

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 852**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/GB2014/050829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14155056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14712715 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2978432**

54 Título: **Una composición de galactooligosacáridos para uso en la prevención o el tratamiento de la disfunción cognitiva y alteraciones emocionales en neuropsiquiatría**

30 Prioridad:

28.03.2013 GB 201305708

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

19.08.2019

73 Titular/es:

**CLASADO INC. (100.0%)
Edificio Interseco, Piso 2, Calle Elvira Méndez,
Apartado 0816-01560
Panamá 5, PA**

72 Inventor/es:

TZORTZIS, GEORGIOS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 722 852 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

Una composición de galactooligosacáridos para uso en la prevención o el tratamiento de la disfunción cognitiva y alteraciones emocionales en neuropsiquiatría

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende una mezcla de galactooligosacáridos (GOS) para uso en la prevención o tratamiento de alteraciones emocionales que se producen en enfermedades neuropsiquiátricas tales como trastornos depresivos o trastornos de ansiedad, en un ser humano.

10 La prevención de una enfermedad se refiere a la capacidad de una composición o tratamiento farmacéutico para no solo prevenir la aparición de la enfermedad, como la reducción del factor de riesgo, sino también para detener su progreso y reducir sus consecuencias una vez que se haya establecido (Ref: adaptado del Glosario de términos utilizados en la serie Salud para Todos. OMS, Ginebra, 1984).

La prevención primaria se dirige hacia la prevención de la aparición inicial de un trastorno, mientras que la prevención secundaria y terciaria busca detener o retrasar la enfermedad existente y reducir la aparición de recaídas y el establecimiento de enfermedades crónicas.

15 Las enfermedades o trastornos neuropsiquiátricos se refieren a trastornos cerebrales orgánicos o trastornos neurológicos que causan síntomas psiquiátricos. Incluyen trastornos de ansiedad y trastornos depresivos que comúnmente ocurren en pacientes ancianos.

20 Una revisión de Gryan, J F y Dinan, T G en Nature Review/Neuroscience; 13; 701-712; (2012) describe cómo los estudios en animales libres de gérmenes y en animales expuestos a infecciones bacterianas patógenas, bacterias probióticas o antibióticos sugieren un papel para la microflora intestinal en la regulación de la ansiedad, el estado de ánimo, la cognición y el dolor.

Las bacterias probióticas se definen como bacterias vivas que pueden conferir un beneficio para la salud en el huésped si se ingieren.

Bravo, J A et al., demostraron propiedades antidepresivas y ansiolíticas del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* cuando fueron ingeridos por ratones (ver Proc Natl Acad Sci USA; 108; 16050-16055; (2011)).

25 Burnet, PWJ sugirió que los estudios futuros que usan antimicrobianos selectivos y prebióticos para aumentar las cepas de lactobacilos y bifidobacterias autóctonas del intestino pueden tener un efecto sobre los comportamientos y los resultados neurofisiológicos en animales y humanos (ver Proc. Natl. Acad. Sci. USA; E175; (2012)).

30 Los prebióticos se definen como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera beneficiosa al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, lo que resulta en una mejora en la salud del huésped. Los galactooligosacáridos (GOS) y los fructooligosacáridos (FOS) son ejemplos de prebióticos que son resistentes a las enzimas digestivas gastrointestinales de los mamíferos pero que son fermentados por bacterias colónicas específicas.

35 Se ha encontrado ahora que la administración oral a un mamífero, como un ser humano, de una composición que comprende una mezcla de galactooligosacáridos puede dar como resultado una interacción directa con las neuronas ubicadas en el tracto gastrointestinal, lo que a su vez puede producir un aumento inesperado de Los niveles de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR). Específicamente, los niveles elevados de la proteína NMDAR NR1 y/o el ARNm tanto en la corteza como en la parte del hipocampo del cerebro fueron encontrados, y también de la proteína NMDAR NR2A en el hipocampo. Esto sugirió que las composiciones que comprenden dicha mezcla pueden ser
40 beneficiosas para prevenir o tratar trastornos emocionales que ocurren en trastornos depresivos o trastornos de ansiedad.

También se ha encontrado que la administración oral de una composición de GOS reduce la secreción de cortisol. Dado que el cortisol se libera en respuesta al estrés, esto sugiere que la composición puede reducir la exagerada secreción de cortisol que es sintomática de los trastornos de ansiedad y los trastornos depresivos.

45 La mezcla de galactooligosacáridos comprendía disacáridos Gal (β 1-3)-Glc; Gal (β 1-3)-Gal; Gal (β 1-6)-Gal; Gal (α 1-6)-Gal; trisacáridos Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc; Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc; tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc y pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc.

El documento WO2010/023422 describe la mezcla mencionada anteriormente de galactooligosacáridos para usar en la prevención o el tratamiento de la inflamación.

50 Esta mezcla de galactooligosacáridos se divulga en el documento EP 1 644 482, que describe una nueva cepa de *Bifidobacterium bifidum* que produce una actividad enzimática galactosidasa que convierte la lactosa en esta nueva mezcla de galactooligosacáridos. Esta nueva mezcla ha demostrado tener propiedades prebióticas y antiinflamatorias en el intestino.

Esta mezcla de galactooligosacáridos se comercializa comercialmente con el nombre de Bimuno^R (marca registrada)

y está disponible en Clasado Ltd (Milton Keynes, Reino Unido).

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una mezcla de galactooligosacáridos como se define anteriormente para uso en la prevención o tratamiento de trastornos emocionales que ocurren en trastornos depresivos o trastornos de ansiedad.

- 5 La mezcla de galactooligosacáridos como se define anteriormente se puede usar en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar trastornos emocionales que ocurren en trastornos depresivos o trastornos de ansiedad.

La disfunción cognitiva puede ser una declinación o deterioro cognitivo como resultado del envejecimiento, la demencia o la esquizofrenia. Las enfermedades neuropsiquiátricas pueden ser trastornos depresivos o trastornos de ansiedad. Los trastornos de ansiedad cubren varias formas diferentes de un tipo de trastorno psiquiátrico común caracterizado por una excesiva rumiación, preocupación, inquietud, aprehensión y temor ante futuras incertidumbres basadas en eventos reales o imaginarios que pueden afectar tanto la salud física como psicológica.

10

También se proporciona un método para prevenir o tratar trastornos emocionales que ocurren en trastornos depresivos o trastornos de ansiedad que comprenden administrar a un individuo, como un ser humano, una cantidad efectiva de una composición que comprende una mezcla de galactooligosacáridos como se define anteriormente. Una cantidad eficaz de la composición de galactooligosacárido se administra preferiblemente diariamente como una dosis única o, alternativamente, como dos dosis separadas con varias horas de diferencia, por ejemplo, de 4 a 12 horas, preferiblemente de 6 a 10 horas, lo más preferiblemente con 8 horas de diferencia.

15

Preferiblemente, la composición o mezcla de galactooligosacáridos se administra por vía oral diariamente en forma de un polvo liofilizado, una tableta, una cápsula, una formulación líquida como un jarabe o una pastilla suave.

- 20 El producto conocido como Bimuno R comprende al menos el 49% de la materia seca como la mezcla de galactooligosacáridos. El resto de la composición puede comprender componentes no activos tales como glucosa, galactosa, lactosa, goma arábica, maltodextrina y ácido cítrico.

La composición en polvo comprende preferiblemente de 1.35 g a 9.6 g de galactooligosacárido en 1.65 g a 20 g de la composición en polvo, preferiblemente de 1.96 g a 4.9 g de galactooligosacárido en 2.5 g a 10 g del polvo, lo más preferiblemente 2.7 g a 2.75 g de galactooligosacárido en 3.0 g a 5.5 g de composición. La composición puede agregarse a una bebida, preferiblemente una bebida caliente, o rociada en alimentos, por ejemplo, en cereales para el desayuno. La composición también se puede agregar como ingrediente a varios productos alimenticios y bebidas tales como jugo de frutas, bebidas de frutas, agua, café, yogur, cereales, pan, pasteles, galletas y similares.

25

Alternativamente, el galactooligosacárido puede presentarse como un jarabe o pastilla (jarabe deshidratado) en el que los componentes no activos pueden comprender glucosa, galactosa, lactosa y ácido cítrico. Una dosis diaria de jarabe puede comprender desde 1.35 g hasta 9.6 g de mezcla de galactooligosacáridos en 2.1 g a 25.29 g de la composición de jarabe, preferiblemente de 1.96 g a 4.9 g de galactooligosacárido en 3.0 g a 12.9 g del jarabe, lo más preferiblemente de 2.7 g a 2.75 g de galactooligosacárido en 4.1 g a 7.25 g de jarabe.

30

La composición de galactooligosacáridos de la invención tiene propiedades ansiolíticas, reduce la actividad del eje hipotalámico-hipofisario (secreción de hormona del estrés) y reduce las respuestas inflamatorias en el cerebro. Por lo tanto, Bimuno^R GOS puede ser beneficioso en el tratamiento o la prevención de trastornos de ansiedad (por ejemplo, preocupación, insomnio), trastornos depresivos, inflamación cerebral causada por meningitis bacteriana, encefalitis por herpes simple o que ocurre en la enfermedad de Alzheimer.

35

Bimuno R GOS también puede mejorar el deterioro cognitivo en el envejecimiento, la demencia y la esquizofrenia. Además, la composición de GOS puede beneficiar la influencia perjudicial de la infección materna en el cerebro fetal en desarrollo.

