₂, el 10% de H₂ y el 80% de N₂. Se tomaron muestras en diferentes momentos para seguir el crecimiento midiendo la DO₆₀₀. En la fase estacionaria (24 h), se tomaron muestras de las células para análisis usando PCR en tiempo real para someter a prueba y determinar la presencia de los tres genes, el cotransportador de histidina/histamina, *HdcA* y *HdcB*.

15 Para cepas positivas para los tres genes, se determinan los niveles de histamina producida mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Se seleccionan las cepas con la mayor producción de histamina (>250 pg/ml). La producción de histamina también puede evaluarse y cuantificarse mediante ELISA o inmunoensayos.

EJEMPLO 3

20 Demostración de inmunomodulación

El operón de histidina contribuye al fenotipo inhibidor de TNF de L. reuteri 6475

25 Tres genes que parecen formar parte de un operón están implicados en la producción de histamina por *L. reuteri* 6475. Estos genes son el cotransportador de histidina/histamina, la histidina descarboxilasa dependiente de piruvato tipo A (*HdcA*) y *HdcB* (figura 3A). Algunos estudios transcriptómicos previos sugirieron que el gen de cotransportador de histidina/histamina y *HdcA* eran potencialmente importantes para el fenotipo inhibidor de TNF de la cepa 6475. Los 3 genes están fuertemente regulados por disminución en 6475 hecha crecer en un medio con sacarosa (pierde la inhibición de TNF) en comparación con 6475 hecha crecer en un medio con glucosa (tabla 2). Además, al menos 1 gen en el operón está regulado por disminución en 2 mutantes que pierden la inhibición de TNF (tabla 2). Se investigaron estos mutantes previamente, y aunque los productos génicos no tenían propiedades inhibidoras de TNF, los genes parecían ser importantes para el fenotipo antiinflamatorio de 6475. En cambio, 2 mutantes que no pierden la inhibición de TNF demostraron no tener regulación por disminución de ninguno de los genes en el operón de histidina (tabla 2). Se realizaron mutaciones en cada uno de estos 3 genes insertando un codón de terminación prematuro en la secuencia génica (cepas 1229, 1230 y 1231). También se realizó una mutación en un gen no relacionado, el gen de resistencia a rifampicina, para que sirviese como control negativo (cepa JP577). Una mutación en sólo uno de los genes en el operón de histidina fue suficiente para provocar una pérdida parcial de la inhibición de TNF en comparación con la cepa de tipo natural (figura 3B), lo que sugiere que cada uno de estos genes es importante para el fenotipo inhibidor de TNF de *L. reuteri* 6475. Una pérdida parcial de actividad sugiere que todavía están produciéndose otras inmunomodulinas activas por *L. reuteri* 6475.

La activación de ERK1/2 es esencial para la producción de TNF por células monocitoides estimuladas con TLR2

45 ERK1/2 se activa mediante fosforilación de la MAPKK anterior, MEK1/2, y se ha mostrado previamente que es importante para la producción de TNF. Se trataron células THP-1 con un inhibidor específico de MEK1/2, U0126, durante intervalos de tiempo variables antes de la estimulación con un agonista de TLR2 para suprimir la activación de ERK1/2. El tratamiento con U0126 durante 30 min fue suficiente para impedir la producción de TNF (datos no mostrados). ERK1/2 se activa tras estimulación con TLR2 y es importante para estimular la producción de TNF en este sistema modelo.

La estimulación del receptor de H₂ da como resultado AMPc aumentado dentro de las células

55 El receptor de H₂ es un receptor unido a proteínas G que puede activar adenilato ciclasa y aumentar el AMPc intracelular. TNF puede activarse a nivel de transcripción por AMPc y análogos de AMPc. Se estimularon células THP-1 con un agonista de TLR2 en presencia de control de medios, sobrenadante de 6475 o histamina con o sin un antagonista del receptor de H₂ y se midieron los niveles intracelulares de AMPc. El sobrenadante de *L. reuteri* 6475 provocó un aumento pequeño pero significativo de AMPc (datos no mostrados). El tratamiento con un antagonista de H₂ bloqueó este efecto. También se observó un aumento de AMPc con tratamiento con histamina, y se bloqueó el efecto por un antagonista de H₂ (datos no mostrados). Se añadió un análogo sintético de AMPc, dibutilil-AMPc (dAMPc), a células THP-1 estimuladas con TLR2 y se monitorizó el efecto sobre la producción de TNF. La adición de dAMPc (10⁻⁵ - 10⁻³ M) fue suficiente para inhibir la producción de TNF (datos no mostrados). La estimulación del receptor de histamina de H₂ da como resultado AMPc aumentado, que puede bloquear la producción posterior de TNF en células monocitoides activadas.

65 *La actividad de proteína cinasa A (PKA) es importante para la inhibición de TNF por L. reuteri 6475, histamina y dAMPc*

El aumento de la concentración de AMPc puede activar PKA e inhibir posteriormente la ruta de señalización de ERK MAPK posterior. Para determinar si la actividad PKA era importante para la supresión de TNF por la histamina producida por la cepa 6475, se trataron células THP-1 activadas, con un inhibidor específico de PKA, H89, en presencia de sobrenadante de 6475, la fracción B3, histamina o concentraciones variables de dAMPc. La adición de H89 bloqueó parcialmente la inhibición de TNF por todos estos compuestos normalmente inhibidores de TNF (datos no mostrados). La actividad PKA es importante para la supresión de TNF por histamina y dAMPc.

La señalización a través del receptor de H₂ bloquea la activación de MEK1/2 y ERK1/2

Algunos estudios previos han demostrado que PKA puede inhibir la activación por Ras/Raf de MEK y posteriormente la señalización de ERK MAPK. El tratamiento de células THP-1 activadas, con sobrenadante de 6475, histamina o U0126 bloquea la fosforilación tanto de MEK1/2 como de ERK1/2 posterior en comparación con el control de medios (datos no mostrados). El tratamiento con un antagonista del receptor de H₂ restaura la activación tanto de MEK1/2 como de ERK1/2 (datos no mostrados). No hubo diferencia en los niveles de proteína de MEK1/2 y ERK1/2 con ninguna de las opciones de tratamiento. La histamina procedente de la cepa 6475 inhibe la activación de MEK y ERK posterior para dar como resultado la producción disminuida de TNF desde células mieloides estimuladas con TLR2.

