

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.06.02	(73) Titular(es): BIOSEARCH S.A.
(30) Prioridade(s): 2007.05.31 EP 07380158	CAMINO DE PURCHIL 66 18004 GRANADA ES
(43) Data de publicação do pedido: 2010.03.17	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.09 004/2016	ROCÍO MARTÍN JIMÉNEZ ES
	MÓNICA OLIVARES MARTÍN ES
	ESTHER ANTONIA JIMÉNEZ QUINTANA ES
	SALETA SIERRA ÁVILA ES
	MARÍA LUISA MARÍN MARTÍNEZ ES
	(74) Mandatário:
	ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA
	AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MICROORGANISMOS DO LEITE DE MAMÍFEROS, COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS E SEU USO PARA O TRATAMENTO DE MASTITE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UMA ABORDAGEM INOVADORA PARA PREVENIR OU TRATAR MASTITE TANTO EM HUMANOS COMO EM ANIMAIS ATRAVÉS DO USO DE MICROORGANISMOS DERIVADOS DO LEITE DE MAMÍFEROS OBTIDOS A PARTIR DE HOSPEDEIROS SAUDÁVEIS DAS ESPÉCIES HOMÓLOGAS; ÀQUELES NOVOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS OBTIDOS A PARTIR DO LEITE CAPAZES DE REDUZIR MASTITE INFECIOSA E AO MÉTODO DE TRIAGEM USADO PARA SUA OBTENÇÃO; AO USO DESSAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS PARA A PROFILAXIA OU TRATAMENTO CONTRA MASTITE E OUTRAS DOENÇAS; E, POR FIM, A COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ESSES COMPOSTOS.

RESUMO

"MICRORGANISMOS DO LEITE DE MAMÍFEROS, COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS E SEU USO PARA O TRATAMENTO DE MASTITE"

A presente invenção refere-se a uma abordagem inovadora para prevenir ou tratar mastite tanto em humanos como em animais através do uso de microrganismos derivados do leite de mamíferos obtidos a partir de hospedeiros saudáveis das espécies homólogas; àqueles novos microrganismos probióticos obtidos a partir do leite capazes de reduzir mastite infecciosa e ao método de triagem usado para sua obtenção; ao uso dessas bactérias probióticas para a profilaxia ou tratamento contra mastite e outras doenças; e, por fim, a composições compreendendo esses compostos.

DESCRIÇÃO

"MICRORGANISMOS DO LEITE DE MAMÍFEROS, COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS E SEU USO PARA O TRATAMENTO DE MASTITE"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma abordagem inovadora para prevenir ou tratar mastite tanto em humanos como animais através do uso de microrganismos derivados do leite de mamíferos obtidos a partir de hospedeiros saudáveis das espécies homólogas; a esses novos microrganismos probióticos obtidos a partir de leite capazes de reduzir mastite infecciosa; ao uso dessas bactérias probióticas para a profilaxia ou tratamento contra mastite e outras doenças; e, por fim, a composições que compreendem esses compostos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Mastite é uma inflamação e infecção da glândula mamária que são particularmente frequentes em mulheres e outras fêmeas de mamíferos durante a lactação. Mastite é principalmente causada por seleção e crescimento excessivo de estafilococos e/ou estreptococos nos ductos mamários e glândulas areolares mamárias. Mastite humana afeta até 30% de mulheres lactantes e geralmente resulta num desmame precoce e indesejado, pois é uma condição muito dolorosa.

Ademais, mastite não é uma patologia específica de humanos, porém afeta todas as espécies de mamíferos. Nesse sentido, mastite infecciosa está em espécies e raças de animais criadas para a produção de leite, como vacas, ovelhas e cabras, é um problema económico importante visto que o leite produzido

durante o processo infeccioso deve ser descartado devido às altas contagens bacterianas e de células somáticas. Ademais, a mastite pode ser um problema importante naquelas espécies e raças domésticas (porcos, coelhos...) (por exemplo, bovino para a produção de carne) não dedicadas à produção de leite visto que um suprimento de leite reduzido de baixa qualidade bacteriológica pode aumentar significativamente as taxas de morbidez e mortalidade entre a prole.

Nesses casos, a terapia à base de antibióticos surgiu como a única opção terapêutica. Entretanto, antibióticos de amplo espectro ou alvejados Gram positivos atuais são insatisfatoriamente eficazes para as estirpes estafilocócicas e estreptocócicas que causam mastite e, de facto, tais tratamentos podem ser em algumas circunstâncias, prejudiciais, pois os mesmos geralmente eliminam a flora comensal que caracteriza o leite de mamíferos, isso poderia exercer alguns efeitos protetores. Ademais, a terapia com antibióticos pode resultar no aparecimento de resíduos de antibiótico no leite, o que também é prejudicial se ocorrer durante o período de lactação. Alternativamente, GM-CSF bovino recombinante também foi usado para o tratamento de mastites subclínicas causadas por *S.aureus* (Takahashi, H. et al. 2004, Cad.J.Vet.Res. 68:182 a 187), porém não se revelou eficiente no tratamento de infecção por *S.aureus* em estágio tardio.

Uma abordagem alternativa para o tratamento de mastite é o uso de probióticos. Por exemplo, Sytnik, S.I. et al. (Vrach Delo., 1990, 3:98 a 100) tentaram utilizar *Bifidobacterium* para prevenir mastite, porém não observaram qualquer inibição no tempo de permanência da microflora da mama. Greene, W.A. et al. (J.Dairy Sci., 1991, 74:2976 a 2981)

descreveram o uso de uma preparação de lactobacilo comercial para o tratamento de contagem de células somáticas elevada (SSC) quando administrada por injeção intramamária direta, porém concluem que o produto de Lactobacilo usado no ensaio não era eficaz como um tratamento intramamário de mastite subclínica baseado em SCC. A patente US 4591499 descreve um método para tratar mastite utilizando uma injeção intramamária de uma emulsão de óleo em água contendo uma estirpe de lactobacilo não patogénica ou uma mistura de estirpes. Entretanto, as estirpes descritas nesse documento parecem atuar por meio de uma redução não específica no pH na glândula mamária e, devido à sua formulação particular como emulsões, precisam de ser administradas por injeção intramamária direta. A patente russa RU2134583 descreve o uso de uma composição tópica contendo lactobacterina (massa de micróbios de lactobactérias que foram liofilizadas vivas/secas em meio de cultura) ou bifidumbacterina (uma biopreparação liofilizada imobilizada em carvão ativado especial) para o tratamento de disseminação de micróbios massiva de leite materno. Entretanto, essa preparação é somente adequada para administração tópica e forma parte de um tratamento de múltiplas etapas que inclui massagem de relaxamento e aplicação de uma suspensão de organismos derivados da microflora normal do intestino adicionalmente contendo um meio de formação de filme protetor. O pedido de patente internacional W005/34970 descreve o tratamento de mastite por injeção intramamária direta de uma estirpe de *Lactococcus lactis*.

Heikkilä et al. (J Applied Microbiol, 2003, 95:471 a 478) descreve que bactérias do ácido láctico como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus lactis*, e *Leuconoctoc mesenteroides* inibem o crescimento de

Staphylococcus aureus, que é conhecido por causar infecções de seio materno. Entretanto, esse documento não descreve a possível via de administração para o uso terapêutico dessas estirpes.

Há inúmeras abordagens para obter probióticos com a capacidade de serem transferidos para o leite materno. O pedido internacional W005/117532 descreve um método para selecionar uma estirpe bacteriana de ácido láctico para administração oral a uma mulher para melhorar o leite materno da mulher, compreendendo selecionar uma estirpe de *Lactobacilo* que aumenta o nível de IL-10 anti-inflamatória e reduz o nível de TGF- β 2 em leite materno, desse modo, reduzindo o risco de a mãe lactante desenvolver mastite. Entretanto, a estirpe de ácido láctico não se revela ter um efeito antibacteriano sobre estafilococos e/ou estreptococos. O pedido internacional W004/003235 descreve um método para a seleção de estirpes microbianas probióticas de leite materno e/ou fluido amniótico com a capacidade de serem transferidas para o leite materno e/ou órgãos internos exceto as mucosas. Essas estirpes microbianas probióticas têm propriedades antibacterianas contra bactérias patogênicas, inclusive *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* (Olivares et al., J Applied Microbiol, 2006, 101:72 a 79, Martin R et al., J Hum Lact, 2005, 21(1):8 a 17).

Adicionalmente, probióticos vêm sendo usados para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. O pedido internacional W097/461104 descreve o tratamento de diarreia induzida por rotavírus por administração oral de *Lactobacillus reuteri*. O pedido europeu EP 0577904 descreve uma estirpe *Bifidobacterium* para a produção de alimentos ou

produtos farmacêuticos para tratar distúrbios gastrointestinais. Entretanto, essa estirpe não revela a transferência para a glândula mamária após a ingestão oral. Kaur et al. (Eur J Pharm Sci, 2002, 15:1 a 9) descrevem probióticos de estirpes *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* como suplementos alimentares que podem ser usados terapêuticamente para prevenir diarreia, aumentar a tolerância à lactose, modular a imunidade, que afeta de forma benéfica o hospedeiro ao aprimorar o seu equilíbrio microbiano intestinal, e que também podem ter potencial para prevenir cancro e reduzir os níveis de colesterol séricos.

Portanto, há um desejo na técnica de abordagens adicionais para permitir a prevenção e tratamento de mastites e outras patologias das glândulas mamárias, em mulheres e em outras fêmeas de mamíferos, que possam ser mais facilmente aplicadas e por meios menos invasivos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na constatação inesperada e surpreendente que o leite de mamíferos contém estirpes probióticas que são capazes de serem transferidas para a glândula mamária após sua ingestão oral, e exercem um efeito terapêutico localmente contra os patógenos que causam mastite, ajudando assim a reduzir a incidência de mastite. Ademais, essas estirpes têm inúmeras vantagens inesperadas adicionais que as tornam úteis para o tratamento de outras doenças. A presente invenção é vantajosa em relação aos métodos conhecidos na técnica em vista das propriedades valiosas que a lactação pode fornecer, e devido ao interesse económico de produtividade de leite para os camponeses.

Um processo para a seleção de probióticos é revelado compreendendo as etapas de:

(i) isolar as bactérias de ácido láctico ou estirpes de bifidobactérias presentes no leite fresco de uma espécie de mamífero por seleção em meio de cultura de ácido láctico,

(ii) selecionar aquelas estirpes da etapa (i) que são capazes de serem transferidas para a glândula mamária após a ingestão oral

e/ou colonizar a glândula mamária após sua aplicação tópica,

(iii) selecionar aquelas estirpes da etapa (ii) que são capazes de reduzir as taxas de sobrevivência e/ou as taxas de adesão a células epiteliais de *Staphylococcus aureus* e

(iv) selecionar aquelas estirpes da etapa (iii) que são capazes de proteger animais contra mastite.

Em um aspeto, a invenção fornece estirpes probióticas selecionadas a partir do grupo de *Bifidobacterium breve* depositada na CECT sob N° de Acesso 7263, *Bifidobacterium breve* depositada na CECT sob N° de Acesso 7264, *Lactobacillus reuteri* depositado na CECT sob N° de Acesso 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado na CECT sob N° de Acesso 7262, *Lactobacillus fermentum* na CECT sob N° de Acesso 7265 e *Lactobacillus reuteri* depositado na CECT sob N° de Acesso 7266.

Em um aspeto adicional, a invenção fornece uma composição, um produto farmacêutico, um alimento ou um produto nutricional compreendendo pelo menos uma estirpe probiótica da invenção.

Em outro aspeto, a invenção fornece o uso das estirpes probióticas da invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de uma infeção ou infestação crónica ou aguda, ou de uma colonização microbiana indesejada, em que a infeção, infestação ou colonização é causada por parasitas, bactérias, levedura, fungos ou vírus, afetando qualquer superfície do corpo ou mucosa num indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

Em um aspeto adicional, a invenção fornece o uso de uma estirpe probiótica ou de uma mistura de estirpes probióticas da invenção ou do sobrenadante de cultura para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de reações de hipersensibilidade à intolerância alimentar e metabólica; de constipação e outros distúrbios gastrointestinais; de distúrbios inflamatórios ou autoimunes selecionados a partir do grupo de IBD, colite ulcerativa, artrite, aterosclerose, esclerose múltipla, psoríase ou sarcoidose; e de crescimento de tumores, metástase e cancro num indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

Em um aspeto adicional, a invenção fornece o uso de uma estirpe probiótica ou de uma mistura de estirpes probióticas da invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de distúrbios alérgicos e asma num indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

Em um aspeto adicional, a invenção fornece o uso de uma estirpe probiótica ou de uma mistura de estirpes probióticas da invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de níveis de imunidade temporalmente reduzidos em indivíduos ou animais submetidos a *stress* fisiológico e derivado de gerenciamento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 fornece as sequências das sequências de 16S rRNA das bactérias de estirpes probióticas descritas no presente documento, inclusive aquelas dessa invenção e seu perfil de PCR-RAPD.