40

La invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos y figuras.

La figura 1A muestra el efecto de FOS y GOS en los niveles de proteína BDNF en extractos de corteza frontal e hipocampo de la rata.

- 45 La Figura 1B muestra el efecto de FOS y GOS en los niveles de subunidades NR1 en la corteza frontal y el hipocampo de la rata. Se muestran imágenes de inmunotransferencia de NR1 e inmunorreactividad de β -actina en extractos de proteínas.

La Figura 2A muestra el efecto de FOS y GOS en los niveles de subunidades NR2A en la corteza frontal y el hipocampo de la rata. Se muestran imágenes de inmunotransferencia de las subunidades NR2A y la inmunorreactividad de β -actina.

50

La Figura 2B muestra el efecto de FOS y GOS en los niveles de subunidades NR2B en la corteza frontal y el hipocampo de la rata. Se muestran imágenes de inmunotransferencia de NR2B y la inmunorreactividad de β -actina.

Las Figuras 3A a 3F son autoradiografías representativas de la expresión de ARNm de BDNF (A, C, E) y subunidad

NR1 (B, D, F) en el hipocampo de la rata después de la administración oral de agua (A, B), FOS (C, D) o GOS (E, F). Las flechas delimitan la expresión aumentada y la cabeza de la flecha indica expresión reducida. DG = circunvolución dentada, CA1 y CA3 = subcampos Cornu Ammons del hipocampo. Barra de escala = 200 μ M.

5 Las figuras 4A a 4D muestran el efecto de FOS y GOS en los niveles de ARNm de BDNF, NR1, NR2A y NR2B en el giro dentado (DG) de los subcampos CA1 y CA3 (Cornu Ammons) del hipocampo.

La Figura 5 muestra el efecto sobre la secreción de cortisol en adultos sanos después de la ingestión de FOS Grupo A), GOS (Grupo C) y un placebo (Grupo B).

La Figura 6A muestra el efecto sobre la actividad locomotora en ratones alimentados con agua después de la inyección de lipopolisacárido (LPS).

10 La Figura 6B muestra cómo GOS abolió el efecto LPS en la actividad locomotora.

La Figura 7 muestra el efecto sobre el comportamiento natural de excavación y enterramiento, como se muestra en el ensayo de enterramiento de mármol, en ratones después del tratamiento con LPS.

15 La Figura 8 muestra el efecto sobre el comportamiento de ansiedad en ratones después del tratamiento con LPS. Latencia (A) = tiempo necesario para pasar de las áreas oscuras (menos estresantes) a las claras (más estresantes). Mayor latencia = más estresada/ comportamiento exploratorio reducido. Tiempo en luz (B) = tiempo pasado en área clara. Mayor tiempo = menos ansioso.

La Figura 9 muestra el efecto sobre los niveles de citoquinas en la corteza frontal de ratones 24 horas después de la inyección de LPS.

20 La Figura 10 muestra el efecto sobre los niveles de citoquinas en el plasma de ratones 24 horas después de la inyección de LPS.

La Figura 11 muestra el efecto de BGOS en el rendimiento cognitivo en ratas sanas.

Ejemplo 1

La composición en polvo liofilizada se envasa en un "envase cilíndrico monodosis (stick-pack)" y que contiene 5.5 g de producto final:

25 - mezcla de galactooligosacáridos (GOS) 2.75 g

Lactosa 1.40g

Monosacáridos (glucosa, galactosa) 0.64g

Ayuda de secado 0.24g

Ceniza 0.23 g

30 Humedad 0.19g

Proteína 0.05g

Ejemplo 2

Composición de jarabe por 7.25 g de producto terminado:

mezcla de galactooligosacáridos (GOS) 2.75 g

35 Lactosa 0.58 g

Monosacáridos (glucosa, galactosa) 1.69 g

Ceniza 0.23 g

Humedad 1.95 g

Proteína 0.05 g

40 Ejemplo 3

Estudio in vivo del efecto de la alimentación de prebióticos en las subunidades del receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro central de (BDNF) y N-metil-D-aspartato (NMDA).

Materiales y métodos

Administración de prebióticos

5 Todos los experimentos con ratas se llevaron a cabo de acuerdo con las líneas de guía del Ministerio del Interior del Reino Unido y con las licencias aprobadas. A ratas Sprague Dawley macho (225-250 g) se les administró una administración oral diaria (sonda) de agua, FOS (fructooligosacárido) (4 g/kg) o GOS (galactooligosacárido [Bimuno[®]]) (4 g/kg), durante 5 semanas (n = 8/grupo). Este régimen de dosificación se basó en estudios previos (Anthony et al; Food Chem Toxicol.; 44(6); 819-26 (2006)) y datos piloto que muestran que estas dosis óptimas de prebióticos proporcionan el máximo crecimiento de microbiota (no mostrado). Se sacrificaron todos los animales, se recogió la sangre del tronco y se extrajeron los cerebros, veinticuatro horas después de la última sonda. La sangre se centrifugó para obtener plasma y la corteza frontal y el hipocampo se disecaron de la mitad de los cerebros recolectados. Los cerebros completos y las regiones aisladas se congelaron instantáneamente en isopentano en hielo seco y se almacenaron con plasmagel a -80°C antes de su uso.

Análisis BDNF

15 El tejido de la corteza y el hipocampo de todos los grupos se homogeneizó en RIPA (radio ensayo de inmunoprecipitación) tampón (1:10 p/v, Sigma Aldrich, Reino Unido) que contiene inhibidores de proteasa ("Complete-Mini", Roche). Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el reactivo de Bradford (Sigma, Reino Unido). Las muestras de extractos de proteína se diluyeron 1:5 v/v en agua desionizada, antes de su análisis con un kit comercial BDNF ELISA (sistema de inmunoensayo BDNF Emax, Promega Reino Unido).

Inmunotransferencia

20 Concentraciones iguales de extractos proteicos de corteza, hipocampo o cerebelo (20 µg) de los grupos prebióticos y de control se mezclaron con tampón de carga (50 mM 1,4-ditiotreitil y 0.025% de azul de bromofenol) y se fraccionaron con un marcador de peso molecular (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) por electroforesis en geles de SDS/poliacrilamida 7.5% premoldeados (Biorad, Reino Unido), y transferencia sobre membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, Watford, Reino Unido).

25 Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 5% (p/v) en PBS (tampón fosfato salino) que contiene 0.1% de Tween (PBST) durante 45 min, y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de incubación (PBST con 2% [w/v] de leche) que contenía un anticuerpo primario (diluido 1:1000) contra una de tres subunidades NMDAR: NR1 (AB9864, Millipore, Reino Unido), NR2A (AB1555, Millipore, Reino Unido) y NR2B (AB15362, Millipore, Reino Unido) y B-actina (Sigma-Aldrich, Reino Unido, diluido 1:50,000). Las membranas diluidas se lavaron tres veces durante diez minutos en PBST e incubados durante 30 min en HRP anticuerpo secundario unido a (peroxidasa de rábano) en un tampón de bloqueo. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el kit ECL-Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y aplicando membranas a la película de rayos X (película Kodak BioMax AR). Todos los anticuerpos produjeron una única banda de peso molecular esperado. Las densidades ópticas (OD) de las bandas se midieron con el Alphamager 3400 y los datos expresados como relaciones OD de fosforilado: subunidad NMDAR total, o subunidad NMDAR total: b-actina.

Histoquímica de hibridación in situ (ISHH)

40 Los hemisferios cerebrales de rata congelados se seccionaron coronariamente (14 µm) en un criostato, se descongelaron y se montaron en portaobjetos Superfrost-plus (Fisher Scientific) y se almacenaron a -80°C. Las secciones que contienen la corteza frontal se pretrataron como se describe (Burnet et al; Mol. Cell. Neurosci.; 46; 167-75; (2011)).

45 Oligodesoxirribonucleótidos comercialmente sintetizados (MWG, Reino Unido) complementarios a: BDNF (bases 883-927, NM001270630.1), NR1 (bases 746-780, NM008169.1), NR2A (bases 16421676, NM008170.2) o NR2B (bases 1758-1792, NM010350.2) se utilizaron en un método establecido por ISHH (Eastwood et al.; J. Psychopharmacol.; 21; 635-644; (2007)). Las sondas de oligodesoxirribonucleótidos se marcaron en el extremo 3' con [³⁵S]-dATP utilizando desoxinucleotidil transferasa terminal (Promega, Reino Unido). Las sondas se diluyeron en tampón de hibridación y se pipetearon en las secciones de tejido. (1x10⁶ cpm/sección), se cubrieron y luego se incubaron durante >16 horas a 34°C en bandejas de Perspex tapadas recubiertas con papel de filtro empapado con 4 x SSC (citrato sódico salino)/50% formamida.

50 Lavados post-hibridación incluidos: 2x SSC enjuague a temperatura ambiente para eliminar la cobertura; 0.5x SSC, 20 min (x3) a 55°C; 0.5x SSC 30 min (x2) a temperatura ambiente. Los portaobjetos se enjuagaron en ddH₂O, se secaron y se unieron a una película de rayos X (Kodak, Biomax MS) durante 7-28 días con microescala de ¹⁴C. Las densidades de grises promedio a lo largo de la profundidad de la materia gris de la corteza frontal se midieron para cada uno de los ARNm utilizando un análisis de imágenes asistido por ordenador, y se convirtieron en tejido nCi/mg usando estándares de ¹⁴C-microescala.

