



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019026477-9 A2



(22) Data do Depósito: 14/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CEPAS BACTERIANAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/74; A23L 33/135; A61P 25/28.

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2018 GB 1805990.7; 11/04/2018 GB 1805989.9; 11/04/2018 GB 1805991.5; 14/06/2017 GB 1709465.7; 15/06/2017 GB 1709526.6; (...).

(71) Depositante(es): 4D PHARMA RESEARCH LIMITED.

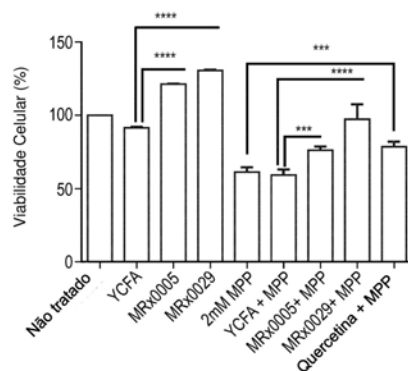
(72) Inventor(es): IMKE ELISABETH MULDER; ANNA ETTORRE; SUAAD AHMED; PARTHENA FOTIADOU; JOSEPH ROBY IRINGAN URCIA; HELENE SAVIGNAC.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018065809 de 14/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/229189 de 20/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 12/12/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a composições compreendendo cepas bacterianas para tratamento e prevenção de um distúrbio neurodegenerativo.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CEPAS BACTERIANAS"**.

CAMPO TÉCNICO

[0001] A presente invenção refere-se ao campo das composições compreendendo cepas bacterianas isoladas do trato digestivo de mamíferos e o uso destas composições no tratamento de doenças.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] O intestino humano é considerado estéril *in utero*, mas é exposto a uma ampla variedade de micróbios maternos e ambientais imediatamente após o nascimento. A partir daí, ocorre um período dinâmico de colonização e sucessão microbiana, que é influenciado por fatores como modo de transmissão, ambiente, dieta e genótipo do hospedeiro, os quais impactam na composição da microbiota intestinal, particularmente no início da vida. Posteriormente, a microbiota se estabiliza e amadurece [1]. A microbiota intestinal humana contém mais de 500-1000 filotipos diferentes pertencentes essencialmente a duas principais divisões bacterianas, os Bacteroidetes e os Firmicutes [2]. As relações simbióticas bem-sucedidas que surgem da colonização bacteriana do intestino humano produziram uma ampla variedade de funções metabólicas, estruturais, protetoras e outras funções benéficas. As atividades metabólicas aprimoradas do intestino colonizado garantem que componentes outrora indigeríveis sejam degradados com a liberação de subprodutos, fornecendo uma importante fonte de nutrientes para o hospedeiro. Da mesma forma, a importância imunológica da microbiota intestinal é bem reconhecida e é exemplificada em animais livres de germes que têm um sistema imunológico debilitado que é funcionalmente reconstituído após a introdução de bactérias comensais [3-5].

[0003] Mudanças dramáticas na composição da microbiota foram documentadas em distúrbios gastrointestinais, como a doença inflamatória intestinal (DII). Por exemplo, os níveis de bactérias *Clostridium* cluster XIVa são reduzidos em sujeitos com DII, enquanto os números de *E. coli* são

elevados, sugerindo uma mudança no equilíbrio de simbioses e patobiontes dentro do intestino [6-9].

[0004] Em reconhecimento do potencial efeito positivo que certas cepas bacterianas podem ter no intestino animal, várias cepas têm sido propostas para uso no tratamento de várias doenças (ver, por exemplo, [10-13]). Além disso, certas cepas, incluindo principalmente as de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, foram propostas para uso no tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes que não estão diretamente ligadas ao intestino (ver [14] e [15] para análise). Entretanto, a relação entre diferentes doenças e diferentes cepas bacterianas, e os efeitos precisos de cepas bacterianas específicas no intestino e a um nível sistêmico e em quaisquer tipos específicos de doenças são mal caracterizados, particularmente para distúrbios neurodegenerativos.