A Figura 2 é um gráfico de barras que mostra a capacidade de transferência para a glândula mamária e a colonização intestinal pelas estirpes descritas no presente documento, inclusive aquelas da presente invenção em camundongos. O número de lactobacilos (barras cinzas), bifidobactérias (barras pretas) e enterococos (barras brancas) em amostras de leite e fecais expressas em camundongos lactantes suplementados diariamente durante 14 dias com 10^8 cfu das estirpes geneticamente marcadas foi analisado por plaqueamento de colônias bacterianas. As amostras de leite e fecais foram recolhidas no dia 0, 5 e 10 de suplementação probiótica. As colônias PCR-positivas em leite são indicadas como %.

A Figura 3 é um gráfico de barras que mostra a inibição da sobrevivência estafilocócica e adesão produzida após a co-cultura dos estafilococos com as estirpes descritas no presente documento, inclusive aquelas dessa invenção. A) O efeito inibidor desses probióticos sobre a sobrevivência de *Staphylococcus aureus* foi analisado *in vitro* por um ensaio de difusão em poços de ágar em placas de TSA. O diâmetro do halo de inibição (em milímetros) causado pelos sobrenadantes bacterianos determina o efeito antimicrobiano. B) A adesão da estirpe patogénica *Staphylococcus aureus* a células Caco-2 foi analisada na presença das estirpes probióticas dessa invenção. Dez campos aleatorizados foram contados e os

resultados expressos como a média da % de bactérias gram-negativas aderidas ligadas às células comparados com o número de bactérias patogénicas aderidas na ausência de probióticos.

A Figura 4 é um gráfico de barras que mostra a proteção contra mastite estafilocócica. Mastite foi induzida em camundongos lactantes 10 dias após o parto por injeção de 10^6 cfu de *S. aureus* no quarto par mamário. A carga estafilocócica no leite expresso (A) e na pontuação mamária inflamatória (B) foi avaliada após 5 e 10 dias de infeção.

A Figura 5 é um gráfico de barras que mostra a adesão de estirpes probióticas a células intestinais. A adesão das estirpes probióticas descritas no presente documento, inclusive aquelas dessa invenção foi analisada utilizando Caco-2 (barras cinzas) ou linhagens de células intestinais HT-29 (barras pretas) intestinal. Vinte campos aleatorizados foram contados e os resultados expressos como a média do número de bactérias ligadas às células por campo $\pm$ SD.

A Figura 6 é um gráfico de barras que mostra a sobrevivência de estirpes probióticas a condições semelhantes à digestão. A resistência das estirpes probióticas descritas no presente documento, inclusive aquelas dessa invenção, a teor de ácido (barras cinzas) e alto teor de sal biliar (barras pretas) foi analisada *in vitro* por cultura das bactérias em MRS pH 3,0 ou 0,15% de sais biliares durante 90 minutos. Os resultados são representados como a média $\pm$ SD de três experimentos independentes.

A Figura 7 mostra o efeito das estirpes probióticas sobre um modelo de infeção por *Salmonella* oralmente induzida. A) O

gráfico de barras que mostra o efeito de tratamento probiótico na inibição de translocação de *Salmonella* para o baço. O número de colônias de *Salmonella* foi medido nos baços de camundongos tratados com os probióticos, com (barras cinzas) ou sem vacinação (barras pretas) com 10^8 cfu de *Salmonella* inativada, após 24 horas de um desafio oral com 10^{10} cfu de *Salmonella*. B) As curvas de sobrevivência dos animais após a infecção por *Salmonella*.

A Figura 8 é um gráfico de barras que mostra o efeito de estirpes probióticas sobre a expressão de citocina e imunoglobulina G. A produção de citocina TNF- α (A) e IL-10 (B) foi analisada em macrófagos derivados de medula óssea estimulados com LPS e a estirpe probiótica indicada durante 12 horas enquanto a expressão de IgG (C) foi analisada em linfócitos obtidos a partir do baço de camundongos Balb/c (6 a 8 semanas de idade) estimulados com LPS e a estirpe probiótica indicada durante 6 dias. Tanto a produção de citocina quanto de IgG foram detetadas por ELISA.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção fornece um novo método para o tratamento profilático e terapêutico de mastite infecciosa tanto em mulheres como em outras fêmeas de mamíferos em necessidade do mesmo. O método baseia-se no uso de estirpes probióticas específicas como revelado na reivindicação 1, especialmente selecionadas para aquela aplicação particular.

Um processo para a seleção de probióticos é revelado, compreendendo as etapas de:

(i) isolar as bactérias de ácido láctico ou estirpes de bifidobactérias presentes no leite fresco de uma espécie de mamífero por seleção em meio de cultura de ácido láctico,

(ii) selecionar aquelas estirpes da etapa (i) que são capazes de serem transferidas para a glândula mamária após a ingestão oral e/ou colonizar a glândula mamária após sua aplicação tópica,

(iii) selecionar aquelas estirpes da etapa (ii) que são capazes de reduzir as taxas de sobrevivência e/ou as taxas de adesão a células epiteliais de *Staphylococcus aureus* e

(iv) selecionar aquelas estirpes da etapa (iii) que são capazes de proteger animais contra mastite.

Na etapa (i), qualquer leite obtido a partir de um organismo de mamífero pode ser usado como material de partida para o processo acima. Prefere-se que o leite usado seja leite de humano, bovino, suíno, ovelha, gato ou cão. Ademais, qualquer meio de cultura de ácido láctico conhecido na técnica pode ser usado para selecionar as estirpes. De preferência, o meio de cultura de ácido láctico é selecionado a partir de meio MRS, meio APT, meio RCM, meio LM17, meio GM17 e meio Elliker. Com mais preferência, o meio de cultura de ácido láctico é meio MRS.

Na etapa (ii), as estirpes isoladas na etapa (i) são selecionadas com base na sua capacidade de serem transferidas para a glândula mamária após a ingestão oral e/ou colonizarem a glândula mamária após a aplicação tópica. Para detetar a capacidade de serem transferidas para a glândula mamária, um ensaio como descrito em WO2004003235 para detetar a

transferência de um microrganismo para o leite após a ingestão oral pode ser usado.

Na etapa (iii), qualquer ensaio conhecido na técnica para medir as taxas de sobrevivência de *Staphylococcus* e para medir as taxas de adesão de *S.aureus* a células epiteliais pode ser usado. Prefere-se que o efeito dos probióticos nas taxas de adesão seja medido utilizando uma cultura confluenta de uma linhagem de células intestinais à qual as células de *S.aureus* e os probióticos da invenção são adicionados e o número de células de *S.aureus* ligadas é medido por qualquer técnica adequada. Tipicamente, a linhagem de células intestinais é Caco-2 e o número de células ligadas é medido por inspeção direta das monocamadas de células sob microscopia de luz. Ademais, a etapa de seleção (iii) também pode ou alternativamente envolve medir a viabilidade de *S.aureus* na presença das estirpes probióticas. Qualquer ensaio adequado para medir a inibição de crescimento de estirpes bacterianas pode ser usado. Tipicamente, a avaliação de viabilidade de *S.aureus* é realizada por um ensaio de difusão em poços de ágar.

Na etapa (iv), qualquer ensaio para medir a proteção de mastite pode ser usado. De preferência, o ensaio envolve o uso de um modelo animal de mastite em que pelo menos um dos patógenos conhecidos como o agente causador de mastite é injetado na glândula mamária. Com mais preferência, o modelo animal é um camundongo e o patógeno que precisa de ser administrado para causar mastite é *S.aureus*.

Em um aspeto, a invenção fornece uma estirpe probiótica selecionada a partir do grupo de *Bifidobacterium breve* depositado na CECT sob N° de Acesso 7263, *Bifidobacterium breve* depositado na CECT sob N° de Acesso 7264, *Lactobacillus*

reuteri depositado na CECT sob N° de Acesso 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado na CECT sob N° de Acesso 7262, *Lactobacillus fermentum* na CECT sob N° de Acesso 7265 e *Lactobacillus reuteri* depositado na CECT sob N° de Acesso 7266.

Um sobrenadante de uma cultura de uma ou mais estirpes de acordo com a invenção é adicionalmente revelada. O sobrenadante pode ser obtido a partir da cultura por qualquer meio disponível para o elemento versado na técnica, inclusive centrifugação, filtração, flotação e similares.

Em um aspeto adicional, a invenção fornece uma estirpe probiótica ou uma mistura de estirpes probióticas de acordo com a invenção para uso como um medicamento. Um sobrenadante de uma cultura de uma ou mais estirpes de acordo com a invenção para uso como um medicamento também é revelado.

Em outro aspeto, a invenção fornece uma composição que compreende pelo menos uma das estirpes bacterianas da invenção. De preferência, a composição compreende pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5 ou pelo menos 6 das estirpes da invenção, e em que cada uma das estirpes é representada na composição numa proporção a partir de 0,1% a 99,9%, de preferência, a partir de 1% a 99%, com mais preferência, a partir de 10% a 90%. Em outra modalidade, a composição compreende qualquer uma das estirpes bacterianas da invenção juntamente com outra estirpe ou mistura de estirpes e em que cada uma das estirpes é representada na composição numa proporção a partir de 0,1% a 99,9%, de preferência, a partir de 1% a 99%, com mais preferência, a partir de 10% a 90%. Uma composição que compreende um sobrenadante de uma cultura de uma ou mais estirpes de acordo

com a invenção também é descrita. De preferência, o sobrenadante é representado na composição numa proporção a partir de 0,1% a 99,9%, com mais preferência, a partir de 1% a 99% e, com ainda mais preferência, a partir de 10% a 90%.

Em outro aspeto, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma estirpe ou uma composição da invenção. A preparação farmacêutica pode assumir a forma de comprimidos, cápsulas, suspensões bacterianas líquidas, suplementos orais secos, suplementos orais húmidos, alimentação seca por sonda ou alimentação húmida por sonda. De preferência, o probiótico, a composição contendo probiótico ou contendo sobrenadante e o produto farmacêutico é dirigida para a superfície mucosa oral, gástrica e/ou intestinal; entretanto, a mesma poderia ser dirigida para a mucosa nasofaríngea, respiratória, reprodutiva ou glandular, e/ou para a glândula mamária e poderia ser administrada a mulheres e animais por uma via oral, nasal, ocular, retal, tópica e/ou vaginal.

Em outro aspeto, a invenção fornece uma alimentação ou um produto nutricional que compreende pelo menos uma estirpe probiótica de acordo com a invenção. Uma alimentação ou um produto nutricional que compreende pelo menos um sobrenadante de uma cultura de uma ou mais estirpes de acordo com a invenção também é revelada. Exemplos não limitativos de géneros alimentícios adequados que podem ser usados na presente invenção são leite, iogurte, queijo, coalhada, leites fermentados, produtos fermentados à base de leite, produtos fermentados à base de cereais, produtos fermentados de carne, outros pós à base de leite ou à base de cereal, fórmula de nutrição clínica, gelados, sumos, pão, bolos ou

doces, formulações de ração animal, formulações de dieta parcialmente sintéticas ou sintéticas, fórmulas para lactentes, fórmulas de nutrição clínica, granizados, farinhas, pão, bolos, doces ou pastilhas elásticas.

A quantidade de dosagem exigida das estirpes probióticas na composição, composição alimentícia ou farmacêutica descrita anteriormente irá variar de acordo com a natureza do distúrbio ou o uso proposto da composição, se usada de maneira profilática ou terapêutica e o tipo de organismo envolvido.

Qualquer dosagem adequada dos probióticos ou combinações dos mesmos pode ser usada na presente invenção desde que os efeitos tóxicos não excedam os efeitos terapêuticos. A eficácia terapêutica e toxicidade podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão com animais experimentais, como ao calcular a estatística de ED, (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população) ou LD (a dose letal para 50% da população). A razão de dose de efeitos tóxicos para terapêuticos no índice terapêutico, que podem ser expressos como a razão LD/ED. Entretanto, a atividade dos novos microrganismos no indivíduo é naturalmente dependente de dose. Isto é, quanto mais os microrganismos inovadores são incorporados por meio de ingestão ou administração do material alimentício ou composição farmacêutica acima, maior será a atividade protetora e/ou terapêutica dos microrganismos. Visto que os microrganismos dessa invenção não são prejudiciais para a espécie humana e animais e foram eventualmente isolados do leite materno humano saudável, uma alta quantidade dos mesmos pode ser incorporada de modo que essencialmente uma alta proporção da mucosa do indivíduo será colonizada pelos microrganismos

inovadores. As composições que exibem grandes índices terapêuticos são preferidas. Os dados obtidos a partir de estudos de animais são usados para formular uma faixa de dosagem para uso humano ou animal. A dosagem contida em tais composições está preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que inclui a ED, com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem varia dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada, da sensibilidade do paciente, e da via de administração. A dosagem exata será determinada pelo profissional, devido a fatores relacionados ao indivíduo que exigem tratamento. Por exemplo, para preparar uma composição alimentícia de acordo com a presente invenção, pelo menos uma das estirpes probióticas da presente invenção é incorporada num suporte adequado, numa quantidade de 10^5 cfu/g a cerca de 10^{12} cfu/g de material de suporte, de preferência, a partir de cerca de 10^6 cfu/g a cerca de 10^{11} cfu/g de material de suporte, com mais preferência, a partir de cerca de 10^6 cfu/g a cerca de 10^{10} cfu/g de material de suporte.