55

Análisis de HPLC

Fragmentos pequeños del tejido cortical (50 mg) se homogeneizaron individualmente en metanol enfriado con hielo (1:10 p/v) y se sometieron a microfuga a 13200 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se inyectaron sobrenadantes (10 µl) en un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard 1100. (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y se sometió a una derivación en línea, precolumna, como se describió anteriormente (Grant et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.; 844; 278-282 (2006)). Brevemente, las muestras (10 µl) se hicieron reaccionar con un volumen igual de reactivo de derivación [o-eftaldialdehído (2 mg) y Boc-L-cisteina (2 mg) en 0.2 ml de metanol y 0.8 ml de tampón de borato de sodio 0.4 M (pH = 9)], durante 5 minutos antes de la separación de la columna. La separación se logró usando una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6x 150 mm, 5 µm) mantenida a 30°C y un protocolo de separación similar al de (Morikawa et al.; J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.; 757; 119-25 (2001)). Las fases móviles consistieron en acetonitrilo (fase A) y tampón de acetato sódico 100 mM pH = 6 (fase B) y se bombearon a través de la columna a 1.4 ml/min. Se utilizó el siguiente sistema de gradiente (min/% B): 0/91, 35/84, 65/84. La detección de aminoácidos derivados se realizó mediante detección de fluorescencia (emisión: 443 nm; excitación 344 nm). Se construyeron curvas de calibración de ocho puntos de los aminoácidos D- y L- (Sigma Aldrich, Reino Unido) utilizando estándares auténticos (0.5 a 1000 pmol) y en cada caso se encontró que eran lineales con coeficientes de correlación de >0.995.

Análisis de los datos

Todos los datos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron con ANOVA de una vía seguido de un análisis post hoc (Tukey HSD).

Resultados

Bifidobacterias en gránulos fecales de ratas control y prebióticas

El número de bifidobacterias en los sedimentos fecales (expresado como log₁₀/g) de ratas alimentadas con FOS fue significativamente mayor que en los controles (9.498 ± 0.025 vs 9.354 ± 0.055, p<0.05), mientras que la densidad de las bifidobacterias de los animales alimentados con GOS fueron significativamente mayores que ambos controles (9.624 ± 0.05 vs 9.354 ± 0.055, p<0.01) y ratas alimentadas con FOS (9.624 ± 0.05 vs 9.498 ± 0.025, p<0.05).

El efecto de los prebióticos en BDNF y NR1 en la corteza frontal y el hipocampo de la rata

Los niveles de proteína BDNF en extractos de corteza frontal no difirieron entre los grupos (Fig. 1A). Sin embargo, el BDNF en extractos de hipocampo de ratas administradas con FOS fue significativamente más alto que el de los animales control y alimentados con GOS. Las inmunotransferencias revelaron que las ratas alimentadas con GOS contenían niveles significativamente mayores de inmunorreactividad NR1 en la corteza frontal en comparación con los animales control y FOS (Fig. 1B). El análisis del hipocampo, sin embargo, reveló que las ratas FOS contenían significativamente más subunidades NR1 que los otros grupos, aunque se observó una tendencia incrementada (p=0.055) en los animales GOS en relación con los controles.

El efecto de los prebióticos en las subunidades NR2A y NR2B en la corteza frontal de la rata y el hipocampo

En las inmunotransferencias, los extractos de hipocampo, pero no corticales, de animales alimentados con GOS, contenían una inmunorreactividad NR2A significativamente mayor en comparación con los otros dos grupos (Fig. 2). El nivel de NR2B en la corteza frontal y el hipocampo, no se vio afectado por la alimentación prebiótica.

El efecto de los prebióticos en los ARNm de las subunidades BDNF y NR en el hipocampo

La administración de prebióticos aumentó la abundancia de ARNm de BDNF (Fig. 3A, C, E y Fig. 4A) y NR1 (Fig. 3B, D, F) en el giro dentado del hipocampo, en relación con los controles. También se observó una reducción del ARNm de BDNF en el subcampo CA3 de ratas alimentadas con GOS (Fig. 3C).

La densitometría confirmó una expresión significativamente mayor de BDNF y NR1 en el giro dentado de ratas prebióticas (Fig. 4A, B). La administración de GOS dio como resultado una elevación de NR2A (Fig. 4C), pero no de NR2B (Fig. 4D), mRNA en el giro dentado y subcampo CA1 en relación con los controles y animales alimentados con FOS.

Concentraciones de aminoácidos fecales, plasmáticos y cerebrales después de los prebióticos.

Este estudio probó si una elevación de las bacterias intestinales aumentaba las concentraciones de D-alanina central al elevar las cantidades de este D-aminoácido en el intestino y la circulación. Las concentraciones de D-alanina libre en gránulos fecales de ratas alimentadas con GOS fueron significativamente mayores que en los animales control y FOS, con la administración de FOS dando como resultado niveles intermedios de este D-aminoácido (Tabla 1). Tanto los prebióticos como el GOS solos elevaron otros aminoácidos, incluida la D-serina y el glutamato. En plasma, los niveles de D-alanina fueron significativamente mayores en ratas alimentadas con GOS en comparación con los animales de control (Tabla 1), y se observó un ligero aumento, aunque no significativo (p = 0.086), en ratas alimentadas con FOS. La administración de prebióticos no alteró las concentraciones de otros aminoácidos circulantes (Tabla 1).

5 Las ratas alimentadas con GOS tuvieron una concentración significativamente mayor de D-serina en la corteza frontal en comparación con los controles (Tabla 2), aunque los niveles de todos los otros aminoácidos tanto en la corteza como en el hipocampo no cambiaron después de la alimentación prebiótica. Hubo una correlación general significativa entre los niveles de D-serina cortical y la proteína NR1 (r de Pearson = 0.684, p = 0.01). El análisis grupal individual reveló que esta asociación solo fue significativa después de la alimentación GOS (GOS: r = 0.96, p = 0.04; FOS: r = 0.68, p = 0.32; agua: r = 0.01, p = 0.989).

Tabla 1 Concentraciones de aminoácidos en gránulos fecales de rata y plasma después de la administración oral repetida de agua o prebióticos. *p<0.05 en comparación con el agua; + p<0.05 en comparación con FOS

Aminoácido	[Aminoácido] (nmol/g Heces) & (nmol/ml plasma)		
	Agua	FOS	GOS
<i>Gránulos Fecales:</i>			
L-alanina	7.8 ± 0.3	12.5 ± 0.8*	18.7 ± 1.8**
D-alanina	4.2 ± 0.1	5.9 ± 0.2	9.0 ± 0.9**
L/D-alanina	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Glutamato	13.1 ± 1.2	20.9 ± 1.2	32.4 ± 3.4**
Glutamina	1.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2*	4.2 ± 0.4**
Glut/Gln	8.0 ± 0.2	7.4 ± 0.2	7.8 ± 0.1
L-serina	3.9 ± 0.2	7.0 ± 0.8	10.7 ± 1.1**
D-serina	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01*	0.2 ± 0.02*
L/D-serina	39.0 ± 1.1	35.0 ± 2.5	53.5 ± 2.2*
<i>Plasma:</i>			
L-alanina	299.9 ± 22.1	308.6 ± 21.8	310.0 ± 21.7
D-alanina	4.0 ± 0.5	5.2 ± 0.4	6.1 ± 0.5*
L/D-alanina	79.2 ± 8.8	61.7 ± 6.9	49.3 ± 1.7*
Glutamato	82.6 ± 6.6	78.9 ± 7.3	68.7 ± 1.6
Glutamina	419.0 ± 14.1	420.9 ± 18.7	411.2 ± 17.9
Glut/Gln	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
L-serina	141.8 ± 7.8	142.9 ± 5.3	144.0 ± 6.8
D-serina	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
L/D-serina	72.2 ± 2.4	74.5 ± 1.1	72.5 ± 1.6

Tabla 2 Concentraciones de aminoácidos en la corteza y el hipocampo de la rata después de la administración oral repetida de agua o prebióticos. *p<0.05 en comparación con el agua

Aminoácido	Agua	[Aminoácido] (pmol/mg tejido)	
		FOS	GOS
Corteza Frontal:			
L-alanina	90.5 ± 7.9	100.9 ± 8.4	108.6 ± 6.6
D-alanina	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3
L/D-alanina	37.7 ± 5.9	42.8 ± 3.2	42.2 ± 2.0
Glutamato	783.9 ± 75.6	837.3 ± 48.0	822.3 ± 47.9
Glutamina	618.9 ± 52.7	645.4 ± 44.7	700.5 ± 44.0
Glut/Gln	1.27 ± 0.06	1.32 ± 0.1	1.18 ± 0.03
L-serina	141.4 ± 13.6	152.8 ± 6.0	161.8 ± 10.9
D-serina	40.3 ± 2.9	48.7 ± 1.7	53.6 ± 3.4*
L/D-serina	3.5 ± 0.23	3.1 ± 0.07	3.0 ± 0.14
Hipocampo:			
L-alanina	99.7 ± 9.5	92.0 ± 6.2	97.5 ± 9.3
D-alanina	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2
L/D-alanina	36.9 ± 3.9	36.5 ± 3.7	42.0 ± 2.5
Glutamato	705 ± 79.8	649 ± 59.3	643.9 ± 68.1
Glutamina	545.1 ± 58.2	480.1 ± 52.6	504.6 ± 48.0
Glut/Gln	1.30 ± 0.04	1.38 ± 0.09	1.27 ± 0.05
L-serina	121.4 ± 12.4	111.4 ± 7.8	111.9 ± 9.3
D-serina	37.4 ± 4.1	34.6 ± 2.1	35.3 ± 3.4
L/D-serina	3.3 ± 0.03	3.2 ± 0.04	3.2 ± 0.08

Discusión

- 5 Observamos 1) mayores niveles de BDNF en el hipocampo en ratas alimentadas con FOS en comparación con ratas alimentadas con GOS y animales de control, aunque el ARNm de BDNF aumentó en el giro dentado de ambos FOS y ratas alimentadas con GOS 2) proteína NR1 elevada en la corteza frontal de ratas alimentadas con GOS y en el hipocampo de animales alimentados con prebióticos; 3) niveles más altos de proteína NR2A y ARNm codificante en el hipocampo de ratas alimentadas con GOS en comparación con los otros grupos. Basado en el patrón de efecto anterior, está claro que el efecto del GOS no se basa en sus propiedades prebióticas, sino que está vinculado a la estructura química de los sacáridos en la mezcla de GOS.