[0005] Recentemente, houve um interesse crescente na técnica em relação a alterações no microbioma intestinal que podem desempenhar um papel fisiopatológico nas doenças cerebrais humanas [16]. Evidências pré-clínicas e clínicas estão sugerindo fortemente uma ligação entre o desenvolvimento do cérebro e a microbiota [17]. Um crescente corpo de literatura pré-clínica demonstrou sinalização bidirecional entre o cérebro e o microbioma intestinal, envolvendo vários sistemas de sinalização neurócrina e endócrina. De fato, níveis elevados de espécies de *Clostridium* no microbioma foram associados a distúrbios cerebrais [18], e um desequilíbrio dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* também foi implicado em distúrbios do desenvolvimento cerebral [19]. Sugestões de que níveis alterados de comensais intestinais, incluindo os dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella* e *Ruminococcus* e da família *Alcaligenaceae* estejam envolvidos em distúrbios imunomediados do sistema nervoso central (SNC), são questionadas por estudos que sugerem uma falta de alteração na microbiota entre pacientes e sujeitos saudáveis [10]. *Parabacteroides distasonis* foi proposto para o tratamento de uma variedade de distúrbios, incluindo

asma, artrite reumatoide e esclerose múltipla [20].

[0006] Como a asma e a artrite reumatoide, a esclerose múltipla é principalmente mediada pelo sistema imunológico. O sistema imunológico ataca os axônios mielinizados no sistema nervoso central, destruindo a mielina chamada placas ou lesões. A desmielinização ocorre em particular nas regiões dos nervos ópticos, medula espinhal subpial, tronco cerebral, cerebelo e substância branca justacortical e periventricular.

[0007] Como tal, a esclerose múltipla tem uma patologia diferente de outras doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer ou demência. Por exemplo, a esclerose múltipla é comumente diagnosticada em pacientes na faixa dos 20 e 30 anos, enquanto muitas outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, Alzheimer e demência, são diagnosticadas predominantemente em pacientes com idade superior a 65 anos.

[0008] A doença de Parkinson, como muitas doenças neurodegenerativas, é principalmente mediada pelo acúmulo de proteínas defeituosas. A doença de Parkinson é uma sinucleinopatologia que envolve o acúmulo de α -sinucleína, que se agregam como fibrilas insolúveis nos corpos de Lewy no citoplasma do corpo neuronal. O acúmulo de α -sinucleína é tóxico e prejudica as funções das mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático e interfere no transporte de microtúbulos.

[0009] Os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), como o ibuprofeno, foram testados quanto à eficácia no tratamento de uma variedade de doenças neurológicas, mas o impacto clínico dos NSAIDs em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson permanece incerto. Enquanto alguns estudos mostraram que o uso crônico de NSAID é protetor contra a doença de Parkinson, outros estudos não puderam confirmar a existência de um relacionamento significativo. Uma metanálise recente indicou que o uso de NSAID sem aspirina, particularmente o ibuprofeno, reduz o risco de DP em 15%, enquanto o uso de aspirina não mostrou nenhum efeito [21].

[0010] Atualmente, o efeito prático da relação entre o microbioma e as doenças cerebrais humanas é pouco caracterizado. Consequentemente, são necessários estudos analíticos mais diretos para identificar o impacto terapêutico da alteração do microbioma nos distúrbios neurodegenerativos.

[0011] Existe uma necessidade na técnica de novos métodos de tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Existe também uma necessidade de que os potenciais efeitos das bactérias intestinais sejam caracterizados, de modo que novas terapias que usam bactérias intestinais possam ser desenvolvidas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] Os inventores desenvolveram novas terapias para o tratamento e a prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Os inventores identificaram que cepas bacterianas do gênero *Parabacteroides* podem ser eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas. Como descrito nos exemplos, a administração de composições compreendendo *Parabacteroides distasonis* pode proteger contra espécies reativas de oxigênio e prevenir inflamação, agindo assim como um neuroprotetor. Os inventores também identificaram que o tratamento com *Parabacteroides distasonis* pode reduzir a ativação de moléculas pró-inflamatórias, como NFκB e IL-6, por LPS e A53T α -sinucleína mutante. Os inventores identificaram que o tratamento com *Parabacteroides distasonis* pode reduzir a atividade de desacetilação de histonas e a peroxidação lipídica *in vitro*, o que pode ajudar a reduzir a morte celular e a apoptose. Os inventores também identificaram que *Parabacteroides distasonis* pode produzir indol que pode atenuar a inflamação e o estresse oxidativo. Além disso, os inventores demonstraram que o tratamento com *Parabacteroides distasonis* pode aumentar os níveis de quinurenina.