No caso de uma composição farmacêutica, a dosagem da estirpe probiótica deve ser a partir de cerca de 10^5 cfu/g a cerca de 10^{14} cfu/g de material de suporte, de preferência, a partir de cerca de 10^6 cfu/g a cerca de 10^{13} cfu/g de material de suporte, com mais preferência, a partir de cerca de 10^7 cfu/g a cerca de 10^{12} cfu/g de material de suporte. Para o propósito da presente invenção, a abreviação cfu deve designar uma "unidade formadora de colónias" que é definida como o número de células bacterianas como revelado por contagens microbiológicas em placas de ágar.

A dosagem e administração são ajustadas para fornecer níveis suficientes da porção ativa ou para manter o efeito desejado.

Os fatores que podem ser levados em consideração incluem a gravidade do estado de doença, a saúde geral do indivíduo, a idade, peso, e gênero do indivíduo, tempo e frequência de administração, combinação(ões) de fármaco, sensibilidades à reação, e resposta à terapia. As composições de longa ação podem ser administradas a cada 3 a 4 dias, a cada semana, ou quinzenalmente na taxa de meia-vida e depuração da formulação particular.

Em uma modalidade preferida, a invenção também se refere a composições das estirpes dessa invenção numa forma liofilizada, seca por congelamento ou seca, que podem ser obtidas por qualquer método convencional conhecido na técnica.

Uma composição, produto farmacêutico, produto alimentício ou nutricional em que a estirpe probiótica ou a mistura da mesma está numa forma parcial ou totalmente inativada também é revelado.

Muitas pessoas têm uma microflora intestinal perturbada, isto é, o equilíbrio entre bactérias intestinais úteis e prejudiciais é perturbado. Inúmeros fatores, entre outros, stress, a presença de sais biliares, e especialmente dieta, influência da flora bacteriana. Nessas situações, o processo de fermentação poderia ser perturbado e o número de bactérias úteis reduzido, com a consequência que a mucosa do cólon é debilitada e para de funcionar ao mesmo tempo que as bactérias potencialmente malignas crescem rapidamente em número. As estirpes probióticas da invenção são capazes de prevenir a adesão de *S.aureus* a células epiteliais, bem como de reduzir as taxas de sobrevivência de células de *S.aureus* e de muitos outros patógenos. Assim, as estirpes probióticas da invenção são particularmente úteis para o tratamento de

ditas doenças visto que as mesmas contribuem efetivamente para a morte dos patógenos ao mesmo tempo; as mesmas contribuem para a repopulação da superfície da mucosa com a microflora fisiológica.

Por esse motivo, um aspecto dessa invenção é o uso de probióticos da invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento profilático ou terapêutico de infecção crônica ou aguda, ou infestação ou de colonização microbiana indesejada, de uma superfície mucosa ou qualquer outro local no corpo humano, em que a infecção, infestação ou colonização é causada por parasitas, bactérias, levedura, fungos ou vírus, afetando qualquer superfície do corpo ou mucosa, sendo que o dito tratamento terapêutico compreende a administração de uma quantidade eficaz de um probiótico, ou uma composição contendo probiótico, a um indivíduo em necessidade do mesmo. Em uma modalidade preferida, a infecção ou colonização é causada por parasitas, bactérias, levedura, fungos ou vírus, de qualquer superfície do corpo ou mucosa num indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

Os probióticos da invenção foram selecionados com base na sua capacidade de colonizar a glândula mamária após a ingestão oral e prevenir a adesão a células epiteliais e reduzir a sobrevivência de *S.aureus*. Assim, as estirpes são adequadas para o tratamento de mastite. Consequentemente, num aspecto adicional, a invenção fornece o uso das estirpes probióticas das invenções para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento ou profilaxia de mastite infecciosa humana e animal. Esse processo consiste no uso de estirpes probióticas selecionadas a partir de leite fresco homólogo e na capacidade dessas estirpes serem transferidas

para a glândula mamária e exercerem seus benefícios, como a inibição da infecção estafilocócica.

Ademais, as estirpes probióticas da invenção também se revelaram ter algumas características atribuídas a uma estirpe probiótica potencial, isto é, segurança e resistência satisfatória ao processo de digestão e à capacidade de colonização intestinal. Portanto, as estirpes são capazes de alcançar o trato intestinal após a ingestão oral e exercem suas propriedades terapêuticas no mesmo. Consequentemente, numa modalidade preferida, a invenção fornece o uso das estirpes probióticas da invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de diarreia neonatal.

As estirpes probióticas são conhecidas por reduzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados durante distúrbios inflamatórios crônicos. Consequentemente, noutro aspeto, a invenção fornece o uso das estirpes bacterianas e composições da invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios inflamatórios ou autoimunes. Exemplos não limitativos de tais doenças inflamatórias e autoimunes incluem IBD, colite ulcerativa, artrite, aterosclerose, esclerose múltipla, psoríase ou sarcoidose.

As estirpes probióticas de acordo com a invenção são capazes de repopularem a barreira intestinal imune após a ingestão oral e, desse modo, as mesmas também são particularmente adequadas para a melhora da barreira intestinal imune num indivíduo ou animal em necessidade do mesmo. Consequentemente, noutro aspeto, a invenção fornece o uso de uma ou mais estirpes probióticas da invenção para a

preparação de uma composição farmacêutica para a preparação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de reações de hipersensibilidade a intolerância alimentar e metabólica como intolerância à lactose; de constipação e outros distúrbios gastrointestinais.

Os probióticos são conhecidos por serem úteis para neutralizar o cancro devido a seus efeitos na inibição de toxinas carcinogénicas nos intestinos como nitrosaminas, porém também devido ao efeito desses probióticos na modulação da resposta imune natural. Consequentemente, num aspeto adicional, a invenção fornece o uso das estirpes expressas nessa invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento profilático ou terapêutico de alguns tipos de cancro e para inibir o crescimento tumoral, metástase e cancro em indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

As estirpes da invenção são capazes de modular a resposta imune e o equilíbrio entre citocinas Th1 e Th2. Consequentemente, num aspeto adicional, a invenção fornece o uso da estirpe e composições da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de distúrbios alérgicos, asma e distúrbios relacionados ao desenvolvimento de tolerância contra proteínas ingeridas.

Em um aspeto adicional, a invenção fornece o uso das estirpes e composições da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de níveis de imunidade temporalmente reduzidos em indivíduos como produzidos durante o envelhecimento ou em indivíduos saudáveis que são submetidos a esforço intenso ou em geral a um grande esforço ou *stress* fisiológico.

Em outro aspeto, a invenção fornece o uso terapêutico da estirpe probiótica e das combinações de estirpes em que a estirpe ou estirpes são administradas via oral, tópica, nasal, enteral, ocular, urogenital, retal ou vaginal.

Ademais, devido à presença das estirpes selecionadas no leite materno, os indivíduos em necessidade de tratamento poderiam ser não só aqueles que ingerem diretamente as estirpes selecionadas como também feto ou bebés lactentes. Consequentemente, ainda num aspeto adicional, a invenção fornece o uso das estirpes e composições da invenção na fabricação de um medicamento desenhado para ser administrado a mulheres lactantes para o tratamento terapêutico ou profilático de seu feto e/ou seus bebés lactentes.

Os seguintes métodos e exemplos ilustram a invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Isolamento de probióticos de leite de mamífero

Amostras de leite fresco (2 ml exceto no caso das cadelas em que apenas 0,5 ml foi colhido) foram obtidas de 23 mulheres saudáveis no dia 6-14 após o parto; 8 porcas no dia 5 após o parto, 9 cadelas no dia 2-10 após o parto e 4 vacas no dia 2 após o parto. Nem as mulheres nem os animais tiveram complicações durante o parto e nenhuma terapia com antibiótico foi administrada nas últimas duas semanas antes da colheita de amostra de leite. Todas as amostras de leite foram imediatamente congeladas a -80°C .

Para isolar as estirpes bacterianas dessas amostras, diluições em série de 0,1 ml em água de peptona foram plaqueadas em MRS, APT, RCM, LM17, GM 17 e placas de ágar Elliker a 37°C tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas durante 24 a 48 horas. Entre as aproximadamente 1200 colônias inicialmente obtidas, 120 (10%; incluem representativos das diferentes morfologias observadas nas placas) foram selecionadas e subcultivadas em ágar MRS a 37°C em condições anaeróbicas. Entre essas, foram selecionados ainda 68 isolados com as seguintes características: não formação de esporo, bastonetes Gram positivos catalase e oxidase-negativos.

Esses 68 isolados selecionados foram adicionalmente caracterizados tanto fenotipicamente (API CH50, APIZYM e avaliação de resistência a antibiótico) como geneticamente (sequenciamento de 16S rRNA e perfil de RAPD-PCR). Essa caracterização resultou em 59 estirpes bacterianas diferentes que foram adicionalmente avaliadas através do processo de triagem descrito nessa invenção para obter potenciais candidatos probióticos que são capazes de proteção contra mastite.

Após esse processo de triagem, somente 6 estirpes (2 das mulheres, 2 das cadelas e 2 das porcas) cumpriram todos os critérios definidos. Outras estirpes de bactérias de ácido láctico foram obtidas a partir de outras espécies de mamíferos, como cabra, ovelha, gato, rato e camundongos, porém as mesmas não tiveram êxito para cumprir todos os critérios de triagem e por esse motivo as mesmas não foram incluídas nessa invenção.

- *Bifidobacterium breve* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite humano
- *Bifidobacterium breve* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite humano
- *Lactobacillus reuteri* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite suíno
- *Lactobacillus plantarum* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite suíno
- *Lactobacillus reuteri* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite canino
- *Lactobacillus fermentum* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite canino
- *Lactobacillus salivarius* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite suíno
- *Enterococcus hirae* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite felino
- *Enterococcus faecalis* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite felino
- *Lactobacillus plantarum* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite felino
- *Lactobacillus reuteri* as ditas bactérias são obtidas a partir de leite canino

Exemplo 2: Caracterização fisiológica e genética

Todos esses isolados foram caracterizados de forma fisiológica e genética. Para a identificação de cada estirpe probiótica, uma análise de fermentação API 50CH (BioMerieux) das estirpes a 37°C em condições anaeróbicas durante 24 e 48 horas foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Os resultados de 24 horas foram resumidos na Tabela I. Um substrato fermentável positivo é aquele com um valor maior que 3.

Devido à baixa especificidade da caracterização de API, a análise das sequências de 16S rRNA das estirpes bacterianas selecionadas também foi realizada. A sequência de 16S RNA das bactérias selecionadas e seu perfil de RAPD-PCR são mostrados na Figura 1. Os resultados obtidos resultaram na classificação das estirpes bacterianas como indicado acima. Com essa classificação, as estirpes bacterianas da invenção foram depositadas de acordo com o Acordo de Budapeste na CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia (Espanha) em 17 de abril de 2007 e concedeu os seguintes números de acesso:

- *Bifidobacterium breve* CECT7263
- *Bifidobacterium breve* CECT7264
- *Lactobacillus reuteri* CECT7260
- *Lactobacillus plantarum* CECT7262
- *Lactobacillus reuteri* CECT7265
- *Lactobacillus fermentum* CECT7266

As seguintes estirpes bacterianas descritas no presente documento foram depositadas de acordo com o Acordo de Budapeste na CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia (Espanha) em 30 de maio de 2008

- *Lactobacillus salivarius* CELA200
- *Enterococcus faecalis* EFG1
- *Lactobacillus plantarum* LG14
- *Lactobacillus reuteri* PDA3

Tabela I: Padrão de fermentação das diferentes estirpes probióticas descritas no presente documento que incluem aquelas da invenção. Os substratos fermentáveis positivos

TESTE	7263	7264	7260	7262	7265	7266	PDA3	LG14	CELA200	EFG1	EHG11
Glicogênio	5	4	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Xilitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
□ Gentiobiase	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Turanose	5	4	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Lixose	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Tagatose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabitól	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabitól	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Exemplo 3: Triagem seletiva das estirpes

Exemplo 3a: Transferência para a glândula mamária após a ingestão oral

Uma vez que as estirpes candidatas diferentes foram obtidas a partir de leite de mamífero conforme indicado nos primeiros critérios de seleção, a etapa seguinte no processo de seleção descrito na presente invenção é que as bactérias devem ser capazes de serem transferidas para o leite após a ingestão oral ou aplicação tópica. Para testar essa capacidade, as estirpes putativas foram geneticamente marcadas como anteriormente descrito (WO 2004/003235) e oralmente administradas a ratas prenhes como modelo animal. Os lactobacilos, bifidobactérias e enterococos totais foram medidos em amostras de leite e fecais neonatais. Ademais, a transferência específica de bactérias foi analisada por triagem por PCR das colónias obtidas a partir do leite de ratas lactantes e das fezes neonatais.