Los prebióticos aumentan el BDNF del hipocampo en la rata

- 15 La expresión elevada de BDNF y proteína codificada en ratas alimentadas con FOS, es consistente con el efecto de un probiótico de bifidobacterium (Bercik et al; Neurogastroenterol Motil.; 23; 1132-9 (2011b); O'Sullivan et al; Benef Microbes; 2 (3); 199-207 (2011)) y la proliferación selectiva de estas especies con antimicrobianos (Bercik et al; Gastroenterology; 141; 599-609 (2011a)). Así, la administración de FOS puede haber aumentado la colonización de cepas psicotrópicas *B. breve*, *B./Longum* y/o similares, dentro del aumento general moderado de las densidades de bifidobacterias en relación con ratas alimentadas con GOS (ver Resultados). En vista de estas observaciones, por lo tanto, fue sorprendente que GOS no alterara los niveles de la proteína BDNF del hipocampo y, por otra parte, por una magnitud mayor que FOS. Hemos demostrado que la alimentación de GOS condujo a un cambio recíproco en el ARNm de BDNF en el giro dentado y la región CA3 del hipocampo. Una elevación de la expresión del gen BDNF en el giro dentado se ha asociado con la acción antidepresiva (Kerman, I.A.; Am. J. Psychiatry; 169; 1137-40 (2012)). Una elevación similar del ARNm de BDNF después de la administración de GOS está, por lo tanto, en consonancia con una posible propiedad antidepresiva/ansiolítica de las bacterias intestinales (Bercik et al, 2011a).

- 25 La administración de GOS aumenta las subunidades NR1 en la corteza de rata

- 30 El aumento de la proteína NR1 en ratas alimentadas con GOS en comparación con los animales control y FOS es consistente o similar al efecto del antidepresivo, la fluoxetina, un inhibidor de la captación de serotonina. Estudios clínicos recientes sugieren que el bloqueo de los NMDAR tiene efectos antidepresivos (Autry et al; Nature; 475; 91-5; (2011)). De los datos se desprende que una elevación de las subunidades NR1 corticales requiere un aumento varias veces mayor de las bifidobacterias, que se produce sin cambios en los niveles de subunidades NR2A y NR2B.

En general, la administración de GOS a ratas pareció tener un efecto más profundo en las subunidades NMDAR que

en los FOS. Es decir, GOS elevó la proteína NR1 y/o el ARNm tanto en la corteza como en el hipocampo, y NR2A en el hipocampo, mientras que FOS solo elevó NR1 en el hipocampo.

Relevancia para la salud del cerebro

5 En general, nuestros hallazgos tienen cierta relevancia para la prevención y/o el tratamiento de la disfunción cognitiva y los trastornos emocionales en las enfermedades neuropsiquiátricas y el envejecimiento. Por ejemplo, los pacientes que padecen esquizofrenia muestran déficits resistentes al tratamiento en la función ejecutiva, incluida la memoria de trabajo, en la que los NMDAR están involucrados de manera integral (Coyle. J.T.; *Schizophr. Bull.*; 38; 920-6; (2012)). El aumento de las bifidobacterias y lactobacilos por GOS, por lo tanto, es una importante estrategia complementaria para ayudar a las terapias farmacológicas y psicológicas contemporáneas. Además, el deterioro cognitivo durante el envejecimiento normal se puede prevenir o dificultar con la ingesta "profiláctica" de GOS, ya que el precondicionamiento con NMDAR tiene efectos neuroprotectores. (Sorriano et al; *J. Neurosci.*; 26; 4509-18; (2006)).

Ejemplo 4 - Estudio humano

15 Cuarenta y cinco voluntarios sanos recibieron uno de los dos prebióticos (fructooligosacáridos [FOS] (Grupo A) o galactooligosacáridos [GOS] (Grupo C) o un placebo (Grupo B) (maltodextrina) durante 3 semanas. Se tomó una muestra del cortisol salival al despertar antes y después del tratamiento. En el día final del tratamiento los participantes completaron una batería de tareas computarizada que evaluaba el procesamiento de información sobresaliente emocionalmente (the Emotional Test Battery, ET B; Harmer et al; *Am. J. Psychiatry*; 161; 1256-1263; (2004)).

20 Las respuestas de cortisol salival al despertar no difieren significativamente entre los grupos en la base, pero fueron significativamente más bajas después del tratamiento con GOS en comparación con el placebo y el FOS (interacción significativa entre el grupo de tratamiento x día de muestreo x punto temporal de muestreo en un ANOVA de medidas repetidas [F(8.164)=1.20, p=0.05]). El análisis de los datos de comportamiento reveló una disminución de la vigilancia atenta a la información negativa frente a la positiva después del tratamiento con placebo en comparación con el tratamiento con placebo (grupo x emoción x condición de enmascaramiento, [F(2.41)=3.14, p=0.05]). El grupo de tratamiento con FOS no tuvo un desempeño diferente al del grupo placebo en la tarea de la sonda de puntos. No hubo efectos significativos del tratamiento prebiótico en las tareas restantes de la ETB.

25 Nuestro estudio demuestra que la ingesta de GOS reduce la secreción de cortisol en voluntarios sanos. Además, se demostró que el GOS altera el procesamiento de la información positiva frente a la negativa, medida por la vigilancia de la atención, que se cree que desempeña un papel clave en la ansiedad y su modulación por los ansiolíticos (por ejemplo, Browning et al; *J. Psychopharmacol.*; 21; 684-690; Murphy et al.; *Int. J. Neuropsychopharmacol*; 12; 169-179; (2008)).

Ejemplo 5

Efecto de una mezcla de galactooligosacáridos sobre el comportamiento de la enfermedad inducida por lipopolisacáridos (LPS), ansiedad posenfermedad y niveles de citoquinas alterados en ratones.

Material y métodos

35 Animales, administración prebiótica e inyecciones de LPS.

40 Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley de animales del Ministerio del Interior del Reino Unido (Procedimientos científicos) (1986) y bajo las guías del Ministerio del Interior. Ratones CD1 macho (25-30 g, 6-8 semanas de edad, Harlan Orlac, Reino Unido), se alojaron 3 por jaula (jaulas de plexiglás 33x15x13 cms, LxWxH) y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio controladas estándar (ciclo de luz-oscuridad de 12 h, luces encendidas a las 7 a.m., 21+/-1°C, humedad 50+/-5%). Después de 4 a 5 días de habituación a la instalación de animales, los ratones se alimentaron con alimento estándar para ratones ad libitum, y se les proporcionó (de una manera pseudoaleatoria que coincide con el peso), ya sea con una solución prebiótica de 1.3% p/v de mezcla de galactooligosacáridos comercializados como Bimuno^R disponible en Clasado Ltd. (Reino Unido), en lo sucesivo denominado BGOS, o agua sola para beber durante 3 semanas. Los estudios piloto confirmaron que este régimen de dosificación de BGOS incrementaba de manera óptima las bifidobacterias y los lactobacilos en el intestino del ratón (Clasado Ltd, Reino Unido). Para evitar una posible contaminación de grupos cruzados, los 2 grupos de dieta se mantuvieron separados entre sí. Después de 3 semanas, todos los animales recibieron agua potable solo 24 horas antes de las inyecciones de LPS y los ensayos de comportamiento. Se administró una inyección única de LPS (0.75 mg/kg) en solución salina (0.9%), o solución salina sola, a los ratones mediante inyección intraperitoneal, 4 h antes de los ensayos de comportamiento. Por lo tanto, se analizaron cuatro grupos (n=15 ratones/grupo, 5 jaulas diferentes por tratamiento): 1) alimentación con agua/solución salina inyectada; 2) alimentación con agua/LPS inyectado; 3) alimentación con BGOS/solución salina inyectada; y 4) alimentación con BGOS/LPS inyectado. Este experimento se repitió para proporcionar un total de 30 ratones por grupo de ensayo para el análisis.