[0013] Os inventores também descobriram que o tratamento com *Parabacteroides distasonis* aumenta a ativação do BDNF. O BDNF é um fator de crescimento neurotrófico que demonstrou aumentar a diferenciação e a so-

brevivência dos neurônios. Assim, as composições da invenção podem ser utilizadas em um método para melhorar a sobrevivência das células nervosas no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

[0014] Em uma primeira modalidade, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*, para uso em um método de tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo.

[0015] Em modalidades particulares, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*, para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; esclerose múltipla; doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência frontotemporal e vascular; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; comprometimento cognitivo relacionado ao HIV e degeneração corticobasal.

[0016] Em modalidades preferidas, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*, para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson, como ambiental, familiar ou de Parkinson associado ao estado inflamatório geral. Os inventores identificaram que o tratamento com cepas *Parabacteroides* pode reduzir a ativação de moléculas pró-inflamatórias, tais como NFκB e IL-6, pelo LPS e pela A53Tα-sinucleína mutante em modelos *in vitro* de Parkinson ambiental e familiar. Nas modalidades preferidas, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana da es-

pécie *Parabacteroides distasonis*, para uso no tratamento da doença de Parkinson. As composições usando *Parabacteroides distasonis* podem ser particularmente eficazes no tratamento de Parkinson.

[0017] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso em um método de tratamento ou prevenção de doença neurodegenerativa de início precoce. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso em um método para prevenir ou retardar o início ou a progressão de um distúrbio neurodegenerativo.

[0018] Nas modalidades preferidas da invenção, a cepa bacteriana na composição é de *Parabacteroides distasonis*. Cepas estreitamente relacionadas também podem ser usadas, tais como as cepas bacterianas que têm uma sequência de rRNA 16S que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à sequência de rRNA 16S de uma cepa bacteriana de *Blautia hydrogenotrophica*. Preferencialmente, a cepa bacteriana tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8 ou 9. Preferencialmente, a identidade de sequência é para SEQ ID NO:9. Preferencialmente, a cepa bacteriana para uso na invenção tem a sequência de 16S rRNA representada pela SEQ ID NO:9.

[0019] Em certas modalidades, a composição da invenção é para administração oral. A administração oral das cepas da invenção pode ser eficaz para distúrbios neurodegenerativos. Além disso, a administração oral é conveniente para pacientes e profissionais e permite a distribuição para e/ou colonização parcial ou total do intestino.

[0020] Em certas modalidades, a composição da invenção compreende um ou mais excipientes ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis.

[0021] Em certas modalidades, a composição da invenção compreende uma cepa bacteriana que foi liofilizada. A liofilização é uma técnica eficaz e conveniente para preparar composições estáveis que permitem a transmissão de bactérias.

[0022] Em certas modalidades, a invenção fornece um produto alimentício compreendendo a composição conforme descrito acima.

[0023] Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição de vacina compreendendo a composição como descrita acima.

[0024] Além disso, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos, compreendendo a administração de uma composição compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*.

[0025] Em certas modalidades da invenção, a composição é para uso no tratamento de lesão cerebral. A atividade neuroprotetora das composições da invenção e sua capacidade de reduzir os níveis de atividade da histona desacetilase (HDAC) podem torná-las úteis no tratamento de lesões cerebrais. Em modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento de derrame, tal como tratamento de lesão cerebral resultante de um derrame.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0026] **Figura 1:** Viabilidade celular de células de neuroblastoma.

[0027] **Figura 2A:** regulação negativa da secreção de IL-6. **Figura 2B:** regulação negativa da secreção de IL-8.

[0028] **Figura 3:** Inibição da secreção de α -sinucleína IL-6 e IL-8.

[0029] **Figura 4:** Inibição da ativação do promotor de NF κ B induzido por α -sinucleína.

[0030] **Figura 5:** Inibição da ativação do promotor de NF κ B induzido por LPS.

[0031] **Figura 6:** Mudança na capacidade antioxidante.

[0032] **Figura 7:** Mudança na capacidade antioxidante total (oxidação lipídica).

[0033] **Figura 8:** Mudança na atividade da histona desacetilase (HDAC).

[0034] **Figura 9:** Nível de produção de Indol.