Quatro ratas Wistar prenhes foram oralmente inoculadas com 10⁸ cfu de estirpes geneticamente marcadas veiculadas em 0,5 ml de leite a cada dois dias a partir de duas semanas antes do parto. Após o parto, a transferência de bactérias geneticamente marcadas para o leite materno foi analisada por comparação das bactérias isoladas das fezes neonatais no dia 0, 5 e 10 após o parto. Todas as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C sob condições anaeróbicas. Para cada amostra obtida, as contagens totais de bifidobactérias, lactobacilos e enterococos foram medidas. Entre as colônias que cresceram em placas de MRS, 50 foram aleatoriamente selecionadas a partir de cada amostra e subcultivadas em placas de Cm-MRS. Por fim, as colônias resistentes a Cm foram usadas como modelos para detetar as colônias de marcação genética específicas (Figura 2). A transferência foi considerada positiva quando pelo menos 1% das colônias obtidas eram PCR-positivas.

Exemplo 3b: Inibição de sobrevivência de *Staphylococcus aureus*

As estirpes probióticas dessa invenção foram analisadas quanto à sua capacidade de produzir metabólitos bactericidas capazes de reduzir a sobrevivência de *Staphylococcus aureus* utilizando um ensaio de difusão em poço de ágar. As placas de ágar TSA contendo 10⁶ cfu/ml de *S. aureus* foram preparadas. Os poços com um diâmetro de 5 mm foram cortados no ágar utilizando um perfurador estéril. Então, 50 µl de um sobrenadante 2 vezes concentrado de cada solução de estirpe probiótica foram adicionados aos poços e deixados difundir no ágar durante um período de pré-incubação de 2 horas a 4°C, seguido por incubação aeróbica das placas a 37°C durante

16 a 18 horas. Após o período de incubação, um halo de inibição foi observado e medido (em milímetros) para avaliar o efeito bactericida dos candidatos probióticos (Figura 3A).

Exemplo 3c: Inibição de adesão de *Staphylococcus aureus* a células epiteliais

As linhagens de células intestinais Caco-2 foram cultivadas para confluência em pratos de plástico de 35 mm contendo 2 ml de meio sem antibióticos. No dia 10-14 após a confluência, 1 ml de meio foi substituído por 1 ml de uma suspensão de 10^8 bactérias probióticas em DMEM. As culturas foram incubadas 1 hora a 37°C. Após isso, 1 ml de uma suspensão de 10^8 bactérias patogénicas (*S. aureus*) em DMEM foi adicionado às culturas e incubado durante mais 1 hora a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 70% de metanol gelado durante 30 minutos. As placas foram secas ao ar e Gram coradas. As bactérias fixadas foram visualizadas utilizando um microscópio ótico Axiovert 200 (Zeiss) em 1000x de ampliação em imersão em óleo. O número bactérias gram-negativas em 10 campos aleatorizados foi contado e os resultados expressos como a média de % de bactérias patogénicas fixadas às células comparado com as culturas de controlo sem as estirpes probióticas (Figura 3B).

Exemplo 3d: Proteção de mastite

Para avaliar a eficácia dos candidatos probióticos para proteção contra mastite, um modelo de camundongo dessa patologia foi usado. Em suma, 10 ratas Wistar prenhes por grupo foram diariamente suplementadas por gavagem oral com 10^8 cfu/dia de cada estirpe probiótica veiculada em 200 μ l de leite durante duas semanas após o parto. Uma semana após

o parto, a infecção por mastite foi induzida nos animais por injeção de 10^6 cfu de *S. aureus* no quarto par de glândulas mamárias. O leite expresso foi colhido nos dias 0, 5 e 10 após a infecção para medir a carga bacteriana (Figura 4A); e 5 animais de cada grupo foram sacrificados nos dias 5 e 10 após a infecção para obter biópsias de glândula mamária para avaliar o processo inflamatório por exame histológico.

As glândulas inteiras foram fixadas em 5% de formalina e desidratadas com álcool e, por fim, incorporadas em parafina. As secções de tecido foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas de forma cega (Figura 4B). Para avaliar qualitativamente as alterações de histologia de glândulas mamárias, um valor de índice inflamatório (IIV) foi determinado da seguinte maneira:

- Pontuação 0: Sem infiltração
- Pontuação 1: Infiltração intersticial de células PMN moderada em áreas isoladas de secções de tecido, epitélio tubular intacto
- Pontuação 2: Infiltração intersticial que abrange a maioria dos campos, áreas dispersas de dano tecidual com perda de estrutura de tecido,

e imagens raras de formação de abscessos
- Pontuação 3: Infiltração severa que abrange a maioria dos campos, áreas frequentes de dano tecidual com perda de arquitetura de tecido, e imagens frequentes de formação de abscessos.

Exemplo 4: Potencial probiótico das estirpes

As estirpes selecionadas foram adicionalmente analisadas quanto a características diferentes que poderiam aperfeiçoar suas capacidades de atuarem como estirpes probióticas. Os resultados obtidos são descritos nos exemplos indicados.

Exemplo 4a: Adesão a células Caco-2 e HT-29

Para os ensaios de adesão, as linhagens celulares Caco-2 (ATCC HTB-37) e HT-29 (ATCC HTB-38) foram utilizadas como um modelo das células do intestino. Ambas as linhagens celulares apresentaram características de células intestinais como polarização, expressão de enzimas intestinais, produção de polipeptídeos estruturais particulares e mucinas.

As células foram desenvolvidas em frascos de plástico (75 cm², Nunc) em DMEM como meio de cultura suplementado com 10% de FCS inativado, aminoácidos não essenciais, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 1 mg/ml de anfotericina. A cultura foi realizada a 37°C numa atmosfera que compreende 95% de ar e 5% de Meio CO₂ foi alterada numa base de dois dias e as células foram divididas a cada semana.

As linhagens celulares intestinais Caco-2 e HT-29 foram divididas em pratos de plástico de 35 mm em um meio de 2 ml sem antibióticos até à confluência. 10 a 14 dias após a confluência, 1 ml de meio foi substituído por 1 ml de uma suspensão de 10⁸ bactérias em DMEM (PAA). As culturas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. Após isso, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 70% de metanol gelado durante 30 minutos. As placas foram secas ao ar e Gram coradas. As bactérias fixadas foram visualizadas

utilizando um microscópio ótico Axiovert 200 (Zeiss) em 1000x de ampliação em imersão de óleo. Vinte campos aleatorizados foram contados e os resultados expressos como a média do número de bactérias fixadas às células por campo $\pm$ SD (Figura 5).

Exemplo 4b: Resistência a ácido e sais biliares

Para analisar a resistência das estirpes probióticas dessa invenção a teor de ácido e alto teor de sais biliares, as condições que essas bactérias irão encontrar durante o trânsito digestivo, as bactérias foram cultivadas em meio de caldo MRS pH 3,0 ou com 2 % de sais biliares (Sigma) durante 90 minutos. A sobrevivência foi calculada por plaqueamento de ágar MRS de diluições em série e comparada com o número de colônias obtidas em condições de controlo (caldo MRS pH 5,8). As placas foram cultivadas 24 horas a 36°C em condições anaeróbicas extremas. O experimento foi repetido três vezes (Figura 6).

Exemplo 4c: Resistência a antibióticos

O uso de antibióticos modernos resulta numa redução da microflora intestinal comensal que, às vezes, está relacionada à diarreia e outros distúrbios intestinais. Ademais, essa redução na quantidade de bactérias intestinais poderia ser a consequência de bactérias e vírus patogénicos oportunistas infetarem o hospedeiro. O uso de antibióticos para bloquear a infeção não resolve esse distúrbio, porém complica o mesmo. Em outras situações como inflamação intestinal em que probióticos poderiam exercer uma função benéfica, esse potencial efeito é, às vezes, limitado para a terapia simultânea com antibióticos. Por todos esses

motivos, a seleção de potenciais estirpes probióticas que eram capazes de resistir a antibióticos comuns deveria ser claramente interessante.

Para analisar a resistência das estirpes probióticas dessa invenção, um ensaio de difusão em poço de ágar foi utilizado. Placas de ágar Müeller-Hinton contendo 10^6 cfu/ml de cada estirpe probiótica foram preparadas. Então, discos de antibióticos comerciais foram adicionados aos poços e deixados difundir no ágar durante um período de pré-incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, seguido por incubação anaeróbica extrema das placas a 36°C durante 16 a 18 horas.

A resistência a antibióticos das estirpes probióticas dessa invenção é resumida na Tabela II.

Tabela II: Resistência a antibióticos das diferentes estirpes probióticas da invenção

Exemplos Comparativos											
	7263	7264	7260	7262	7265	7266	7413	7412	7409	7411	7410
Penicilina	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ampicilina	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Vancomicina	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Gentamicina	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Exemplo 4d: Produção de metabólitos antimicrobianos

Foi sugerido que o principal mecanismo usado por probióticos para controlar o equilíbrio entre bactérias intestinais úteis e prejudiciais é o intestino. Quando o número de bactérias úteis é reduzido, bactérias oportunistas poderiam ser excessivamente desenvolvidas e perturbar o bem-estar do hospedeiro ou ainda induzir uma infecção. A maioria dos organismos bacterianos adquiriu características ou mecanismos que reduzem as capacidades de crescimento de outros microrganismos que coabitam com os mesmos e, desse modo, permitem seu crescimento seletivo. A redução de pH através de produção de ácido por bactérias de ácido láctico é um desses mecanismos. Ademais, algumas bactérias de ácido láctico também produzem componentes peptídicos bioativos e outros metabólitos que inibem seletivamente o crescimento de outras bactérias, levedura ou fungos. Esse é o caso de reuterina (um aldeído) ou bacteriocinas (peptídeos, como nisina ou pediocina PA-1).

As estirpes probióticas dessa invenção foram analisadas quanto à sua capacidade de produzir metabólitos bactericidas utilizando um ensaio de difusão em poço de ágar. As placas de ágar TSA contendo 10^6 cfu/ml de estirpes de bactérias patogênicas diferentes foram preparadas e analisadas como anteriormente indicado no Exemplo 3b para *S. aureus*. Os resultados obtidos foram descritos na Tabela III.

Tabela III: Potencial inibitório de patógenos das diferentes estirpes probióticas descritas no presente documento que incluem aquelas da invenção

	Exemplos Comparativos										
	PDA3	LG14	CELA200	EGF1	EHG11	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> P21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<i>E. faecalis</i> TAB28	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+/-
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	++	+/-	+	+/-	+/-	+++	++	++=	+/-	+	+++
<i>L. innocua</i> RdC	+	+/-	+	+/-	+/-	++	++	+/-	+	+/-	+/-
<i>E. coli</i> CECT 4076	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> RJM1	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+/-
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT860T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<i>P. vulgaris</i> CECT484	++	++	++	+	+	+/-	+	+++	+++	+++	+/-
<i>S. aureus</i> CECT5191	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>S. epidermidis</i> CECT231	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++

Exemplo 5: Efeito de estirpes probióticas sobre a translocação de *Salmonella typhimurium* em camundongos após a imunização com vacina de *Salmonella* inativada

A translocação de bactérias gram-negativas através do epitélio intestinal pode ocorrer especialmente em indivíduos após a infecção, doença ou cirurgia gastrointestinal. Se deixadas não tratadas as mesmas podem resultar em endotoxemia. Nesse exemplo, o efeito de alimentação das estirpes probióticas dessa invenção sobre a translocação do patógeno intestinal de *Salmonella typhimurium* foi examinado.