Por tanto, estos experimentos muestran que la estimulación del receptor de H₂ da como resultado el aumento de AMPc, la activación de proteína cinasa A (PKA) y la inhibición de la ruta de señalización de MEK-ERK MAPK. Tal como se describió anteriormente, se realizaron estudios mecanísticos para determinar el efecto de histamina sobre rutas de señalización de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). La inhibición de la ruta de señalización de MEK-ERK con un inhibidor específico de MEK es suficiente para bloquear la producción de TNF. El tratamiento de células THP-1 activadas, con sobrenadante de la cepa 6475 o histamina aumentó el AMPc intracelular. Se bloqueó el aumento de AMPc por ranitidina, un antagonista específico del receptor de H₂. El tratamiento de células THP-1 estimuladas con TLR2, con un análogo sintético de AMPc, dAMPc, es suficiente para inhibir la producción de TNF. La inhibición de la actividad PKA bloquea parcialmente la supresión de TNF por medios condicionados de 6475 de compuestos inhibidores de TNF previamente, la fracción B3, histamina y dAMPc. El tratamiento de células THP-1 activadas, con medios condicionados de 6475, histamina o U0126 suprimió la activación de MEK1/2, un efecto que se bloqueó en presencia de ranitidina. El tratamiento de células THP-1 activadas, con medios condicionados de 6475, histamina o U0126 suprimió la activación de ERK1/2, un efecto que se bloqueó en presencia de ranitidina.

EJEMPLO 4

Detección de MEK1/2 y ERK1/2 mediante inmunotransferencia de tipo Western

Se lisaron células THP-1 en tampón de lisis enfriado con hielo que consistía en Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Nonidet P40 al 1% v/v, NaN₃ al 0,2% v/v, e inhibidores de proteasa y fosfatasa. Se incubaron los lisados en hielo durante 30 min, se agitaron en vórtex durante 10 min, y se aclararon mediante centrifugación a 13.000 x g durante 10 min a 4°C. Se midieron las concentraciones de proteína usando el kit de ensayo de proteína Quant-iT™ (Invitrogen) y un fluorímetro Qubit según las instrucciones del fabricante. Se cargaron cantidades iguales de proteínas sobre geles de electroforesis.

Se realizó un análisis de la activación de ERK1/2 usando anticuerpos específicos de fosfo-ERK1/2. Se cargaron extractos celulares sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (Bio-Rad, Hercules, CA). Se bloquearon las membranas durante la noche a 4°C en tampón de bloqueo (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE). Después de varios lavados, se trataron con sonda las membranas con anticuerpos específicos de β-actina, ERK1/2 o fosfo-ERK1/2 diluidos en tampón de bloqueo (Li-Cor) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de los lavados, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa del rábano apropiado durante 1 h a temperatura ambiente, y luego se revelaron las transferencias usando una detección quimioluminiscente. Se realizó un análisis de la activación de MEK1/2 tal como se describió anteriormente excepto porque la incubación con anticuerpo primario fue durante la noche a 4°C.

EJEMPLO 5

El mutante de hdcA produjo una capacidad disminuida para atenuar la colitis

Cepas bacterianas y cultivo

Se generaron mutantes usando recombinación oligonucleotídica mediada por RecT. Se usó *L. reuteri* que expresa RecT (cepa RPRB0000) para construir mutaciones en *rpoB* (etiqueta de locus HMPREF0536_0828 (ZP_03961568)) y los genes diana ubicados en la agrupación génica de histidina descarboxilasa HMPREF0536_1229 (ZP_03961969), HMPREF0536_1230 (ZP_03961970) y HMPREF0536_1231 (ZP_03961971) para producir las cepas RPRB3002, RPRB3004, RPRB3005 y RPRB3006, respectivamente. Se verificaron las mutaciones mediante PCR, y se confirmó la integridad mediante análisis de secuencia.

Se cultivaron el mutante del gen de histidina descarboxilasa (*hdcA*) y *L. reuteri* ATCC PTA 6475 en medios de Man, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ) a 37°C en una estación de trabajo anaerobia (MACS MG-500, Microbiology International, Frederick, MD) a la que se le suministró una mezcla del 10% de CO₂, el 10% de H₂ y el 80% de N₂.

Preparación de células de *L. reuteri* y administración a ratones

Se inoculó una colonia individual de cada una de las cepas de *L. reuteri* en 10 ml de medio MRS y se hizo crecer a 37°C en condiciones anaerobias durante 18-20 horas. Se inocularon las bacterias ajustadas a DO₆₀₀=0,03 en 40ml de MRS para iniciar la fermentación y se hicieron crecer a 37°C en condiciones anaerobias durante 5,5 h (DO₆₀₀≈2,5, las bacterias estaban en la fase exponencial en este punto de tiempo). Se sedimentaron suavemente las células (2500 x g, TA, 4 minutos) y se resuspendieron en MRS a una concentración de 25 x 10⁹ UFC/ml. Como control de medios, se usó medio MRS estéril. Cada ratón BALB/c hembra de 8 semanas de edad recibió una dosis de MRS o mutante de *hdcA* o *L. reuteri* 6475 de tipo natural recién preparado (0,2 ml cada vez) cada día durante siete días mediante sonda orogástrica después de 10 días de aclimatación. Se realizaron todos los experimentos con ratones según el protocolo aprobado (AN-4199; instalación para animales de la Escuela de Medicina de Baylor). Los ratones (45 días de edad) se recibieron de Harlan Laboratories (Houston, TX) y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos en jaulas con filtro superior (5 ratones por jaula) y tuvieron libre acceso a agua destilada y comida para roedores 2918 de Harlan. Se dividieron los ratones en diferentes grupos aleatoriamente.

Inducción de colitis aguda usando enema rectal de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Se indujo colitis seis horas antes de la sexta alimentación por sonda. Se anestesiaron los ratones mediante inhalación constante de isoflurano. Se diluyó una disolución de TNBS al 5% en agua (Sigma-Aldrich, EE.UU.) con un volumen igual de etanol absoluto y se administró a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal por vía intrarrectal. Se mantuvieron los ratones con la cabeza hacia abajo en una posición vertical durante 2 minutos después del enema para garantizar la retención completa del enema en el colon. Los ratones de control del procedimiento recibieron etanol al 50% en PBS. Se pesaron los ratones antes de la administración de TNBS y dos días después de la administración de TNBS. Luego se sacrificaron los ratones. Se determinaron la inflamación y el daño en el colon mediante la pérdida de peso, la puntuación macroscópica y la concentración de SAA en suero.