- [0035] **Figura 10:** Nível de produção de Quinurenina.
- [0036] **Figura 11:** Neuroproteção – viabilidade celular. A Figura 11 mostra os mesmos dados da Figura 1.
- [0037] **Figura 12:** Níveis de produção de metabólitos – neurotransmissores no cérebro.
- [0038] **Figura 13:** Níveis de produção de metabólitos – ácidos orgânicos no sobrenadante.
- [0039] **Figura 14:** Efeito na função da barreira intestinal.
- [0040] **Figura 15:** Nível de produção de BDNF.
- [0041] **Figura 16:** Mudança dos níveis de ROS nas células (A) U373, (B) células SH-SY5Y.
- [0042] **Figura 17:** Produção de neurotransmissores no cérebro.
- [0043] **Figura 18:** Mudanças na Expressão Hipocampal de Receptor – A) Receptor de Ocitocina, B) Receptor de Vasopressina, C) Receptor de Glicocorticoide e D) Receptor de Mineralocorticoide.
- [0044] **Figura 19:** Mudanças na Expressão Hipocampal de A) Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), B) Expressão de BDNF e C) TLR4.
- [0045] **Figura 20:** A) Mudanças na Expressão Hipocampal do Receptor 1 do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRFR1) e B) Expressão do Receptor 2 do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRFR2).
- [0046] **Figura 21:** Mudanças na Expressão Hipocampal de A) Fator de Necrose Tumoral, B) Interleucina 1b e C) IL-6.
- [0047] **Figura 22:** A) Mudanças na Expressão Hipocampal da Integrina Alfa M (CD11b) e B) Mudanças na Expressão Hipocamapal do Receptor de Serotonina 1A (receptor 5-HT1A).
- [0048] **Figura 23:** A) Mudanças na Expressão Hipocampal da Subunidade 2A do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2A) e da B) Subunidade 2B do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2B).
- [0049] **Figura 24:** Mudanças na Expressão Hipocampal de A) Receptor

de Ácido Gama-Aminobutírico A2 (GABA A2), B) Receptor de Ácido Gama-Aminobutírico B1 (GABA BR1) e C) Receptor 1 de Dopamina (DRD1).

[0050] **Figura 25:** Mudanças na Expressão de Receptor na Amígdala – A) Receptor de Ocitocina, B) Receptor de Vasopressina, C) Receptor de Glicocorticoide e D) Receptor de Mineralocorticoide.

[0051] **Figura 26:** Mudanças na Expressão na Amígdala de A) Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), B) Receptor Tipo Toll 4 (TLR-4), C) Receptor 1 do Hormônio Liberador de corticotrofina (CRFR1) e D) Receptor 2 do Hormônio Liberador de corticotrofina (CRFR2).

[0052] **Figura 27:** Mudanças na Expressão na Amígdala de A) Integrina Alfa M (CD11b), B) Interleucina-6 (IL-6), C) Subunidade 2A do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2A) e D) Subunidade 2B do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2B).

[0053] **Figura 28:** Mudanças na Expressão na Amígdala de A) Subunidade Alfa 2 do Receptor de GABA-A (GABRA2), B) Subunidade do Receptor 1 Tipo B de GABA-A (GABBR1) e C) Receptor 1 de Dopamina (DRD1).

[0054] **Figura 29:** Mudanças na Expressão no Córtex Pré-frontal de A) Receptor de Ocitocina, B) Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), C) Receptor Mineralocorticoide e D) Receptor Glicocorticoide.

[0055] **Figura 30:** Mudanças na Expressão do Córtex Pré-Frontal de A) Receptor Tipo Toll 4 (TLR-4), B) Receptor Hormonal Liberador de Corticotrofina 1 (CRFR1), C) Receptor Hormonal Liberador de Corticotrofina 2 (CRFR2) e Integrina Alfa M (CD11b).

[0056] **Figura 31:** Mudanças na Expressão do Córtex Pré-frontal de A) Interleucina-6 (IL-6), B) Subunidade 2A do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2A), C) Subunidade 2B do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2B) e D) Subunidade Alfa 2 do Receptor de GABA-A (GABRA2).

[0057] **Figura 32:** Mudanças na Expressão no Córtex Pré-frontal de A) Subunidade 1 do Receptor Tipo B do Receptor GABA-A (GABBR1) e B)

Receptor 1 da Dopamina (DRD1).