Camundongos Balb/c machos (6 a 8 semanas de idade) foram diariamente privados de alimentos com 1×10^8 cfu em 0,2 ml de leite ou leite individualmente durante duas semanas. Após isso, os camundongos foram ou não oralmente imunizados com uma vacina de *Salmonella* inativada (10^8 cfu inativadas com paraformaldeído em 0,2 ml de leite). Após a imunização, os camundongos foram privados de alimentos durante mais duas semanas com as preparações probióticas em dias alternados durante mais duas semanas. Duas semanas após a administração oral, todos os camundongos foram oralmente desafiados com *S. typhimurium* vivo (10^{10} cfu em 0,2 ml de leite). Então, após 24 a 48 horas, o nível de colonização de *S. typhimurium* no baço foi determinado em metade dos animais. O restante dos animais foi acompanhado durante duas semanas adicionais para avaliar a sobrevivência dos animais após infecção por *Salmonella*.

Os resultados obtidos demonstram que a maioria dos probióticos testados potencializa o efeito benéfico da vacinação de camundongos com a vacina de *Salmonella* inativada como mostrado na Figura 7.

Exemplo 6: Efeito de *L. plantarum* CECT7262 ou *L. reuteri* CECT7260 sobre a prevenção de diarreia neonatal em leitões recém-nascidos.

O desmame de leitões de 3 a 4 semanas de idade está correlacionado com uma alta taxa de mortalidade naqueles animais principalmente devido a um aumento na incidência de infecções diarreicas. Provavelmente, essa alta mortalidade está relacionada a uma regulação descendente de suas defesas devido à modificação stressante de seu estado nutricional e gerenciamento e a mudanças importantes na composição de sua microbiota intestinal.

Por esse motivo, os camponeses tentaram resolver esse problema com o uso de várias abordagens como o uso de antibióticos, componentes estimulantes de imunidade ou protetores da mucosa, como colistina ou ZnO. Entretanto, a proibição de EU do uso de antibióticos para a produção animal em 2006 agravou a situação. Por esse motivo, o uso de probióticos capazes de modular a microbiota intestinal e a resposta imune aparece como uma potencial alternativa.

O efeito protetor da administração de 3×10^9 cfu/dia de *L. reuteri* CECT7260 e *L. plantarum* CECT7262 foi comparado com a administração de uma formulação de ração animal contendo 3000 ppm de ZnO e 40 ppm de colistina em dois grupos de 48 e 45, respectivamente, leitões desmamados durante um período de 34 dias.

Em ambos os grupos, nenhum desses animais sofreu de diarreia nem morreu durante o estudo, e a evolução do peso corporal também era similar entre ambos os tratamentos, sugerindo que

uma formulação de ração animal suplementada com esses probióticos é, pelo menos, tão satisfatória quanto aquelas contendo antibióticos e moduladores imunes convencionais.

Exemplo 7: Efeito de bactérias probióticas sobre citocinas inflamatórias e produção de IgG

Além da redução do risco de infecção, muitos efeitos clínicos associados a tratamentos probióticos se devem a capacidades imunomoduladoras de estirpes probióticas selecionadas. A regulação da resposta imune é geralmente mediada através de uma mudança no equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (Th1) como $\text{TNF-}\alpha$, citocinas humorais (Th2) como IL-4 ou IL-13, e citocinas reguladoras (Th3) como IL-10 e $\text{TGF-}\beta$. Ademais, a tendência na resposta imune também irá modular a secreção de imunoglobulinas durante a resposta humoral subsequente. Por esse motivo, o efeito de algumas estirpes probióticas dessa invenção na regulação da expressão de algumas dessas citocinas e IgG também foi testado.

Macrófagos derivados de medula óssea estimulados com 100 ng/ml de LPS (Sigma) como um modelo celular foram usados. 10^5 macrófagos/poço foram cultivados em placas de plástico de 24 poços (Nunc) com 1 ml de DMEM. Uma vez fixados, os macrófagos foram ou não estimulados com 100 ng/ml de LPS e com 10^7 cfu/ml das estirpes probióticas indicadas durante 12 horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO_2 . Os sobrenadantes foram colhidos e a produção de citocinas foi analisada utilizando um ELISA de $\text{TNF-}\alpha$ de camundongo ou IL-10 de camundongo (Biosource). Os resultados obtidos são resumidos na Figura 8A e B.

A análise do efeito das estirpes probióticas dessa invenção sobre a produção de imunoglobulina foi realizada utilizando culturas de linfócitos obtidas do baço de camundongos Balb/c machos (6 a 8 semanas de idade). 2×10^6 linfócitos foram cultivados em 1 ml de DMEM em placas de plástico de 24 poços e estimulados com culturas probióticas inativadas (10^8 cfu/ml) na presença ou ausência de 25 $\mu\text{g/ml}$ LPS durante 6 dias. A produção de IgG por linfócitos foi analisada utilizando um ELISA de IgG de camundongo de Bethyl (Figura 8C).

LISTA DE SEQUÊNCIA

<110> PULEVA BIOTECH S.A.

<120> MICRORGANISMOS DO LEITE DE MAMÍFEROS, COMPOSIÇÕES CONTENDO OS MESMOS E SEU USO PARA O TRATAMENTO DE MASTITE

<130> P2922ES00

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 481

<212> DNA

<213> B.breve CECT 7263

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (8)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (131) .. (131)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (147) .. (147)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 1

```

tcnggttnnga agnacaataa acacntaagt gccttgctcc ctaacaaaag aggtttacaa      60
cccgcaaggc ctccatccct cacgoggcgt cgctgcatca ggcttgccgc cattgatgca      120
atattcccca ntgtgcctc ccgatangag tctgggccgt atctcagtcc caatgtggcc      180
ggtcgcctc tcaggccggc taccgctga agccatgggtg ggccgttacc ccgccatcaa      240
gctgatagga cgcgaccca tcccatgccg caaaggcttt cccaacacac catgcggtgt      300
gatggagcat ccggcattac caccgcttc caggagctat tccggtgcat ggggcaggtc      360
ggtcacgcat tactcaccg ttcgccactc tcaccaccag gcaaagcccg atggatcccg      420
ttcgacttgc atgtgttaag cacgccgcca gcggtcatcc tgagccagga tcaaactcta      480
a                                                                              481

```

<210> 2

<211> 476

<212> DNA

<213> B.breve CECT 7264

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (2)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) . . (8)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (63) .. (63)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (72)..(72)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (80)..(80)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (83)..(83)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (87) .. (87)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (114)..(114)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (141)..(141)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature
<222> (159) .. (159)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (161) .. (161)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (355) .. (355)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (358) .. (358)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (369) .. (369)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (444) .. (444)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (455) .. (456)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 2

```

tncgoganga agaaataaaa caaagtgcct tgctccctaa caaaagaggt ttacaacccg      60
aangcctcca tncctcaegn ggngtncat gcatcaggct tgcgccatt gtgnaatatt      120
ccczactgct gcctcccgta ngagtctggg cagtatctna ntcccaatgt ggcgggtgc      180
cctctcaggc oggtacccg tcgaagccat ggtgggccgt taccocgcca tcaagctgat      240
aggacgggac cccatcccat gcgcgaaagg ctttcccaac acaccatgcg gtgtgatgga      300
gcatccggca ttaeccaccg tttccaggag ctattccggt gcatggggca ggtcngtnac      360
gcattactna ccggttcgcc actctacca ccaggcaaaag ccgatggat ccggttogac      420
ttgcatgtgt taagcacgcc gcngcggttc atcnnaaac aggatcaaac tctaaa      476

```

<210> 3

<211> 515

<212> DNA

<213> L.fermentum CECT 7265

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (313)..(313)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (510)..(510)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 3

```
tacacgatat gaacagntta cctctcctac ggtgnttctt cttaacaac agagctttac      60
gagcogaaac ccttcctcac tcacgcggtg ttgctccatc aggcttgcgc ccattgtgga      120
agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt atgggcggtg tctcagtcac attgtggcgc      180
atcagtctct caactcggtt atgcctcctc gccttggttag gcggttaccc caccaacaag      240
ctaattgcacc gcaggtccat ccagaagtga tagcgagaag ccattcttta agcgttggtc      300
atgcgaacaa cgntgttatg cggatttagc atctgtttcc aaatgttggt ccccgcttct      360
gggcaggtta cctacgtggt actcaccogt ccgcacctcg ttggcgacca aaatcaatca      420
ggtgcaagca ccattcaatc attgggacca cgcgttcgac ttgcatgtat taggcacacc      480
gcggcggttc atcctgagcc aggatcaaan totaa                                  515
```

<210> 4

<211> 526

<212> DNA

<213> L.reuteri CECT 7266

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) .. (10)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (521)..(521)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 4

```

accgnggggn aacgacactg cngnacagn ttactctcac gcacgnttct tctccaacaa    60
cagagcttta cgagccgaaa cccttcttca ctacgcgggt gttgctccat caggcttgcg    120
cccattgttg aagattccct actgctgcct ccgtaggag tatggaccgt gtctcagttc    180
cattgtggcc gatcagttct tcaactoggc tatgcatcat cgccttggtg agccgttacc    240
ttaccaacta gctaattcac cgcaggtcca tccagagtg atagccaaag ccattcttca    300
aacaaaagcc atgtggcttt tgttgttatg cggattatgc atctgtttcc aaatgttato    360
ccccgtccg gggcaggtta cctacgtgtt actcaccgt cggccactca ctggtgatcc    420
atcgtcaatc aggtgcaagc accatcaatc agttgggcca gtgcgtacga cttgcatgta    480
ttaggcacac cgcggcggtt catcctgagc caggatcaaa ntctaa                    526

```

<210> 5

<211> 524

<212> DNA

<213> L.reuteri CECT 7260

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (3)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) .. (8)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature
 <222> (507) .. (507)
 <223> n é a, c, g, ou t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (515) .. (515)
 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 5

```

gcntgggnga acggtcactg cggaacagtt actctcaccg acgttcttct ccaacaacag    60
agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgoggtggt gctccatcag gcttgcgccc    120
attgtggaag attccctact gctgectccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat    180
tgtggccgat cagtctctca actcggttat gcacatccgc cttggtaagc cgttacctta    240
ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcacac    300
aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tgttatcccc    360
cgctccgggg caggttacct acgtgttact cacccgtcgg ccactcactg gtgatccatc    420
gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatttatta    480
ggcacaccgc cggcggttcat cctgagncag gatcnaaaact ctaa                    524

```

<210> 6
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> L. plantarum CECT 7262

<220>
 <221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 6

```

ggcctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatggtt cttctttaac      60
aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgog gcgttgctcc atcagacttt      120
cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctccgtagg agtttgggce gtgtctcagt      180
cccaatgigg ccgattaccc tctcaggctg gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta      240
cctcaccatc tagctaatac gcgcggggac catccaaaag tgatagcoga agccatcttt      300
caaactcgga ccattgggtc caagttggtt tgcggtatta gcattctgtt ccaggtgtta      360
tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaatt      420
taattcatga tgcgaagcacc aatcattacc agagttcgtt cgaattgcac gtattaggca      480
cgccgccage gttcgtcctg agacaggatc aaaactcta                               519

```

<210> 7

<211> 474

<212> DNA

<213> Enterococcus hirae EHGl1

<400> 7

```

gacagttact ctcatccttg ttcttctcta acaacagagt ttacgatcc gaaaaccttc      60
ttcactcacg cggcggttgc cggtcagaact ttcttccatt gcogaagatt cctactgct      120
gcctcccgta ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggcgatcac cctctcaggt      180
cggctacgca tcgtgcctt ggtgagccgt tacctcacca actagctaatt gcaccgggg      240

```

```

tccatccatc agcgacaccc gaaagcgcc ticaaatcaa aaccatgcgg ttctgattgt 300
tatacgggtat tagcacctgt ttccaagtgt tatcccttc tgatgggcag gttacccacg 360
tggtactcac ccgttcgcc ctctctttt tccggtggag caagctccgg tggaaaaaga 420
agcgttcgac ttgcargtat taggcacgac gccagcgttc gtctgagcc aggt 474

```

<210> 8

<211> 469

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum LG14:

<400> 8

```

ttactctcag atatgttctt ctttaacaac agagttttac gagccgaaac cttctctcac 60
tcacgcggcg ttgctccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgctgctc 120
ccgtaggagt ttgggccgtg tctcagtcac aatgtggccg attaccctct caggtcggct 180
acgtatcatt gccatggtag gcggttaccy caccatctag ctaatacgcc gggggaccat 240
ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gctcggacca tgcggtccaa gttgttatgc 300
ggtattagca tctgtttcca ggtgttatcc ccgcttctg ggcaggtttc ccacgtgtta 360
ctcaccagtt cgcactcac tcaaatgtaa atcatgatgc aagcaccact caataccaga 420
gttcgttcga cttgcatgta ttaggcacgc cgcagcgtt cgtctgag 469