Evaluación macroscópica de colitis

Se recogieron los colones, se abrieron longitudinalmente y se registraron imágenes con una cámara digital. Se determinaron la inflamación y el daño en el colon según los criterios de Wallace (Morris *et al.*, 1989). Se puntuó cada colon de manera ciega. Se realizó estadística usando GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para detectar una diferencia significativa entre todos los grupos incluidos en el análisis. Se resumen los resultados como la mediana y el intervalo intercuartílico.

Medición de proteína amiloide sérica A (SAA) como marcador de inflamación sistémica

Se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardiaca, se anticoagularon y se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para aislar el plasma. Se midieron las concentraciones de amiloide sérico A (SAA) en muestras de plasma usando kits para ELISA de ALPCO (Salem, NH) según las instrucciones de fabricante. SAA es una proteína de fase aguda indicativa de inflamación sistémica en ratones que se correlaciona con la intensidad de la colitis.

Resultados

L. reuteri 6475 protege a los ratones frente a colitis aguda inducida por TNBS

Se sometieron a prueba los efectos antiinflamatorios de *L. reuteri* 6475 en un modelo en ratón inducido por TNBS de colitis aguda. Se compararon ratones que recibieron *L. reuteri* 6475 por sonda orogástrica cada día con ratones que recibieron el control de medios. También se estudiaron ratones expuestos a PBS en vez de TNBS como controles negativos de colitis.

Las figuras 4-6 representan datos de dos experimentos independientes. Los controles negativos de colitis que recibieron PBS en vez de TNBS por vía intrarrectal tuvieron una pérdida de peso muy pequeña (o incluso aumentaron de peso), daño en el colon poco frecuente y bajas concentraciones de SAA sérico. Los ratones positivos para colitis que recibieron medios MRS y TNBS/ETOH desarrollaron una intensa colitis caracterizada por una gran cantidad de pérdida de peso, úlceras con inflamación en el colon y extendiéndose los principales sitios de daño en más de 1 cm, y concentraciones de SAA significativamente elevadas en suero. La sonda orogástrica con *L. reuteri* 6475 redujo significativamente la pérdida de peso, la inflamación macroscópica en el colon y las concentraciones de SAA sérico, lo que muestra que *L. reuteri* 6475 atenuó significativamente la colitis.

El mutante de *hdcA* produce una capacidad disminuida para atenuar la colitis

Usando el mismo modelo de ratón, se sometió a prueba si se requería el gen de *hdcA*, que codifica para histidina descarboxilasa para los efectos antiinflamatorios de *L. reuteri* 6475. Se dividieron aleatoriamente ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad en tres grupos que recibieron medio MRS o mutante de *hdcA* o *L. reuteri* 6475 de tipo natural, respectivamente. Las figuras 7 y 8 representan datos de dos experimentos independientes. De nuevo, la sonda orogástrica con *L. reuteri* 6475 redujo significativamente la pérdida de peso y el daño en el colon en comparación con el grupo de control de medios. Los ratones que recibieron mutante de *hdcA* tuvieron una pérdida de peso significativamente aumentada e inflamación macroscópica en el colon en comparación con ratones que recibieron bacterias de tipo natural, lo que muestra que el mutante de *hdcA* produce una capacidad disminuida para atenuar la colitis.

REIVINDICACIONES

1. Método de selección de una cepa de bacterias de ácido láctico probióticas para su uso en la producción local de histamina en un mamífero, en el que dicho método comprende examinar bacterias para determinar la presencia de un operón de histidina activo y seleccionar una cepa que tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina.
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha cepa se selecciona por su capacidad para producir histamina a un nivel mayor de 250 pg/ml.
10
3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha cepa es *Lactobacillus reuteri*.
4. Producto que comprende células de una cepa de *Lactobacillus reuteri* que puede obtenerse mediante el método de selección según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* tiene un operón de histidina activo y puede producir histamina, para su uso en la producción local de histamina en un mamífero en el que la señalización de histamina mediante el receptor de H₂ suprime la producción de TNF y provoca de ese modo un efecto antiinflamatorio, y en el que dicho uso es en el tratamiento y/o la profilaxis de estados inflamatorios.
15
5. Producto para su uso según la reivindicación 4, en el que dicho mamífero es un ser humano.
20
6. Producto para su uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la producción local de histamina es en el tracto GI, aparato GU, la cavidad bucal, los pulmones, las vías respiratorias, o en la piel de dicho mamífero.
25
7. Producto para su uso según la reivindicación 6, en el que el estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en colitis, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, diverticulosis, gingivitis y vaginitis.
8. Producto para su uso según la reivindicación 4, en el que dicha cepa es *Lactobacillus reuteri* 645.
30
9. Producto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que dicho uso comprende además la administración de al menos un agente terapéutico o nutricional adicional.