Actividad locomotora (LMA)

La actividad locomotora se reduce con el tratamiento con LPS (Skelly et al., (2013) PLOS One8:e69123) y, por lo tanto, se utiliza como medida del comportamiento de la enfermedad. Este ensayo ocurrió 4h después de LPS o inyecciones de solución salina. La configuración se realizó con cajas de plexiglás transparentes (48x27x21cms, LxWxH, Photo Beam Activity Hardware y software, Open Field San Diego Instruments) cubiertos con una parte superior de plexiglás transparente (perforada para respirar) y que contienen una capa delgada de ropa de cama de aserrín. La iluminación de las cajas era de unos 60 lux. Cada animal se colocó suavemente en la esquina de las cajas y se permitió la exploración libre de la arena durante 2 horas. La actividad locomotora se registró utilizando haces de fotos en las cajas y se expresó como el número de haces de rotura realizados por los animales a lo largo del tiempo. El experimentador contó el número de gránulos fecales al final del ensayo y los animales fueron devueltos a su jaula para que descansaran antes del siguiente ensayo de comportamiento.

Entierro de mármol

Este ensayo se utiliza para detectar fármacos ansiolíticos y antidepresivos y evaluar la ansiedad y el comportamiento obsesivo-compulsivo, basado en el comportamiento innato de los ratones para enterrar objetos en una situación estresante; se realizó como se describió anteriormente (Deacon R.M.; Nat. Protoc.; (2006); 1(1); 122124., Nicolas et al.; Eur.J. Pharmacol; (2006); 547; 106-115). El tratamiento con LPS y el comportamiento relacionado con la enfermedad inducida por LPS inducen una reducción en el número de mármol enterrado por los ratones (Njung'e & Handley; Pharmacol. Biochem. Behav.; (1991); 38(1); 63-67). El entierro de mármol se realizó 7 h después de la inyección de LPS/solución salina. Se colocaron veinte mármoles sobre una cama de aserrín de 5 cm en jaulas de plástico transparente (44x28x12 cms, LxWxH), en 5 líneas de 4, a 2 cm alejada una de la otra y a 2 cm alejada del borde de las jaulas. Los ensayos se realizaron bajo la iluminación normal de la habitación (~100 lux a 1 m sobre el piso) y como se describió anteriormente (Jacobson, L. et al.; Pharmacol. Biochem. Behav.; (2007); 15(4); 619-626) y usando las recomendaciones de (Deacon, R., 2006). Cada animal se colocó suavemente en la jaula con los mármoles durante 30 min, después de lo cual se contó el número de mármoles enterrados en al menos 2/3 de su superficie.

Caja clara-oscura

Este ensayo también se usa para evaluar el comportamiento de la ansiedad y se basa en el conflicto que enfrentan los ratones entre su atracción por la novedad y su miedo por arenas abiertas brillantes (Bourin, M. y Hascoet, M.; Eur. J. Pharmacol. (2003); 463 (1-3); 55-65; O'Leary, T.P. et al; J. Neuroscience Methods; (2012); 203 315-324. doi: S0165-0270 (11) 00594-21). Los ratones que están menos ansiosos pasan más tiempo en áreas de temor, es decir, la parte luminosa; Los ratones que están más ansiosos pasan más tiempo en la parte oscura segura. Se ha demostrado que el tratamiento con LPS aumenta el comportamiento de ansiedad en este ensayo (Bassi et al; Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.; (2012); 110(4); 359-369). Este ensayo se realizó 24 horas después de las inyecciones de LPS/solución salina.

La configuración se realizó con 2 compartimientos de madera pintados, uno pequeño negro (21x16x16 cms, LxWxH, con una pequeña abertura para acceder a la parte luminosa, 3x2.7cms, WxH) y una más grande brillante (46.5x21x21cms, LxWxH). El ensayo se realizó bajo una luz ligeramente tenue de 50 lux dentro del compartimiento brillante de la caja y se realizó como se describió anteriormente (Strekalova T. et al.; Neuropsychopharmacology; (2004); 29; 2007-2017). Cada animal se colocó suavemente en la parte oscura de la caja con luz-oscuridad y se dejó libre para explorar la caja completa durante 5 minutos. Se midió la latencia para dejar la parte oscura, el número de transiciones entre las partes oscura e iluminada y el tiempo empleado en la parte iluminada. El criterio para ingresar a cualquier compartimiento fue de 4 patas. Los ratones fueron colocados de nuevo en su jaula de origen con compañeros de jaula al final del procedimiento. La caja se limpió con un tejido ligeramente impregnado con alcohol al 10% entre cada animal para eliminar las señales de olor sin crear olores de alcohol. No había ruido de fondo en la sala y el experimentador se quedó en la sala para anotar en vivo. Los animales se consideran más ansiosos y, por lo tanto, afectados por la inyección de LPS, si muestran una latencia más alta para ingresar a la parte luminosa, un número menor de transiciones entre compartimentos y un tiempo menor en el área luminosa.

Recolección de tejidos

Los animales se sacrificaron entre las 12-1 p.m., 3 h después de los ensayos de comportamiento. Todo el cerebro fue cosechado inmediatamente y congelado instantáneamente en isopentano frío en hielo seco (Sigma-Aldrich, Reino Unido) antes de su almacenamiento a -80°C hasta su posterior análisis molecular. La sangre del tronco se recogió en tubos de EDTA de potasio (ácido etilendiamina tetraacético) y se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm. El plasma se aisló y se almacenó a -80°C para un análisis adicional de corticosterona. Se recogieron gránulos fecales de cada jaula a lo largo del estudio en glicerol al 70% en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se almacenaron a -20°C para recuento bacteriano adicional.

Análisis de los datos

Los datos se analizaron utilizando el software SPSS (versión 19). La normalidad de los datos fue probada usando un ensayo de Kolmogorov-Smirnov. La actividad locomotora se evaluó con un ANOVA de 2 vías, y todos los demás datos con un ANOVA de una vía (o Kruskal-Wallis para datos no paramétricos) seguidos del ensayo post-hoc de Tukey. Todos los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) y el umbral de significación estadística

se estableció en $p < 0.05$.

Resultados

Efectos de BGOS en el comportamiento inmediato de la enfermedad inducida por LPS: actividad locomotora y entierro de mármol

5 Los animales alimentados con agua mostraron una actividad locomotora más baja después de las inyecciones de LPS, en comparación con solución salina (Fig. 6A, efecto de tiempo, $F(5,260)=142.12$, $p < 0.0001$; efecto de inyección de LPS $F(1,52)=3.61$, $p = 0.063$; tiempo de interacción x inyección de LPS $F(5,260)=5.12$, $p < 0.001$). El ensayo post-hoc reveló que los animales con agua-LPS viajaron significativamente menos distancia que sus homólogos de solución salina a los 30 y 40 minutos (ambos $p < 0.05$). BGOS eliminó el efecto de LPS sobre la actividad locomotora (Fig. 6B), ya que todavía existía un efecto de tiempo ($F(5,260)=113.01$, $p < 0.0001$), pero ningún efecto de la inyección de LPS ($F(1,52)=1.12$, $p=0.3$) y sin tiempo de interacción x inyección de LPS ($F(5,260)=0.12$, $p=0.99$). BGOS no indujo ninguna diferencia en la actividad locomotora en animales salinos en comparación con el grupo salino en agua.

10 En el ensayo de enterramiento de mármol (Fig. 7), el LPS tuvo un efecto significativo en el comportamiento de los ratones ($H(df=3)=13.79$, $p < 0.01$), que no fue revertido por BGOS, ya que tanto los animales tratados con agua ($p < 0.05$) y BGOS ($p < 0.05$) que recibieron LPS enterraron menos mármoles que sus homólogos de solución salina. BGOS no indujo ninguna diferencia en el número de mármoles enterrados en animales con solución salina, en comparación con el grupo con agua y solución salina.

Efectos de BGOS en el comportamiento de ansiedad inducida por LPS retrasado: caja clara/oscura

20 LPS incrementó el comportamiento de ansiedad en animales alimentados con agua (Fig.8). Este efecto fue abolido por BGOS, según lo determinado por la latencia a la luz (Fig. 8A, $H(df=3)=12.17$, $p < 0.01$) y el tiempo en luz (Fig. 8B, $F(3,106)=4.71$, $p < 0.01$). De hecho, el análisis post-hoc reveló que los animales con agua-LPS mostraron una latencia a la luz significativamente 2 veces mayor que sus homólogos de solución salina ($p < 0.01$), pero también que los animales con solución salina y BGOS-LPS (ambos $p < 0.05$). Los animales con agua-LPS también mostraron un tiempo significativamente menor en la parte ligera que todos los otros grupos ($p < 0.05$ agua-LPS frente a todos los grupos). Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre los grupos en el número de transiciones entre las partes con oscuridad y partes con luz (Fig. 3C, $F(3,110)=1.7$, $p=0.17$). BGOS solo no indujo ninguna diferencia en los ratones de control, es decir, que recibió solución salina, en cualquiera de los parámetros, en comparación con animales con agua-solución salina.

30 Efectos de BGOS en los parámetros inmunitarios 24 horas después del LPS: niveles de citoquinas en la corteza frontal y el plasma

35 En la corteza frontal, LPS indujo cambios en el agua, pero no en BGOS, animales (Fig. 9) para TNF- α , IL-1 β e IL-6, pero no para IL-10. El análisis post-hoc mostró que los animales con agua LPS mostraron mayor TNF- α que todos los demás grupos ($p < 0.05$), mayor IL-1 β ($p < 0.01$ frente a solución salina acuosa y frente a solución salina BGOS, $p < 0.05$ frente a LPS BGOS) e IL-6 superior ($p < 0.05$ frente a solución salina acuosa). Por lo tanto, los niveles de citoquinas para los animales alimentados con BGOS, que recibieron inyección de solución salina o LPS, fueron ambos similares a los de sus contrapartes de agua solución salina de control.