```

<210> 9

<211> 493

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis EFG1:

<400> 9

```

ctatcatgca agtcgaacgc ttctttcctc ccgagtgcct gcactcaatt ggaagagga      60
gtggcgagcg ggtgagtaac acgtgggtaa cctacccatc agagggggat aacacttgga     120
aacaggtgct aataccgcat aacagtttat gccgcattgc ataagagtga aaggcgcttt      180
cgggtgtcgc tcatggatgg acccgcggtg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac     240
caaggccacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg      300
gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaattctcgg caatggacga aagtctgacc       360
gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa aactctgttg ttagagaaga      420
acaaggacgt tagtaactga acgtcccttg acggtatcta accagaaagc caccgctaac      480
tacgtgccca gca                                                                493

```

<210> 10

<211> 524

<212> DNA

<213> Lactobacillus salivarius CELA200:

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (113)..(113)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (297)..(297)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (345)..(345)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (503)..(503)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 10

gggtggggng ancagaacat gaatatgaaca gtttacatct cacctcgctg ntctctcctc 60

taacaacaga gctttttacga ctccgaagga ccttcttcac atcacggggc gtnctgctca 120

tcagaacttg cgtccattgtg gaagattccc tactgctgac tcccgtagga gtttgggccc 180

tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctccagattcg gctacgtatc atcaccttgg 240

```

tagggcggta cccacccaac tagttaatac gccgcggggtc catctaaaag cgatagnaga      300
accatctttc atctaaggat catgcgatcc ttagagatat argggnattag cacctgtttc      360
caagtgttat ccccttcttt taggcagggtt acccacgtgt tactcaccgg tcggccactc      420
aacttcttac ggtgaatgca agcattcgggt gtaagaaagt ttogttcgac ttgcatgtat      480
taggcacgcc gccagcggtc gtnatgagcc aggatcaaac tcta                          524

```

<210> 11

<211> 524

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri PDA3:

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (3)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) .. (8)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (507) .. (507)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (515) .. (515)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 11

```

gcntgggnga acggtaactg cggaaacagtt actctcacgc acgttcttct coaacaacag      60
agctttaaga gccgaaaccc ttcttcactc acgcgggtgtt gctccatcag gcttgcgccc      120
attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggacogtgtc tcagttccat      180
tgtggcgat cagtctctca actcggctat gcateatcgc cttggttaagc cgttacetta      240
ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtata gccaaagcca tctttcaaac      300
aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcctc tgtttccaaa tgttatcccc      360
cgctcggggg caggttaact acgtgttact caaccgtcgg ccactcaactg gtgatccatc      420
gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta      480
ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa                          524

```

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Estirpe probiótica **caracterizada** por ser selecionada a partir do grupo de *Bifidobacterium breve* depositado na CECT sob N° de Acesso 7263, *Bifidobacterium breve* depositado na CECT sob N° de Acesso 7264, *Lactobacillus reuteri* depositado na CECT sob N° de Acesso 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado na CECT sob N° de Acesso 7262, *Lactobacillus fermentum* na CECT sob N° de Acesso 7265 e *Lactobacillus reuteri* depositado na CECT sob N° de Acesso 7266.

2. Estirpe probiótica, de acordo com a reivindicação 1, ou uma mistura de estirpes, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por serem usadas como um medicamento.

3. Composição, produto farmacêutico, alimento ou produto nutricional **caracterizado** por compreender pelo menos uma estirpe probiótica, de acordo com a reivindicação 1.

4. Composição, produto farmacêutico, alimento ou produto nutricional, conforme definido na reivindicação 3, **caracterizado** por estar em uma forma congelada, liofilizada ou seca.

5. Uso de uma estirpe probiótica, de acordo com a reivindicação 1, ou uma mistura da mesma para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de uma infecção ou infestação crônica ou aguda, ou de uma colonização microbiana indesejada, **caracterizado** por a infecção, infestação ou colonização ser causada por parasitas, bactérias, levedura, fungos ou vírus que afetam qualquer superfície do corpo ou mucosa em um indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** por a infecção ser mastite.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** por a infecção ser diarreia neonatal.

8. Uso de uma estirpe probiótica, de acordo com a reivindicação 1, ou uma mistura da mesma, **caracterizado** por a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de reações de hipersensibilidade a alimentos e intolerância metabólica; de constipação e outros distúrbios gastrointestinais; de distúrbios inflamatórios ou autoimunes selecionados a partir do grupo de IBD, colite ulcerativa, artrite, aterosclerose, esclerose múltipla, psoríase ou sarcoidose; e de crescimento tumoral, metástase e cancro em um indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

9. Uso de uma estirpe probiótica, de acordo com a reivindicação 1, ou uma mistura da mesma, **caracterizado** por a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de distúrbios alérgicos e asma em um indivíduo ou animal em necessidade do mesmo.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 5 a 9, **caracterizado** por a estirpe ou composição ser administrada por via oral, tópica, nasal, enteral, ocular, urogenital, retal ou vaginal.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 5 e 7, **caracterizado** por a estirpe, composição, produto farmacêutico, alimento ou produto nutricional ser projetado para ser administrado a mulheres ou animais lactantes para o tratamento terapêutico

ou profilático dos fetos e/ou seus bebés ou filhotes lactentes.

Lisboa,

Bifidobacterium breve (CECT sob N° de Acesso N° 7263)

TCGNGTNNGAAGNACAATAAAACACNTAAGTGCCTTGCTCCCTAACAAAAGA
 GGTTTACAACCCGCAAGGCCTCCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAG
 GCTTGCGCCCATTGATGCAATATTCCCCANTGCTGCCTCCCGATANGAGT
 CTGGGCGGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCGGC
 TACCCGTCGAAGCCATGGTGGGCGGTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGA
 CGCGACCCCATCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGT
 GATGGAGCATCCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCCGGTGCAT
 GGGGCGGTGCGGTACGCGATTACTACCCGTTCCGCACTCTCACCACCAG
 GCAAAGCCCGATGGATCCCGTTGCACTTGCAATGTGTTAAGCACGCCGCCA
 GCGTTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAA

Bifidobacterium breve (CECT sob N° de Acesso N° 7264)

TNCGCGANGAAGAAATAAAACAAAGTGCCTTGCTCCTAACAAAAGAGGTT
 TACAACCCGAANGCCTCCATNCCTCACGNGGNGTCNCATGCATCAGGCTT
 GCGCCCATTTGTGNAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTANGAGTCTGGGC
 CGTATCTNANTCCCAATGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGT
 CGAAGCCATGGTGGGCGGTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGACGCGAC
 CCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGTGATGGA
 GCATCCGGCATTACCACCCGTTTGCAGGAGCTATTCCGGTGCATGGGGCA
 GGTCNGTNACGCATTACTNACCCGTTCCGCACTCTCACCACCAGGCAAAG
 CCCGATGGATCCCGTTGCACTTGCAATGTGTTAAGCACGCCGCCNGCGTTC
 ATCCNNAACAGGATCAAACCTCTAA

Lactobacillus reuteri (CECT sob N° de Acesso N° 7260)

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
 GAGCTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
 CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
 CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
 CTTACCACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
 CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
 ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCGCGCACTCACTGGTG
 ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACCTCTAA

Lactobacillus plantarum (CECT sob N° de Acesso N° 7262)

GGCCTGGGAANCCGGTCATACCTGGAACAGGTTACCTCTCAGATATGGTTCTTCTTTAA
 CAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGCGCTTGCTCCATCAGACT
 TTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTC
 AGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGCGGTACGTATCATTGCCATGGTGAGCC
 GTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCA
 TCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAG
 GTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTTGTTACTCACCACTTCGCCACTCAC
 TCAANTGTAATTCATGATGCAAGCACCAATCATTACCAGAGTTGCTTCGACTTGCAATGT
 ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGACAGGATCAAACCTCTA

Figura 1A

Lactobacillus fermentum (CECT sob N° de Acceso N° 7265)

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
 CGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGTGTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTG
 GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTTGTGG
 CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTACCCCAACCA
 CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
 TGTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCCC
 GCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAA
 TCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTTCGACTTGCATGTATTA
 GGCACACCGCCGCGCTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

Lactobacillus reuteri (CECT sob N° de Acceso N° 7266)

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAACA
 ACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGTGTGCTCCATCAGGCTTG
 CGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAG
 TTCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGT
 TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATC
 TTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAAT
 GTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTG
 GTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACT
 TGCATGTATTAGGCACACCGCCGCGCTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

Enterococcus hirae EH11:

GACAGTTACTCTCATCTTGTTCCTTCTTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAACCTT
 CTTCACTCACGCGCGCTTGCTCGGTACAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
 CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCCCTCTCA
 GGTCCGGCTATGCATCGTTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
 CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
 ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
 CCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCCTCTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
 AAAAAAGAGCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAG
 GT

Lactobacillus plantarum LG14:

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCA
 CTCACGCGCGCTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
 TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCCTCTCAGGTCC
 GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
 CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
 TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCAC
 GTGTTACTCACAGTTCCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCATCAA
 TACCAGAGTTCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAG

Figura 1B

***Enterococcus faecalis* EFG1:**

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
 GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
 TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
 CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTA
 GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCA

***Lactobacillus salivarius* CELA200:**

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCT
 CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGGCGTNTGCTC
 CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTCCGGCTACGTATCATCACC
 TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
 GNAGAACCATCTTTTCACTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
 TGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
 GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCCGGTGTAAAGAAAGTTTCGTTGACTT
 GCATGTATTAGGCACGCCCGCCAGCGTTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

***Lactobacillus reuteri* PDA3:**

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
 GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
 CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
 CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAAGCCGTTAC
 CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
 CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAATGTT
 ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
 ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACACCGCCGCGGTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Figura 1C