[0058] **Figura 33:** Mudanças na Expressão no Cólon de A) Triptofano Hidroxilase-1 (Tph1) e B) Indoleamina2,3-Dioxigenase-1 (IDO1).

[0059] **Figura 34:** Mudanças na Expressão no Íleo de A) Triptofano Hidroxilase-1 (Tph1) e B) Indoleamina2,3-Dioxigenase-1 (IDO1).

[0060] **Figura 35:** Mudanças nos Níveis Circulantes de Metabólitos do Triptofano A) Quinurenina, B) Triptofano e C) Índice de Metabolismo de Quinurenina/Triptofano.

[0061] **Figura 36:** Efeito na Produção de Interferon- γ a partir de Esplenócitos de camundongos alimentados com MRx0005 e MRx0029.

[0062] **Figura 37:** Efeito na produção de interleucina-1 β a partir de Esplenócitos.

[0063] **Figura 38:** Efeito na Produção de Interleucina-6 a partir de Esplenócitos.

[0064] **Figura 39:** Efeito na Produção do Fator de Necrose Tumoral a partir de Esplenócitos.

[0065] **Figura 40:** Efeito na Produção de Interleucina-10 a partir de Esplenócitos.

[0066] **Figura 41:** Efeito na Produção de Quimioatrativos CXCL1 a partir de Esplenócitos.

[0067] **Figura 42:** Mudanças nos Níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta no Ceco.

[0068] **Figura 43:** Mudanças induzidas por MRx0029 e MRX005 nos níveis de expressão gênica de Actina, Villina, Ocludina TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 e NSE.

[0069] **Figura 44:** Diferenciação de células SHSY5Y induzida por MRx0005 e MRx0029. (A-C) Imagens representativas de células imunomarcadas com Faloidina e MAP2. (D—F) Imagens de A-C mescladas com imagens DAPI. (G—I) Células imunomarcadas com β 3 tubulina. (J-L) mescladas com imagens DAPI. Ampliação x630. J-K) Análise western blot dos

efeitos do tratamento com MRx0005 e MRx0029 em células SHSY5Y. As membranas de western blot foram sondadas com anticorpos para MAP2 (M) e b3 tubulina (N). Actina foi usada como um controle de carregamento. Painéis inferiores: blots representativos de uma das seis experiências separadas; painéis superiores: intensidade densitométrica relativa.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

Cepas bacterianas

[0070] As composições da invenção compreendem uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*. Os exemplos demonstram que as bactérias deste gênero são úteis no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. As cepas bacterianas preferidas são da espécie *Parabacteroides distasonis*.

[0071] Exemplos de espécies de *Parabacteroides* para uso na invenção incluem *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides merdae* e *Parabacteroides johnsonii*. Os *Parabacteroides* se assemelham aos *Bacteroides* e são Gram-negativos, anaeróbicos obrigatoriamente, não formadores de esporos, não móveis e em forma de bastonete, e com tamanho de 0,8–1,6 × 1,2–12 μm. *Parabacteroides distasonis* é uma das espécies mais comuns nas fezes humanas. A cepa do tipo *P. distasonis* é JCM 5825^T (=CCUG 4941^T=DSM 20701^T= ATCC 8503^T) Os números de acesso do GenBank/EMBL/DDBJ para as sequências gênicas 16S rRNA das sequências gênicas 16S rRNA das cepas de *P. distasonis* JCM 5825^T, JCM 13400, JCM 13401, JCM 13402, JCM 13403 e JCM 13404 e cepas de *P. merdae* JCM 9497^T e JCM 13405 são AB238922 – AB238929, respectivamente (divulgadas neste documento como SEQ ID NOs: 1-8). Cepas exemplares também são descritas em [22].

[0072] A bactéria *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 foi testada nos Exemplos e também é referida neste documento como cepa 755 ou MRx0005. Uma sequência 16S rRNA para a cepa 755 que foi testada é fornecida na SEQ ID NO:9. A cepa 755

foi depositada junto da autoridade internacional de depósitos NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escócia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escócia) em 12 de março de 2015 como "*Parabacteroides* sp 755" e recebeu o número de acesso NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. Posteriormente mudou seu nome para 4D Pharma Research Limited.