40 En el plasma, el LPS indujo cambios significativos en el agua, pero no en BGOS, en animales (Fig. 10) para TNF- α , sin embargo, no hubo una diferencia estadística general entre los grupos para IL-6 e IL-10, así como para IL-1 β , aunque para este último, el LPS indujo un aumento no significativo de 2 veces en animales de agua en comparación con la solución salina.

Discusión

45 El estudio actual probó la influencia de la ingesta de prebióticos (BGOS) en el comportamiento de la enfermedad inducida por LPS, la ansiedad y la expresión de citoquinas en ratones, y se basó en la suposición de que BGOS (Bimuno) afecta la función cerebral a través del sistema inmunológico. Nuestros dos hallazgos clave fueron: 1) Los ratones alimentados con BGOS no manifestaron déficit de actividad locomotora (LMA) y ansiedad después de una única inyección de LPS, en comparación con los controles; y 2) la expresión inducida por LPS de mediadores proinflamatorios en el plasma (factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) (CCL2); monoquina inducida por IFN γ , quimiocina (motivo C-X-C) ligando 9 (MIG) y el cerebro (TNFa) fueron suprimidos por la ingestión de BGOS. En general, nuestros datos respaldan las nociones actuales de que BGOS (Bimuno) desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud cerebral y que una modificación en la respuesta a los desafíos inmunitarios puede sustentar esta acción.

Ejemplo 6

Efecto de BGOS en el rendimiento cognitivo en ratas sanas

Materiales y métodos

5 A las ratas Sprague Dawley normales se les dio agua o una solución prebiótica de mezcla de 1.3% p/v de BGOS durante 3 semanas y luego se probó en la tarea de cambio de atención (ASST) (ver Bissonette, G.B. et al.; Behavioral Brain Research; (2013); 250; 91-101) utilizando protocolos estándar.

Resultados

10 La Figura 11 muestra que las ratas a las que se les administró BGOS durante 3 semanas mostraron un mejor desempeño en el componente extradimensional (ED) de la ASST que es una medida de aprendizaje flexible. Ejecución del elemento ED tan fácilmente como la fase intra-dimensional (desplazamiento ID/ED) es indicativo de un aumento de la flexibilidad cognitiva, un parámetro que se ve afectado en los ancianos. En la Figura 11 # $p < 0.05$ en comparación con la ID de control y * $p < 0.05$ en comparación con la ED de control.

Conclusión

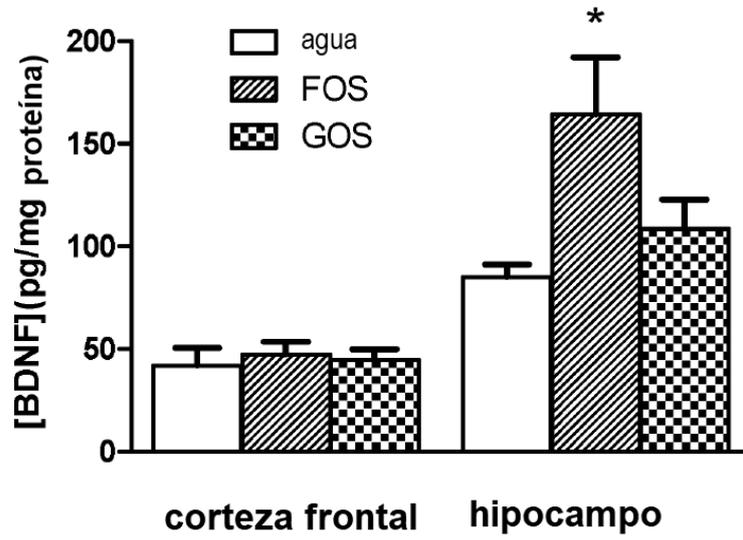
15 Las ratas que recibieron BGOS mostraron un mejor rendimiento cognitivo en una tarea dependiente de la corteza prefrontal medial, que a menudo se ve afectada por trastornos psiquiátricos y envejecimiento.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de galactooligosacáridos que comprende disacáridos Gal (β 1-3)-Glc; Gal (β 1-3)-Gal; Gal (β 1-6)-Gal; Gal (α 1-6)-Gal; trisacáridos Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc; Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc; tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc y pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc para uso en la prevención o
5 tratamiento de alteraciones emocionales en trastornos depresivos o trastornos de ansiedad.
2. La composición de la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que está en forma de un polvo, una tableta, una cápsula, una formulación líquida tal como un jarabe o una pastilla blanda.
3. La composición de la reivindicación 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cuando está en forma de polvo, comprende de 1.35 a 9.6 g de galactooligosacáridos en 1.65 g a 20 g de la composición en polvo,
10 preferiblemente de 1.96 g a 4.9 g de galactooligosacáridos en 2.5 g a 10 g del polvo, lo más preferiblemente de 2.7 g a 2.75 g de galactooligosacáridos en 3.0 g a 5.5 g del polvo.
4. La composición de la reivindicación 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cuando está en forma de jarabe comprende de 1.35 g a 9.6 g de galactooligosacáridos en 2.1 g a 25.29 g de la composición de jarabe,
15 preferiblemente de 1.96 g a 4.9 g de galactooligosacáridos en 3.0 g a 12.9 g del jarabe, lo más preferiblemente 2.7 g a 2.75 g de galactooligosacáridos en 4.1 g a 7.25 g del jarabe.