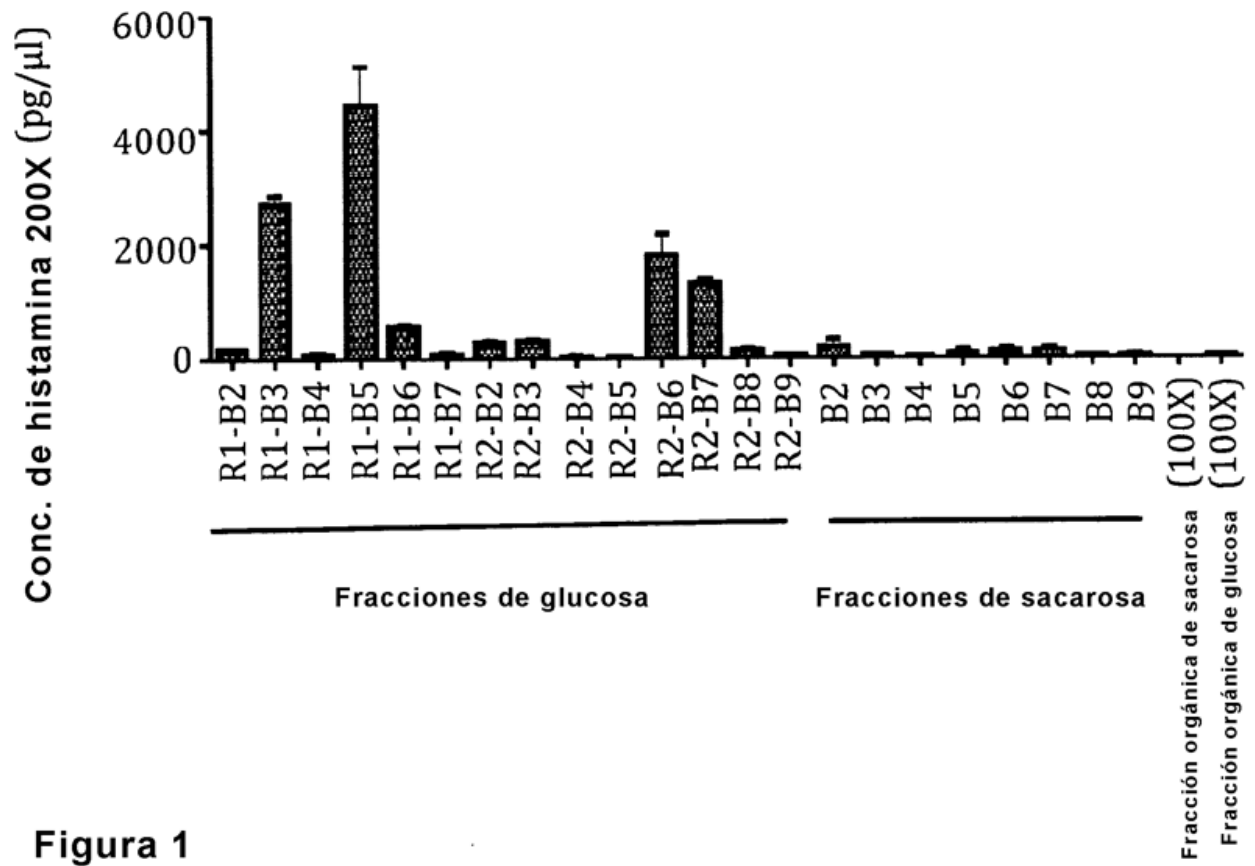


Figura 1

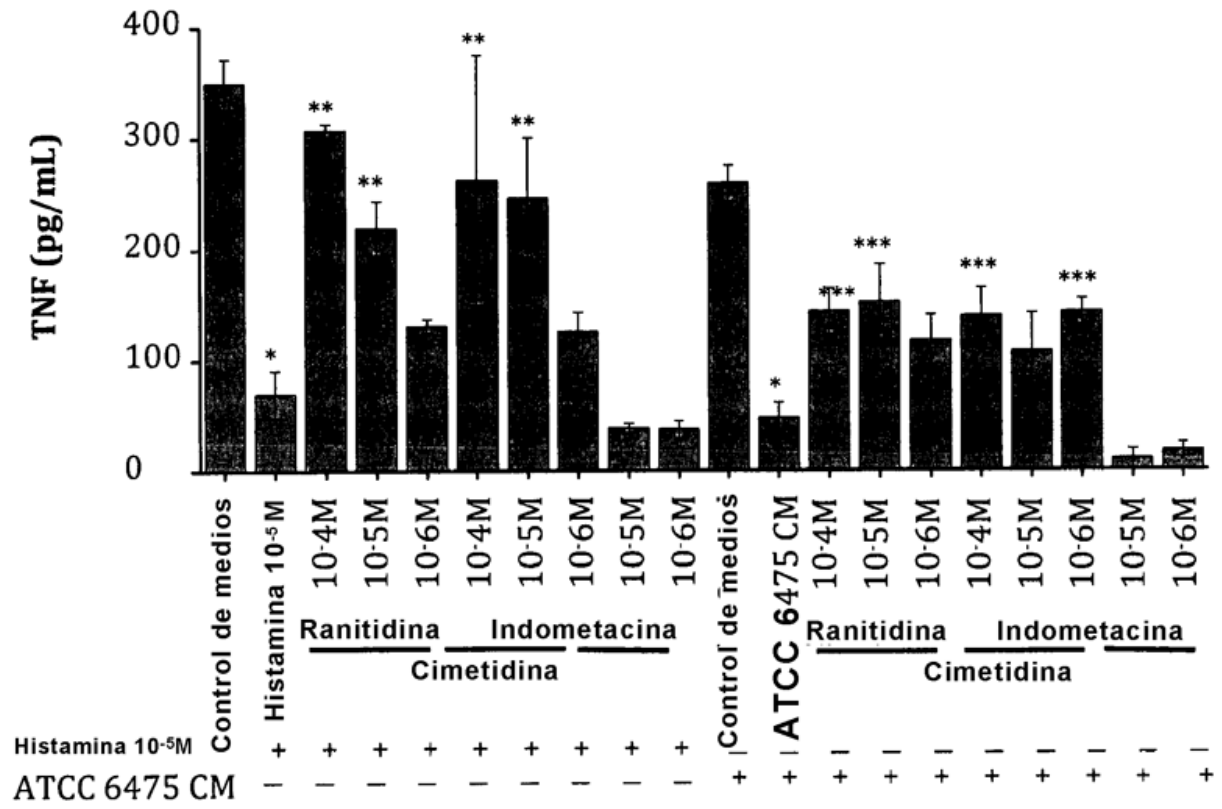