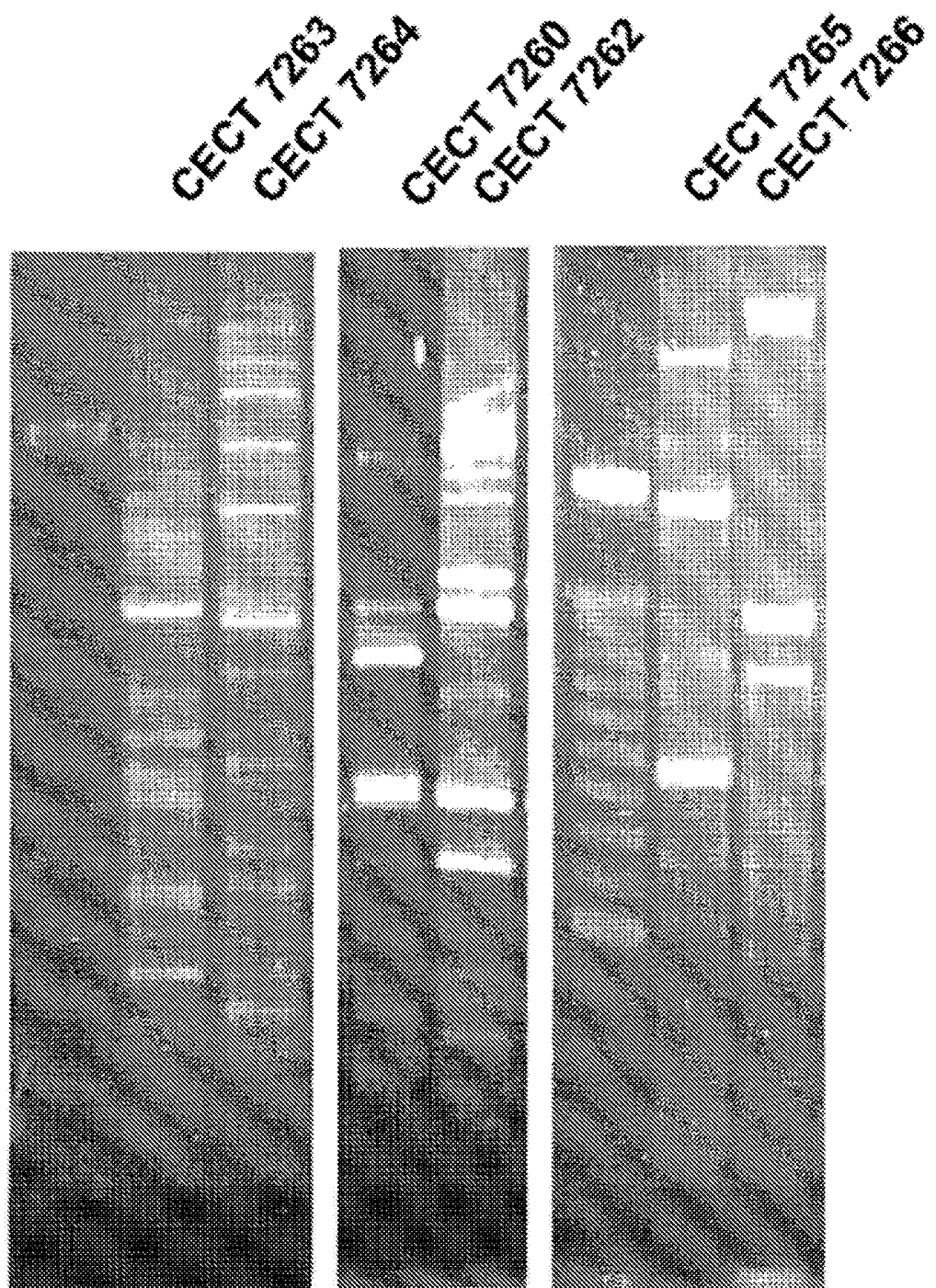
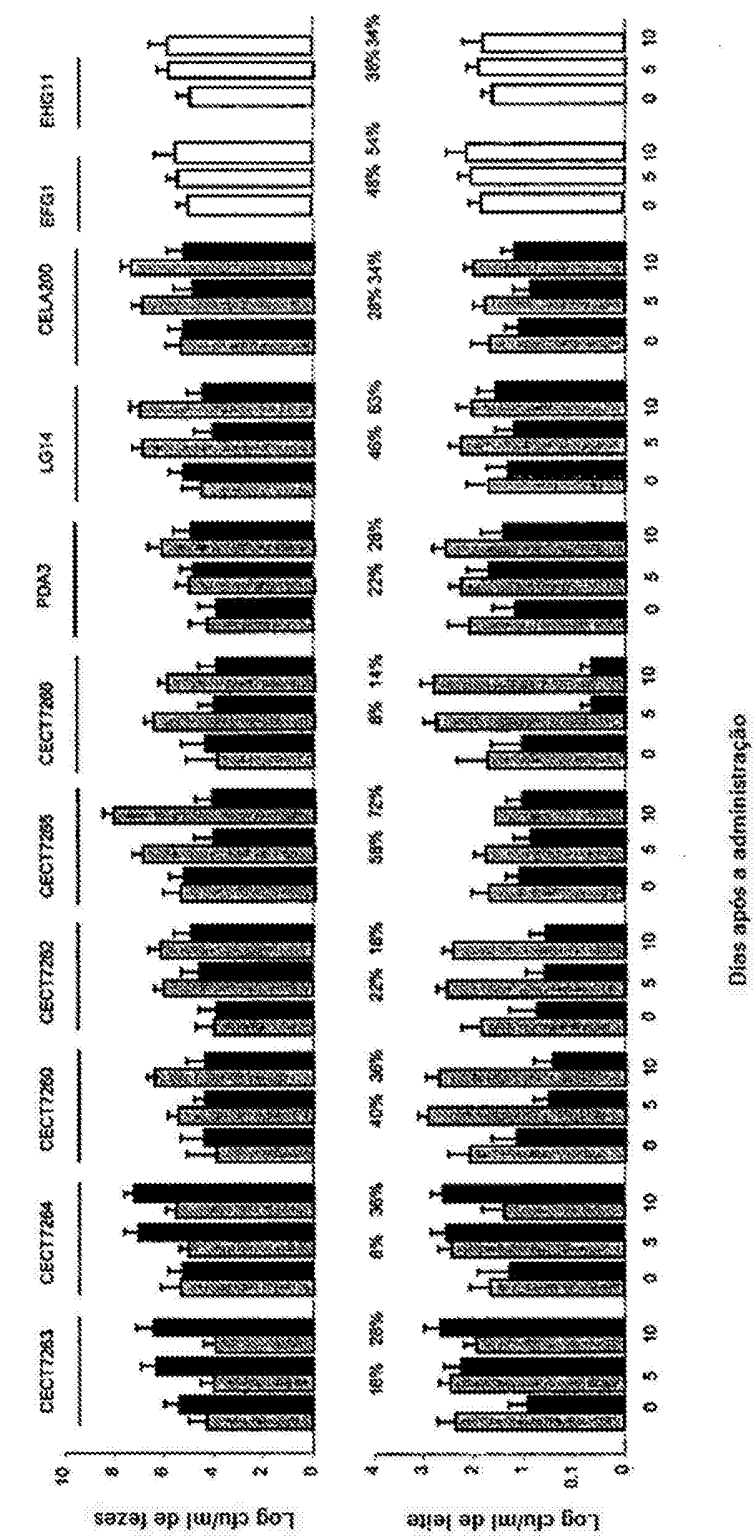