Figura 1

A



B

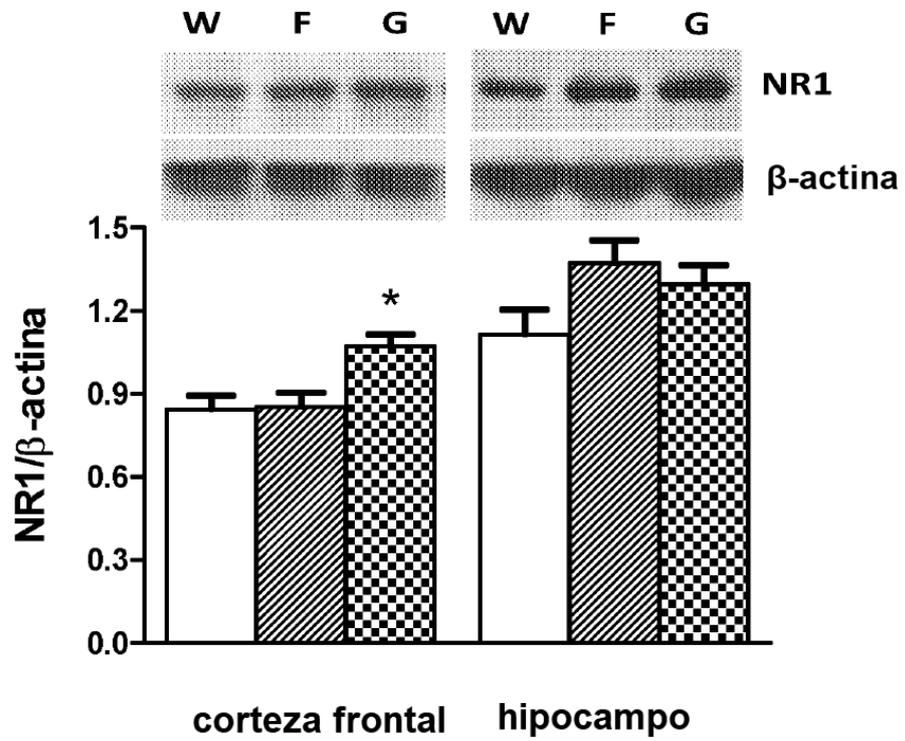


Figura 2

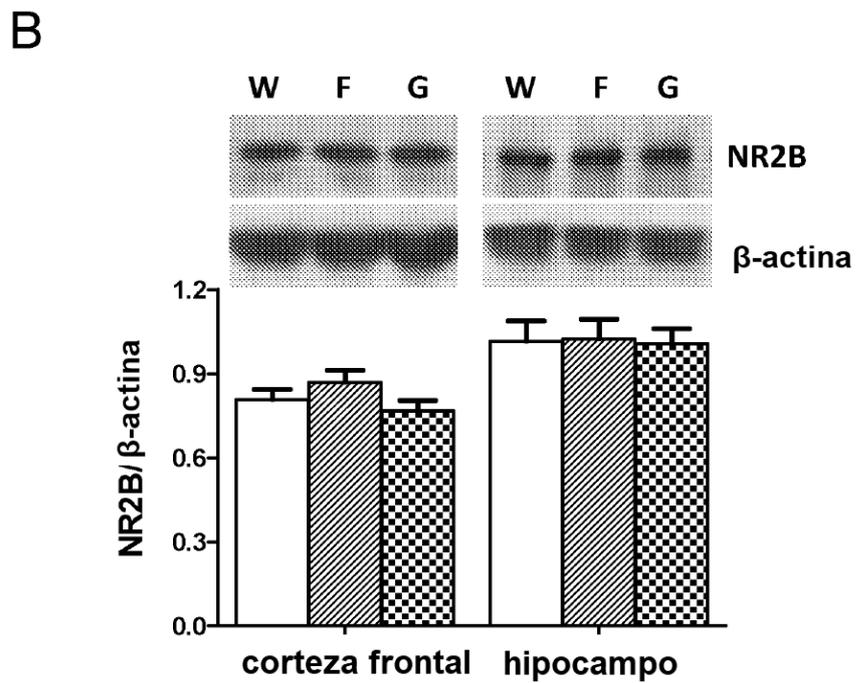
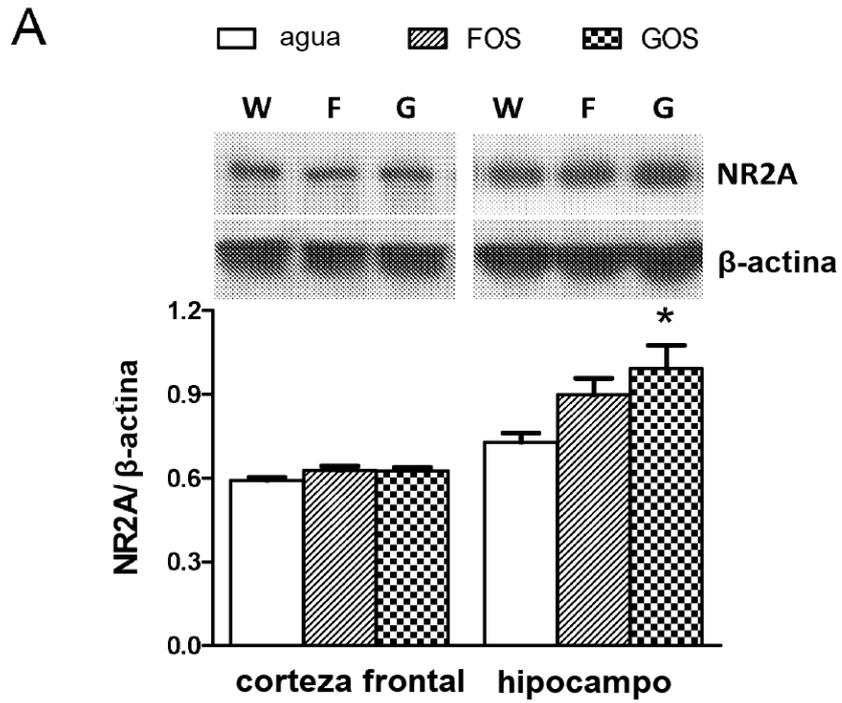


Figura 3

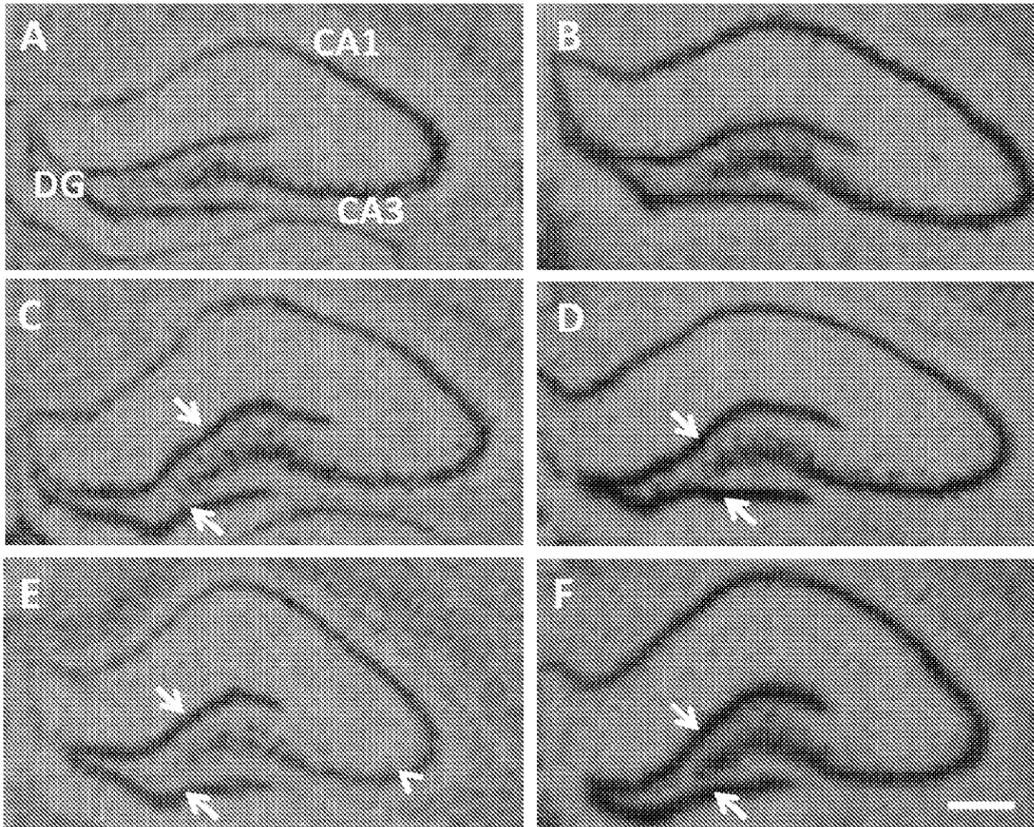


Figura 4

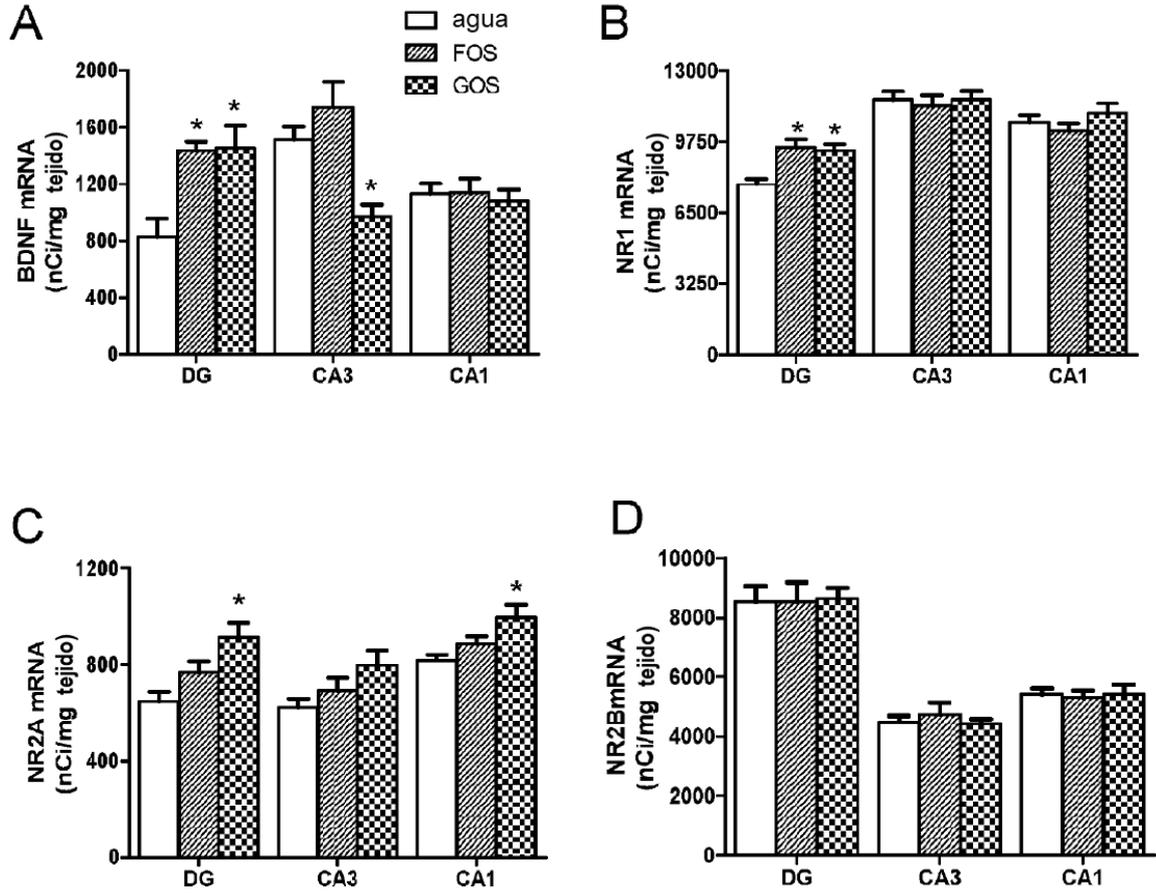
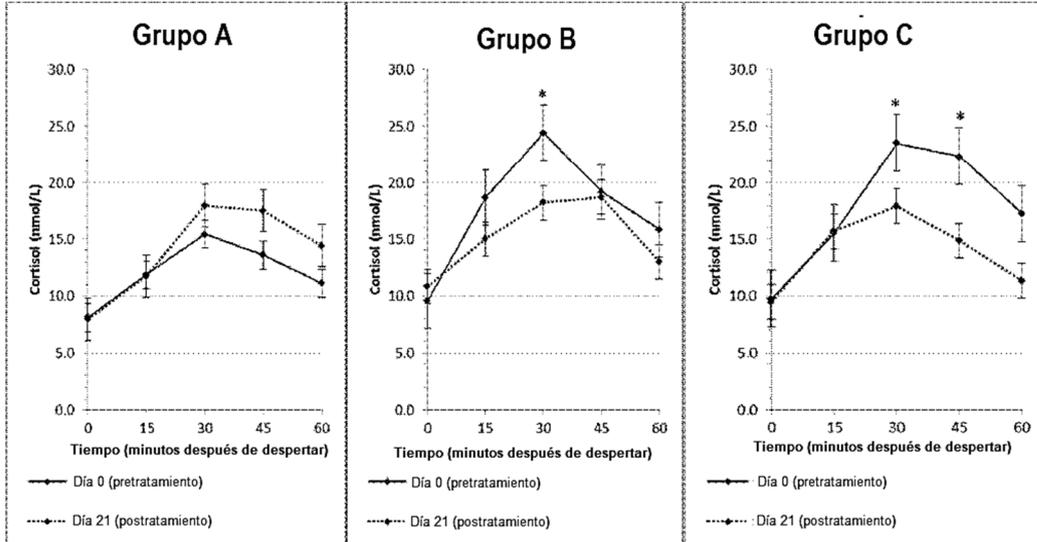