Figura 2A

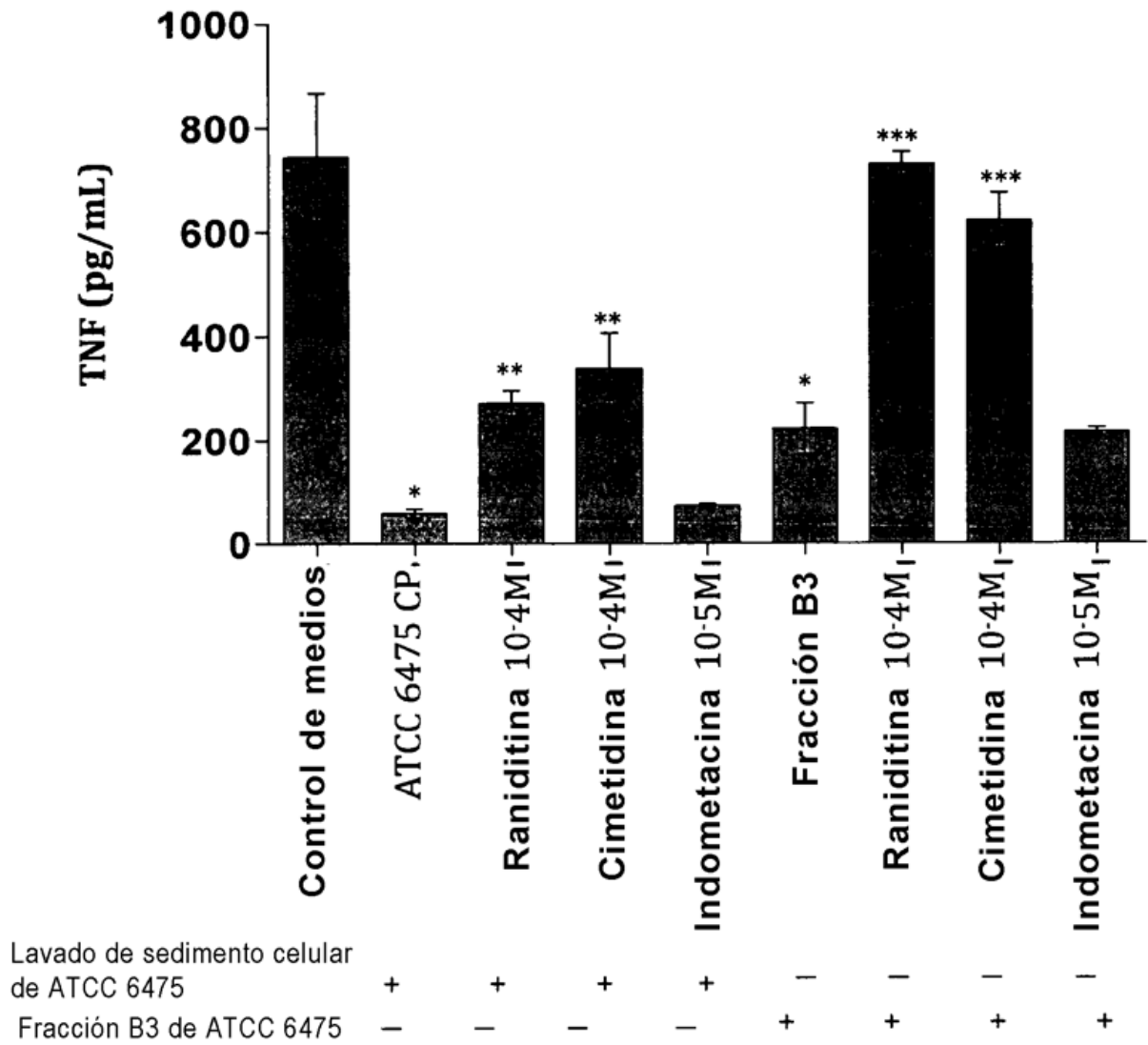
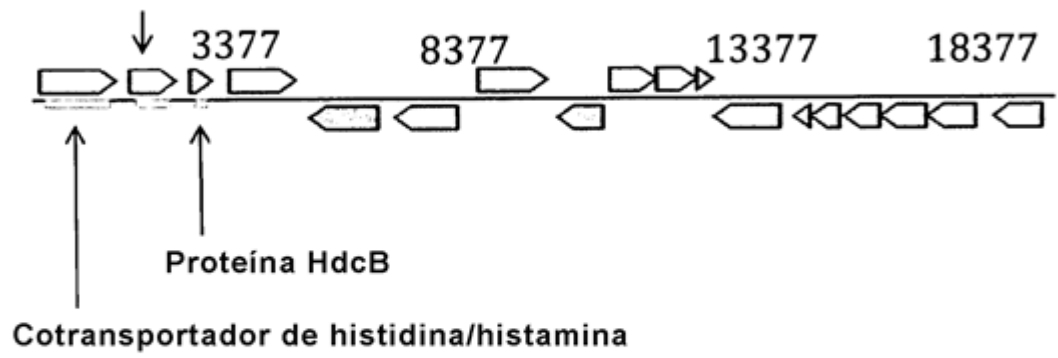