Figura 1D



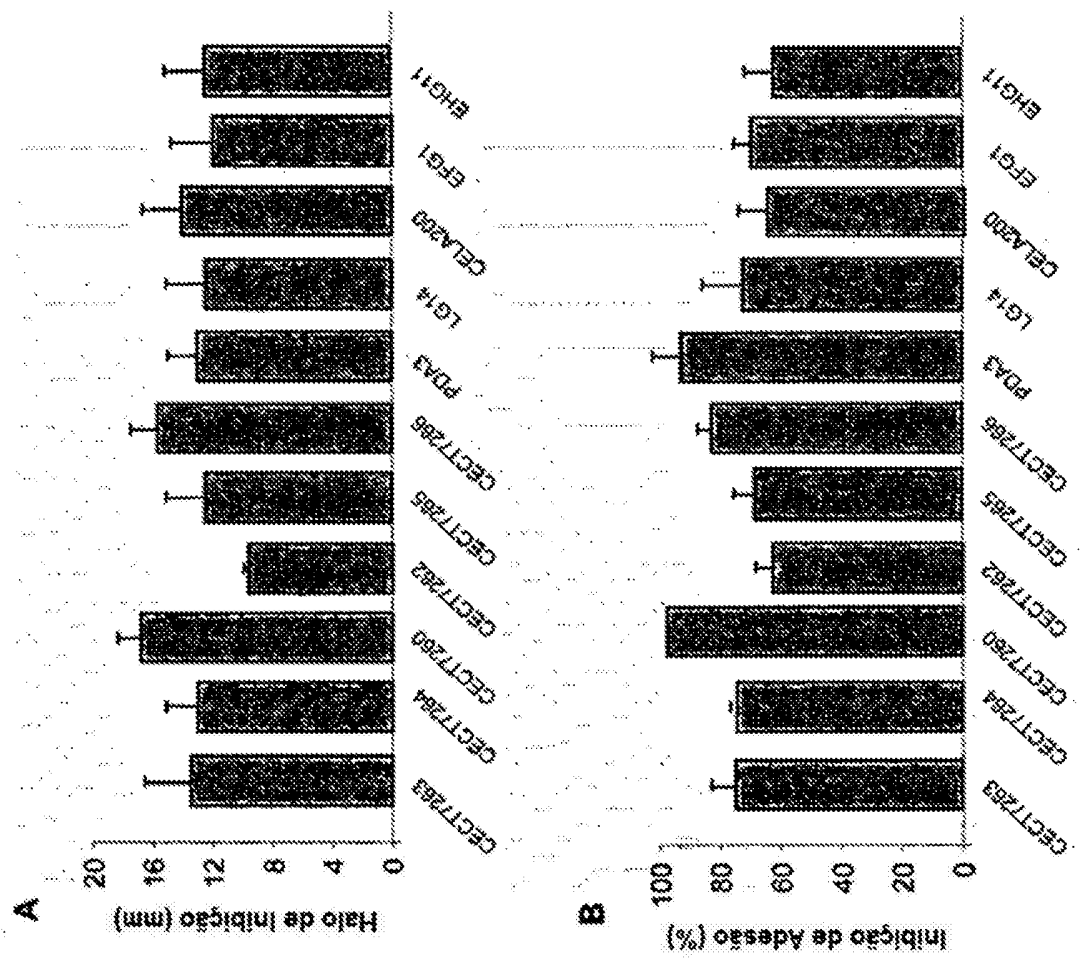


Figura 3

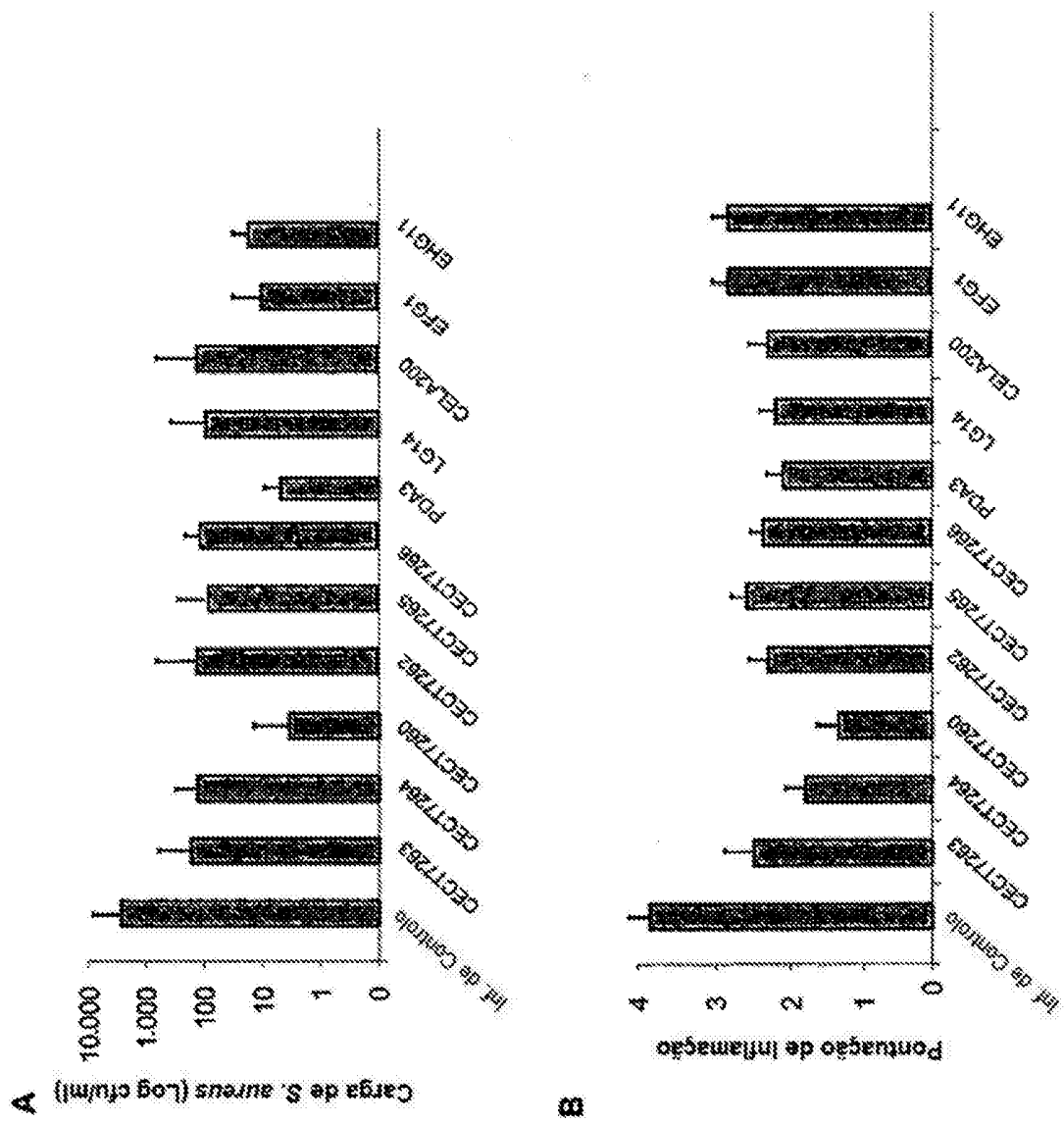


Figura 4

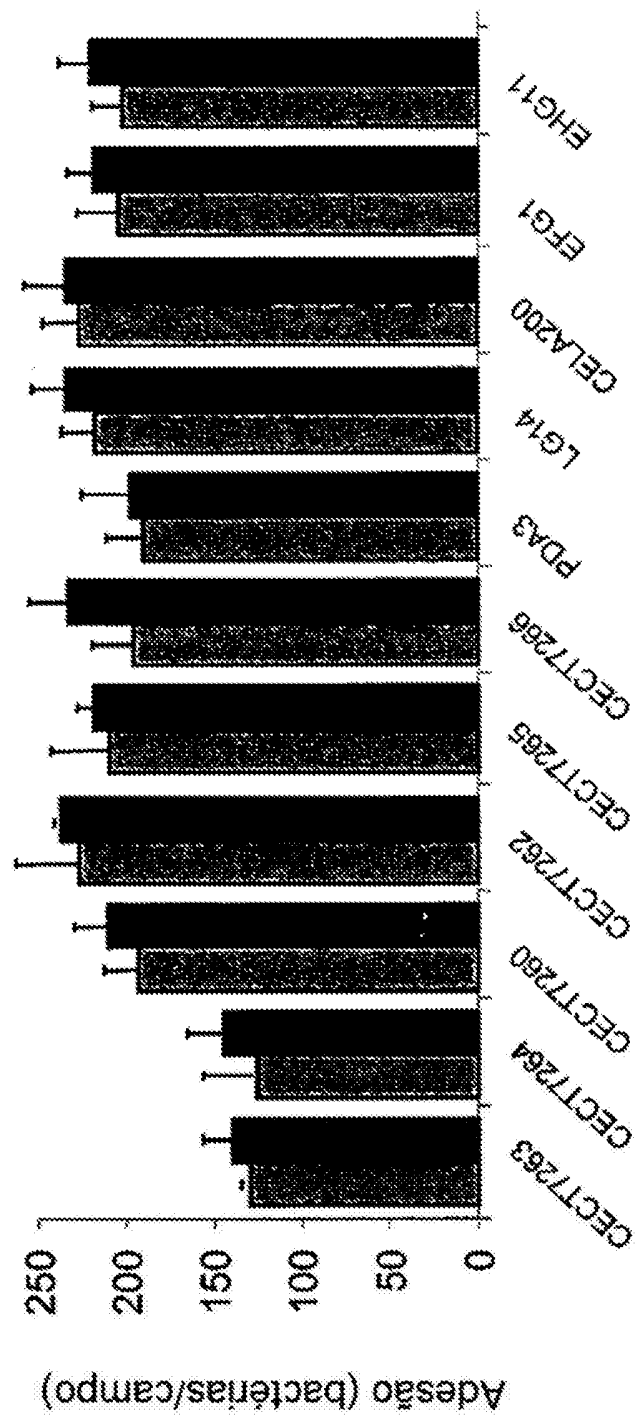


Figura 5

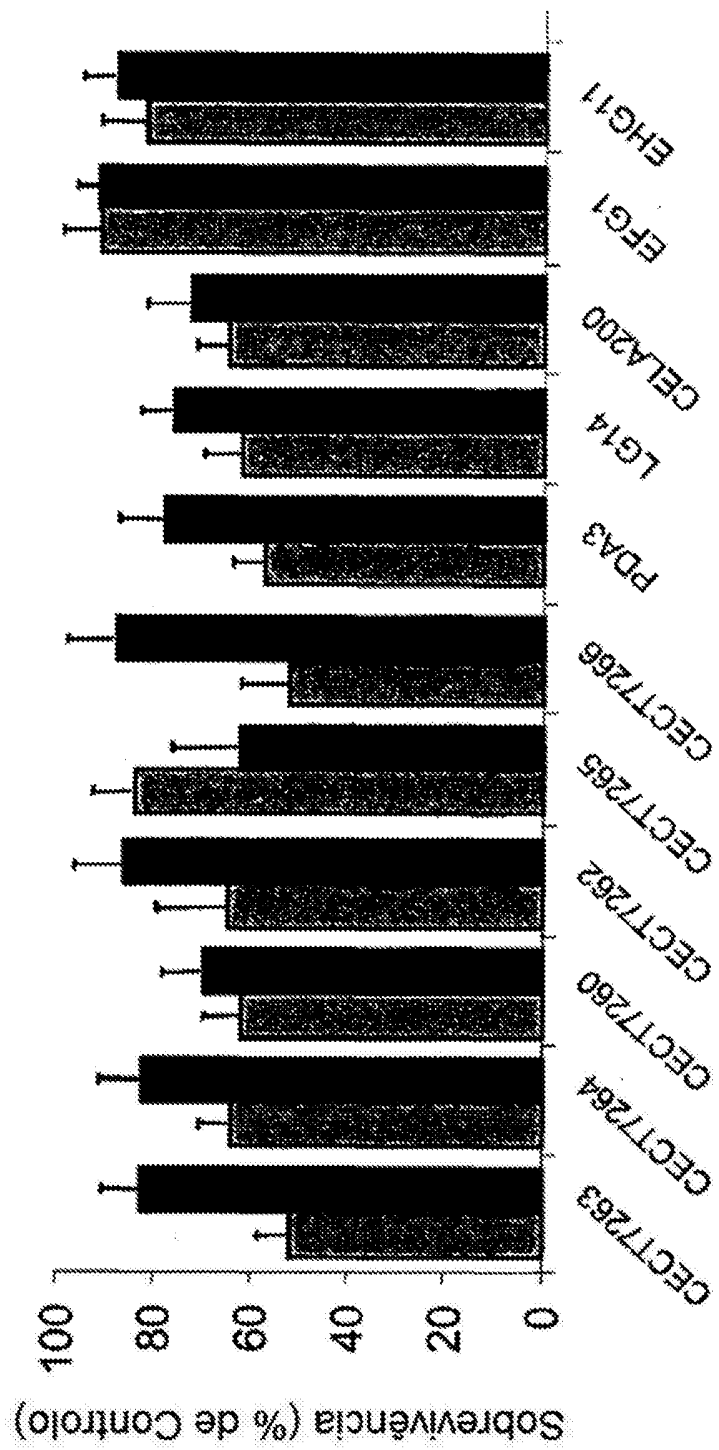


Figura 6

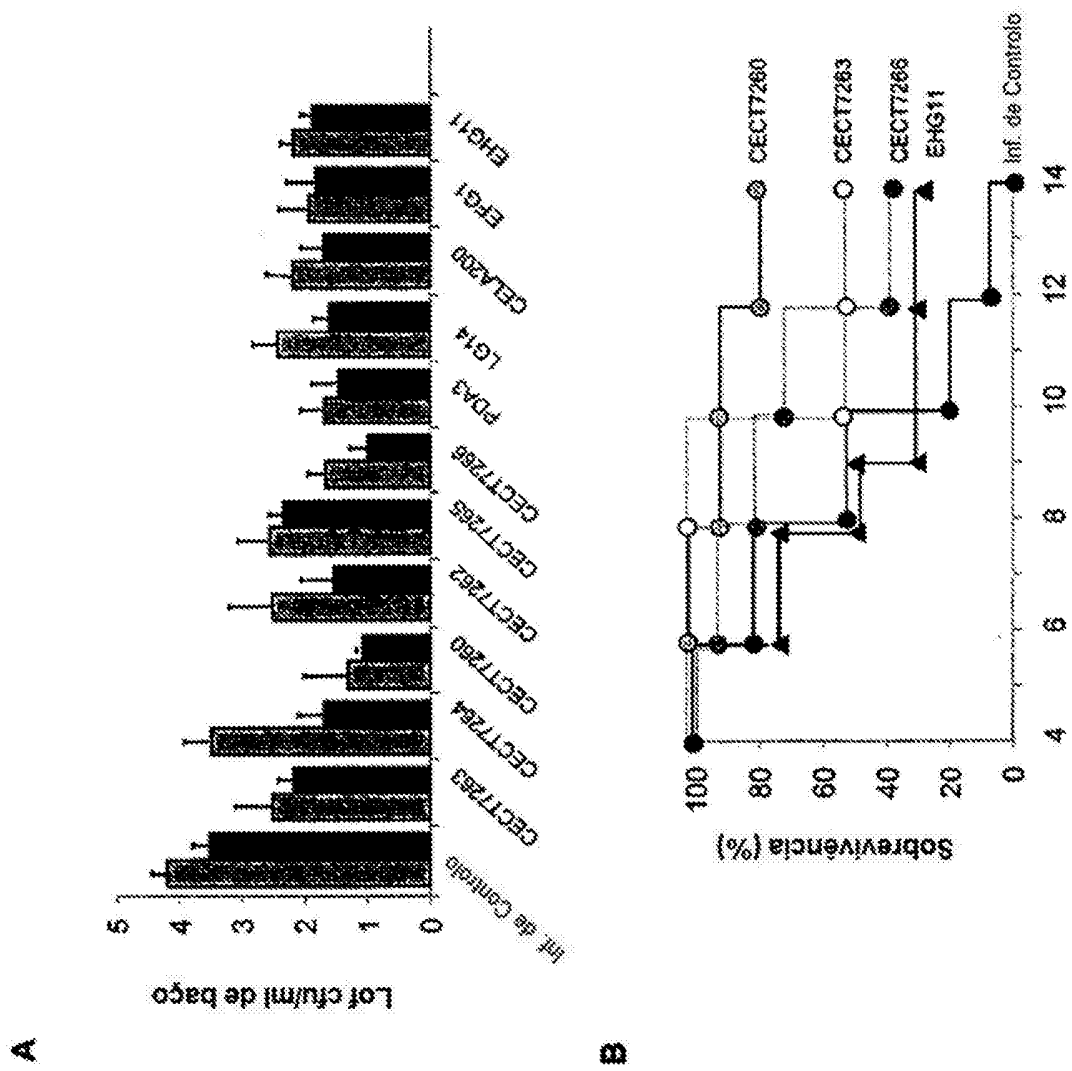


Figura 7

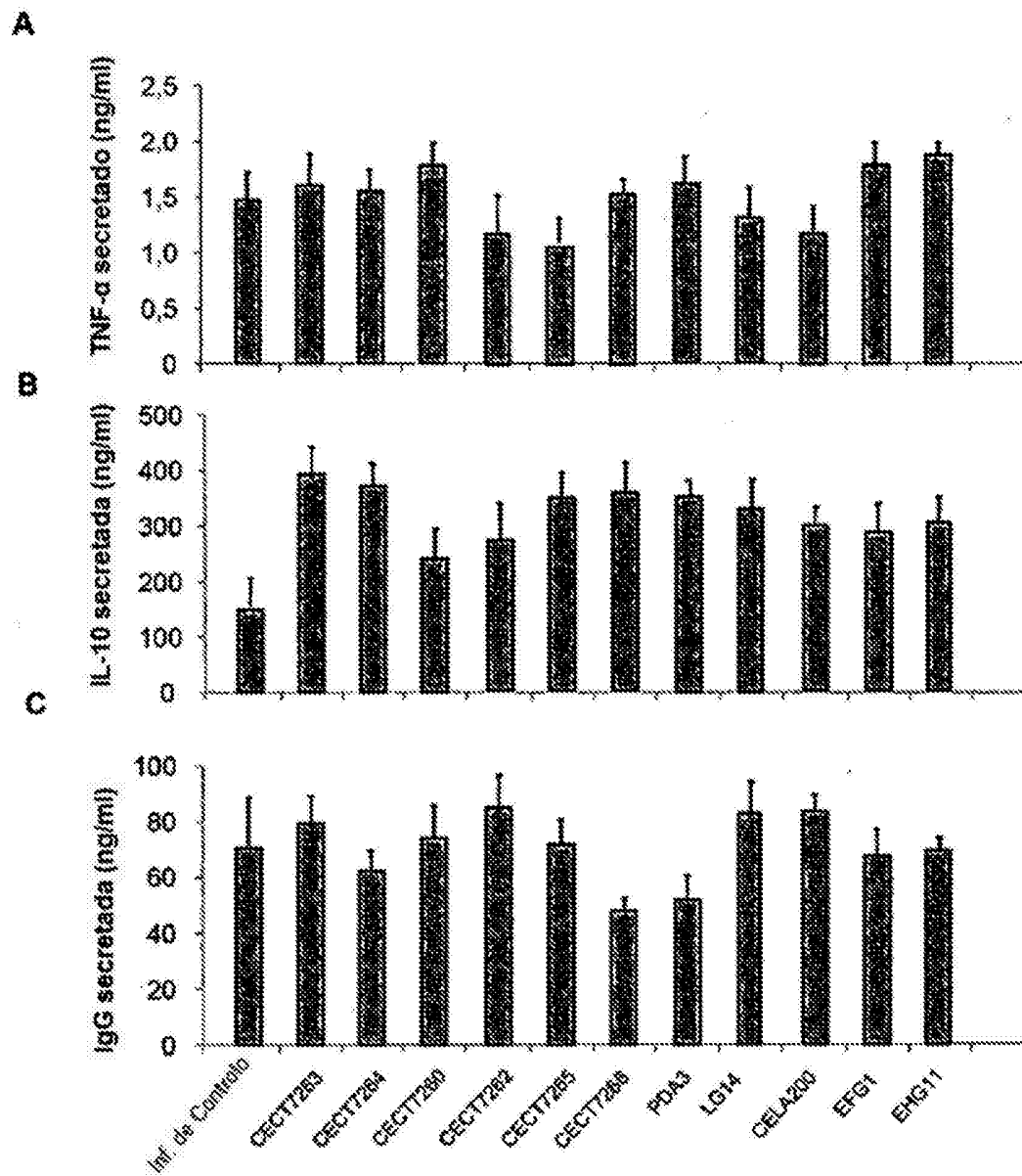


Figura 8