Figura 5:



*las diferencias entre el día 0 y el día 21 son significativas en $p=0.05$ (para tiempo 30, grupos B y C), en tendencia en $p=0.1$ (tiempo 45, grupo C)

Figura 6

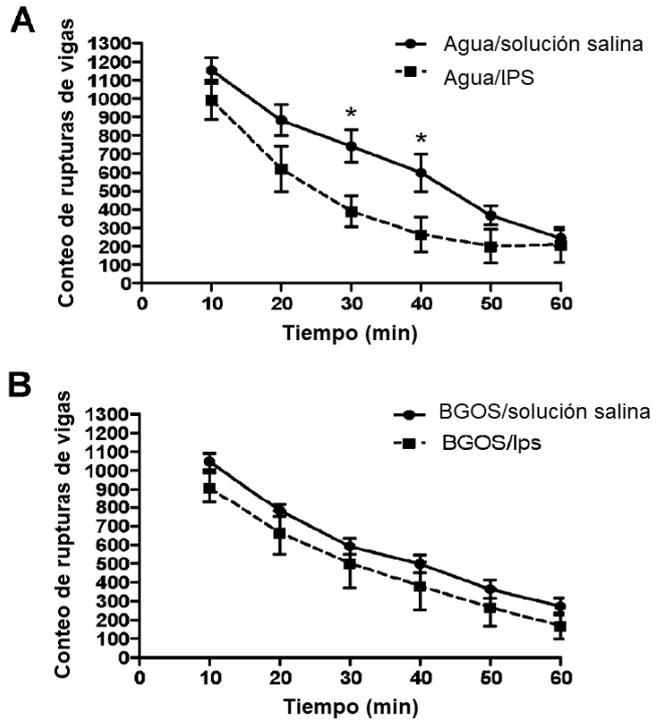


Figura 7

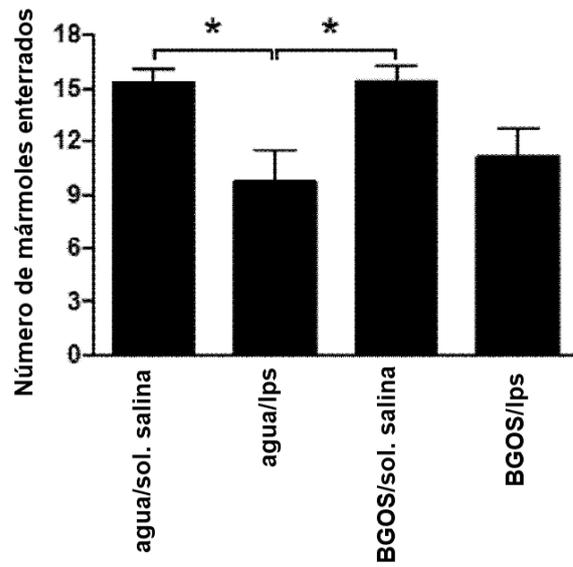


Figura 8

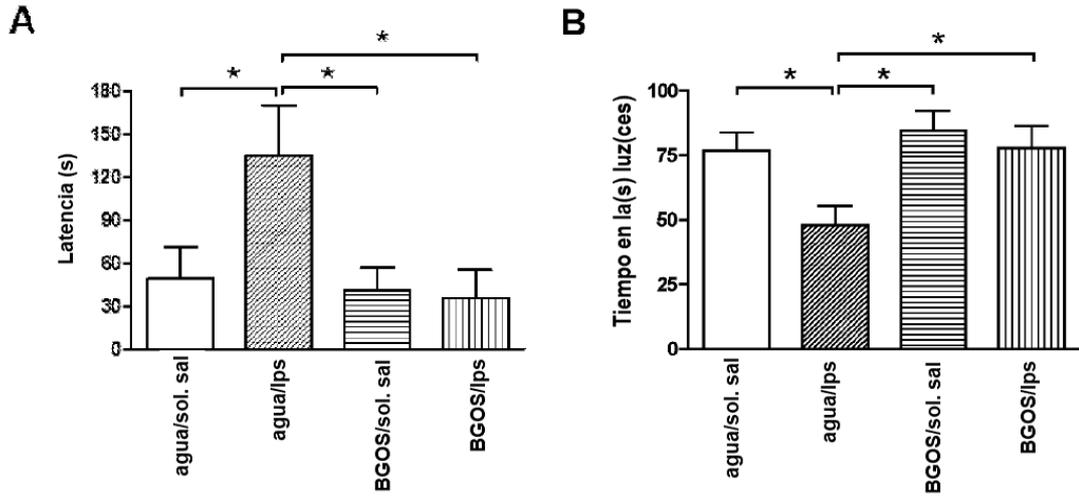


Figura 9

Frontal Cortex:

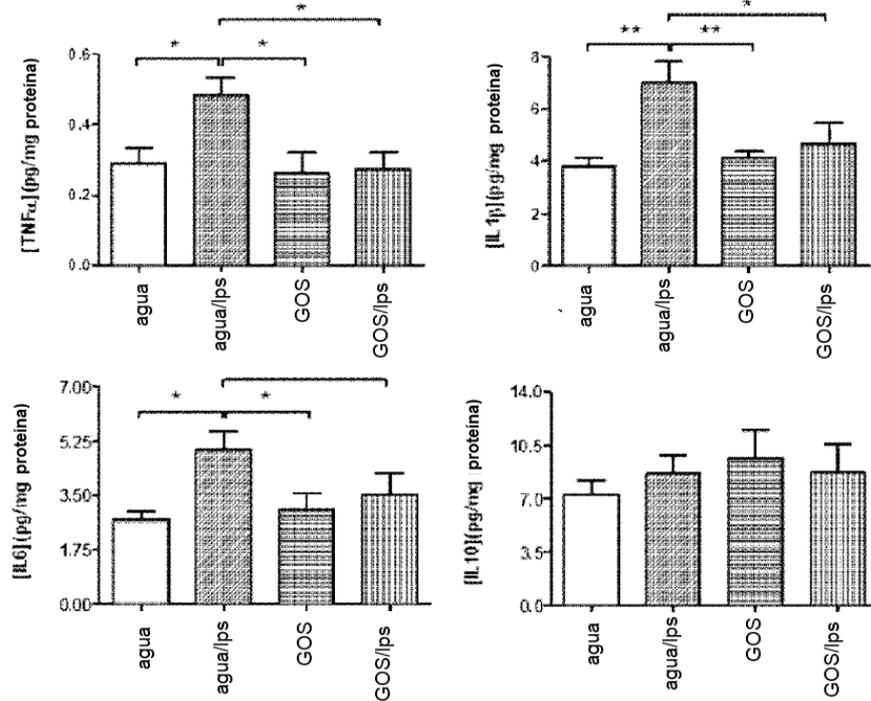


Figura 10

Plasma:

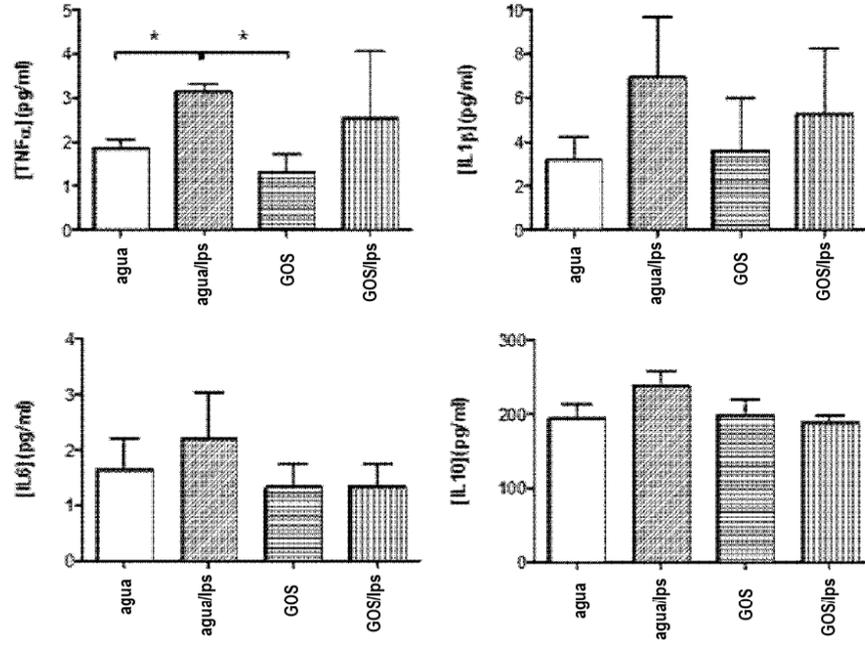


Figura 11