Figura 2B

A

Histidina descarboxilasa dependiente de piruvato tipo A



B

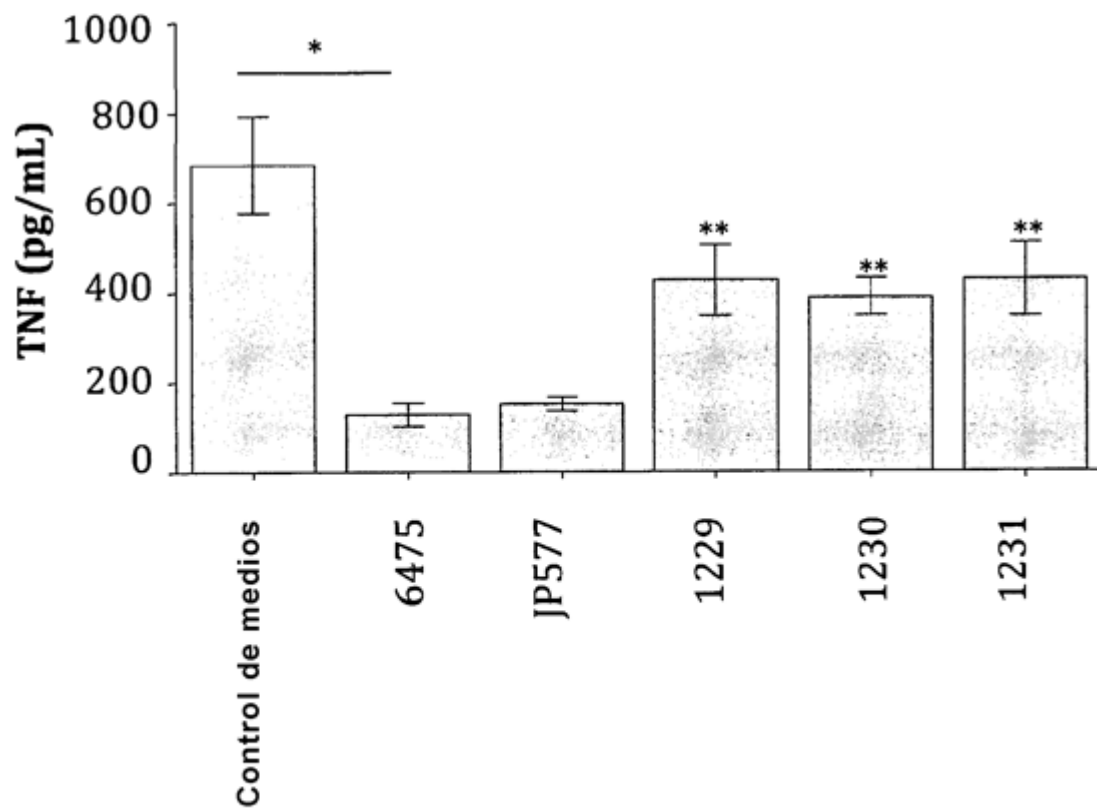
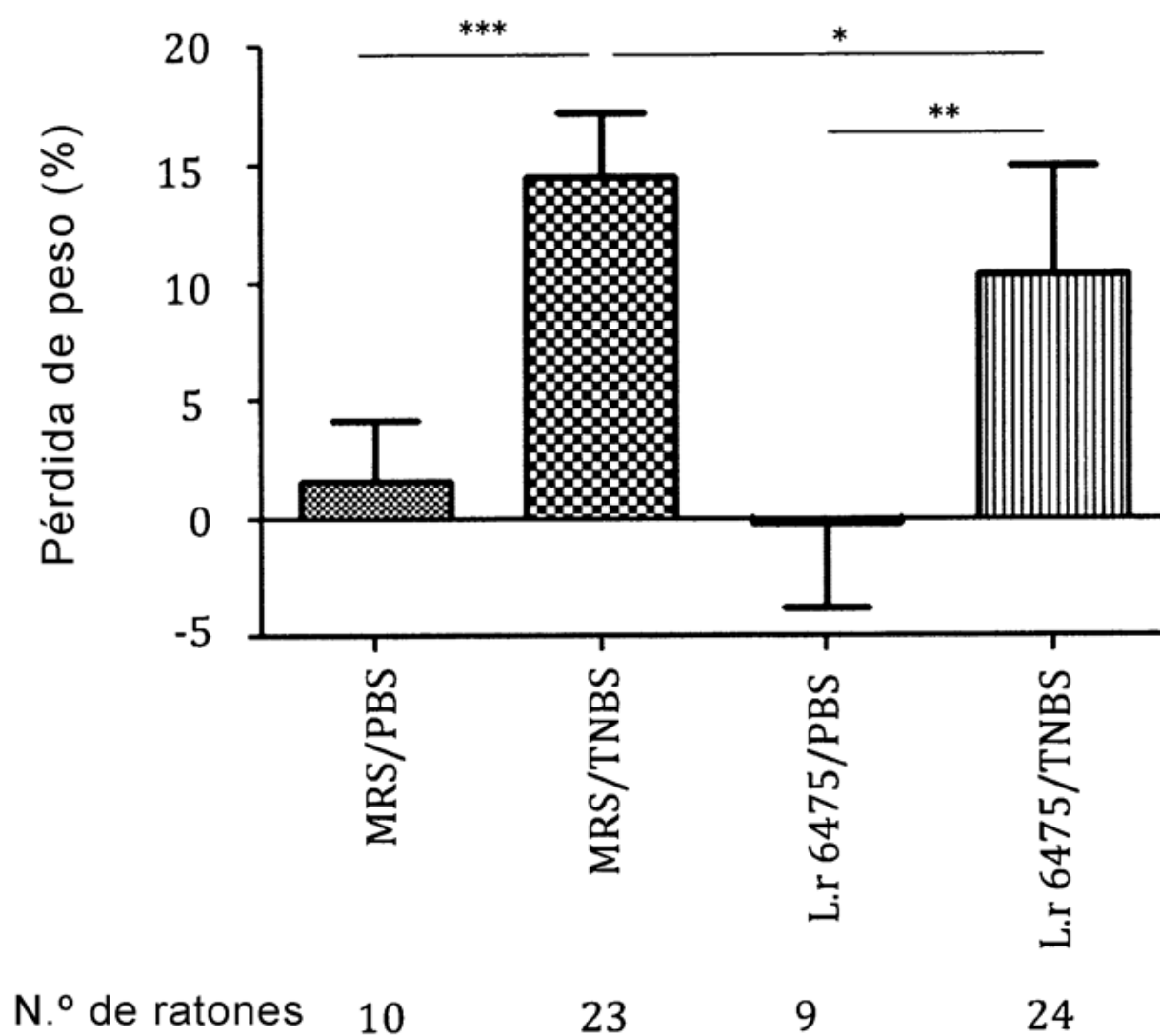


Figura 3

**Figura 4**

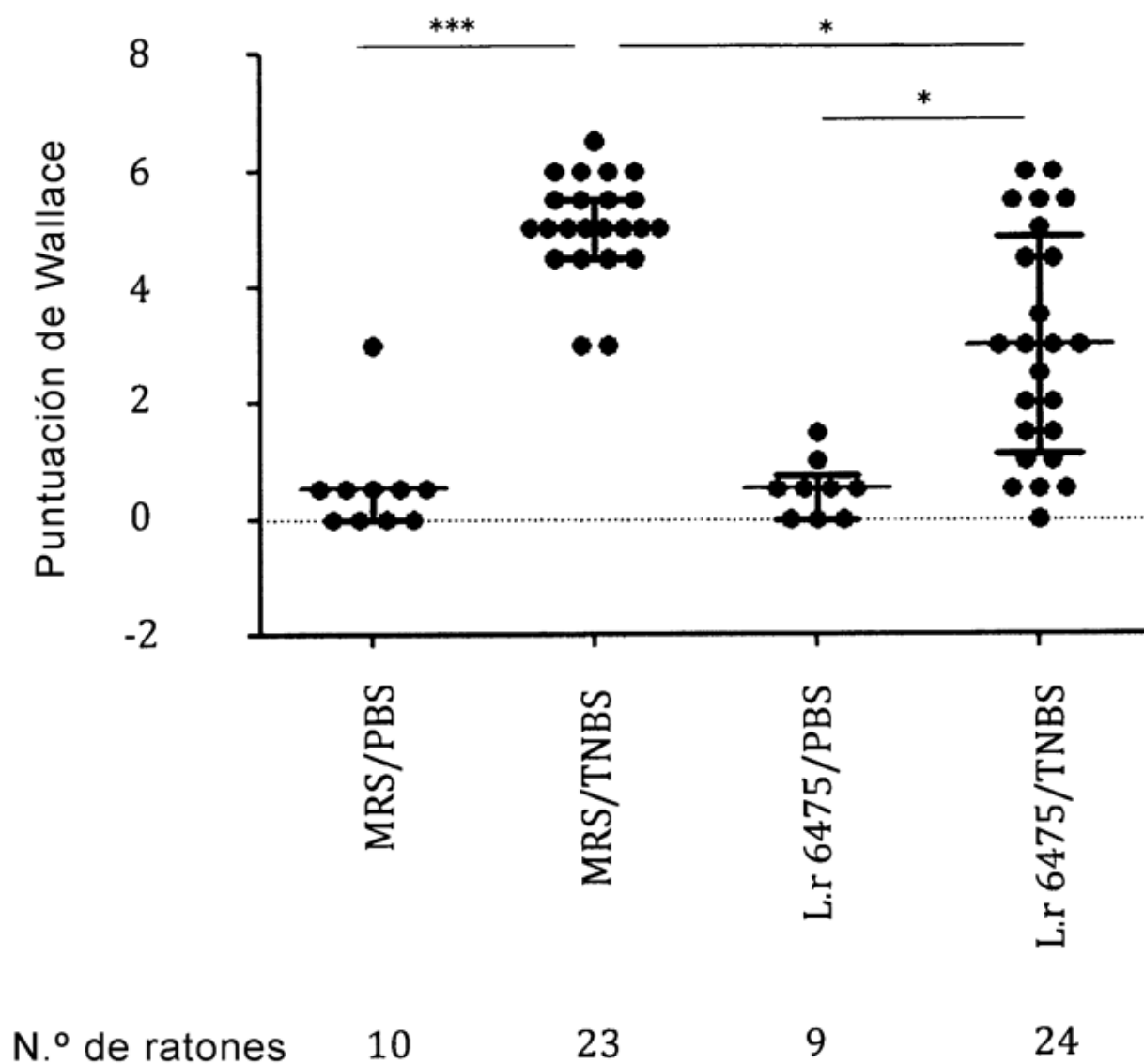
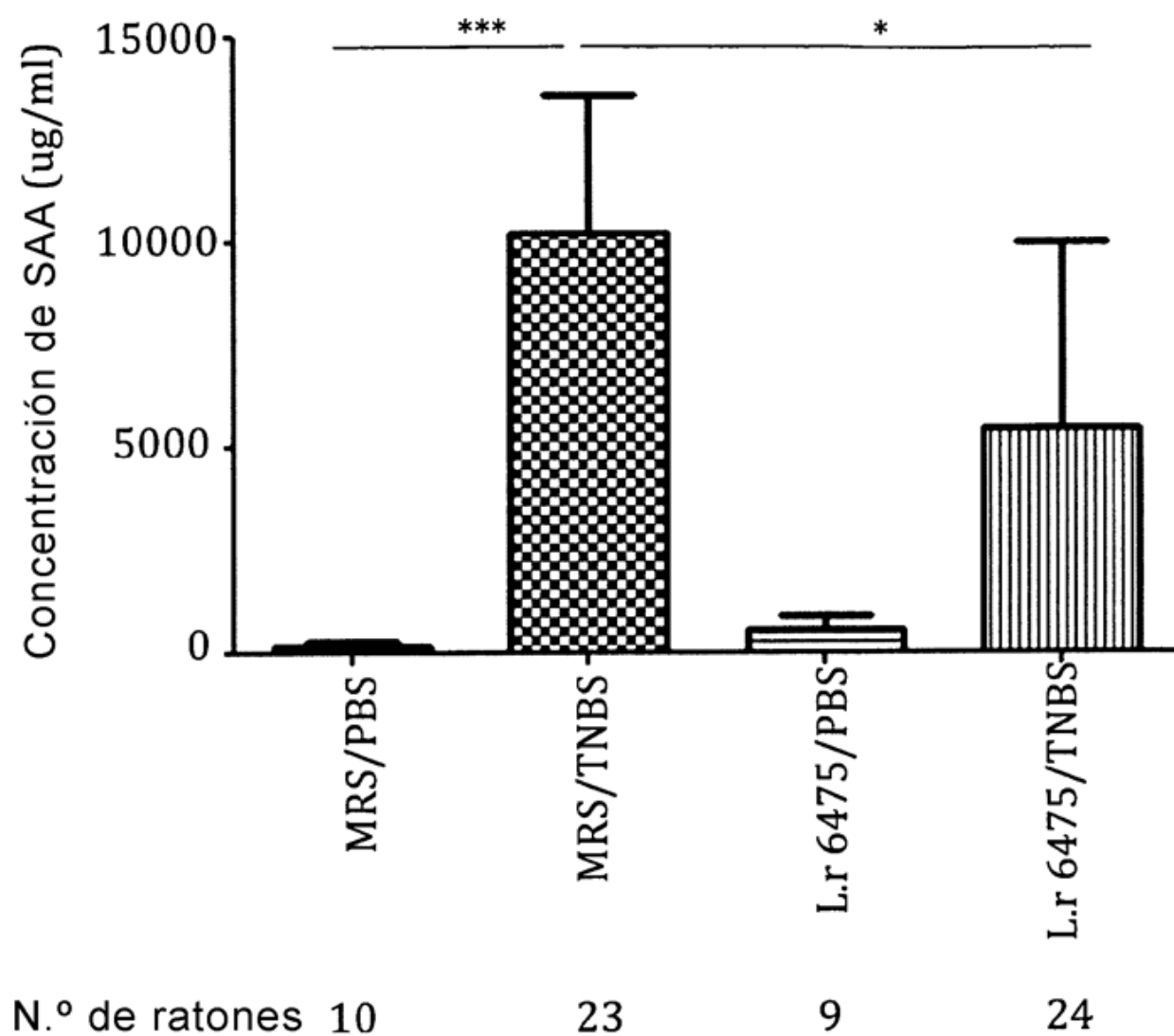


Figura 5

**Figura 6**

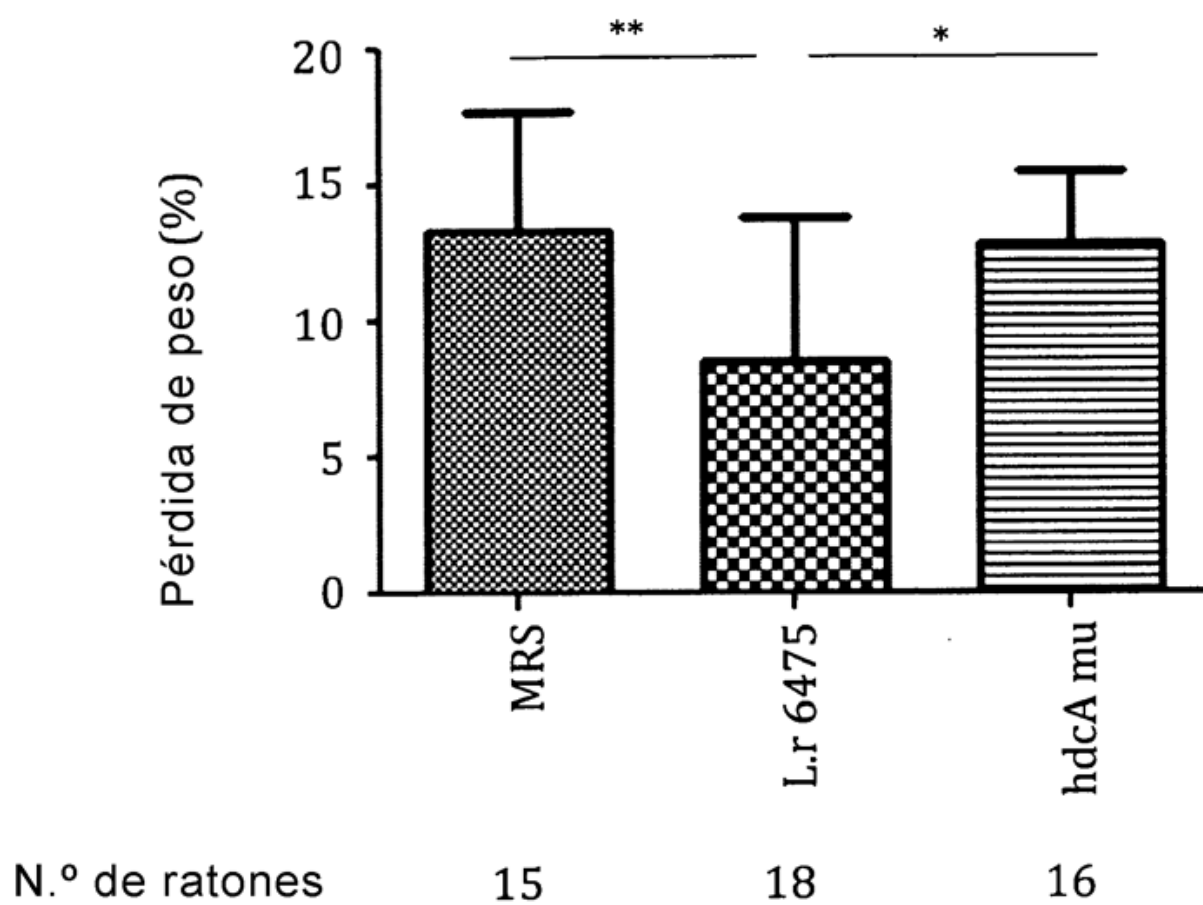


Figura 7

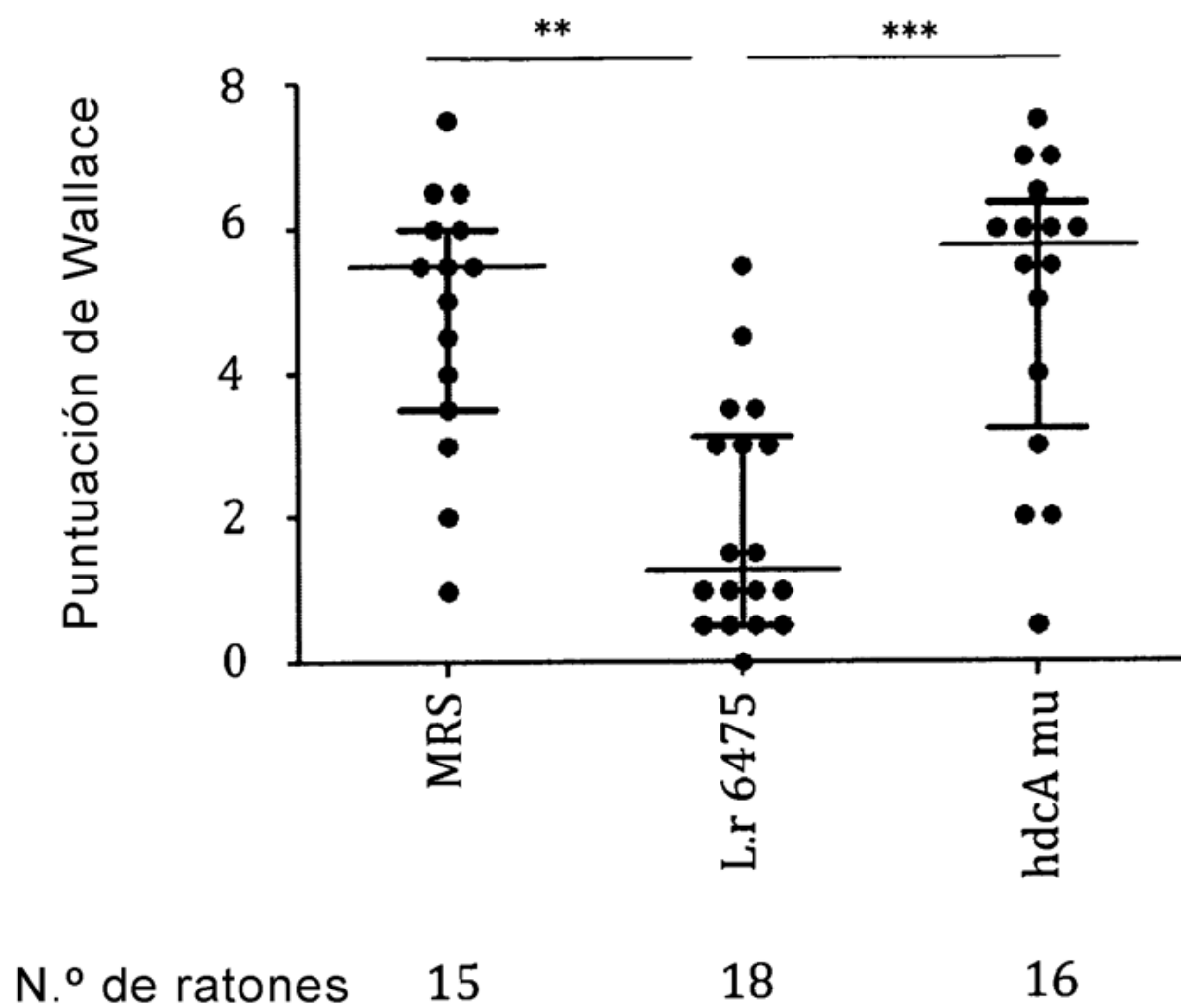


Figura 8