[0073] O documento WO 2016/203220 descreve a administração da cepa 755 a camundongos e mostra que ela pode afetar processos de doenças fora do intestino (como asma e artrite). A cepa 755 também afeta os processos de doenças fora do intestino no tratamento de distúrbios neurodegenerativos descritos neste documento.

[0074] Uma sequência do genoma para a cepa 755 é fornecida na SEQ ID NO: 10. Essa sequência foi gerada usando a plataforma PacBio RS II.

[0075] As cepas bacterianas estreitamente relacionadas com a cepa testada nos exemplos também sejam eficazes para tratar ou prevenir distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, a cepa bacteriana para uso na invenção tem uma sequência de 16S rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à sequência de 16S rRNA de uma cepa bacteriana de *Parabacteroides distasonis*. Preferencialmente, a cepa bacteriana para uso na invenção tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8 ou 9. Preferencialmente, a identidade de sequência é para SEQ ID NO:9. Preferencialmente, a cepa bacteriana para uso na invenção tem a sequência de 16s rRNA representada pela SEQ ID NO:9.

[0076] Também se espera que cepas bacterianas que são biótipos da bactéria depositada sob o número de acesso 42382 sejam eficazes no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Um biótipo é uma cepa estreitamente relacionada que tem as mesmas características, ou características fisiológicas e bioquímicas muito semelhantes.

[0077] As cepas que são biótipos da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 e que são adequadas para uso na invenção podem ser identificadas sequenciando outras sequências nucleotídicas para a bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382. Por exemplo, substancialmente todo o genoma pode ser sequenciado e uma cepa de biótipo para uso na invenção pode ter pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% de identidade de sequência em pelo menos 80% de todo o seu genoma (por exemplo, em pelo menos 85%, 90%, 95% ou 99%, ou em todo o seu genoma). Outras sequências adequadas para uso na identificação de cepas de biótipo podem incluir hsp60 ou sequências repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)₅ ou REP ou [23]. As cepas de biótipo podem ter sequências com pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% de identidade de sequência com a sequência correspondente da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382.

[0078] Em certas modalidades, a cepa bacteriana para uso na invenção possui um genoma com identidade de sequência para a SEQ ID NO: 10. Nas modalidades preferidas, a cepa bacteriana para uso na invenção possui um genoma com pelo menos 90% de identidade de sequência (por exemplo, pelo menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de sequência identidade) à SEQ ID NO: 10 em pelo menos 60% (por exemplo, pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) da SEQ ID NO: 10. Por exemplo, a cepa bacteriana para uso na invenção pode ter um genoma com pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 70% da SEQ ID NO: 10 ou pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 80% da SEQ ID NO: 10, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 90% da SEQ ID NO: 10, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 entre 100% da SEQ ID NO: 10, ou pelo menos 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 70% da SEQ ID NO: 10 ou pelo menos 95% de identida-

de de sequência com SEQ ID NO: 10 através de 80% da SEQ ID NO: 10, ou pelo menos 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 90% da SEQ ID NO: 10 ou pelo menos 95% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 100% da SEQ ID NO: 10, ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 através de 70% da SEQ ID NO: 10 ou pelo menos 98% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 10 através de 80% da SEQ ID NO: 10 ou pelo menos 98% identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 em 90% da SEQ ID NO: 10 ou pelo menos 98% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10 em 100% da SEQ ID NO: 10.

[0079] Alternativamente, as cepas que são biótipos da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 e que são adequadas para uso na invenção podem ser identificadas usando o número de acesso NCIMB 42382 e análise de fragmentos de restrição e depósito e/ou análise de PCR, por exemplo, usando fluorescente polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (FAFLP) e impressão digital repetitiva do elemento de DNA (rep)-PCR ou perfil de proteínas ou sequenciamento parcial de 16S ou 23S rDNA. Nas modalidades preferidas, essas técnicas podem ser utilizadas para identificar outras cepas de *Parabacteroides distasonis*.

[0080] Em certas modalidades, as cepas que são biótipos da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 e que são adequadas para uso na invenção são cepas que fornecem o mesmo padrão da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 quando analisadas por análise de restrição de DNA ribossômica amplificada (ARDRA), por exemplo, ao usar a enzima de restrição Sau3AI (para obter exemplos de métodos e orientações, por exemplo, [24]). Alternativamente, as cepas de biótipo são identificadas como cepas que possuem os mesmos padrões de fermentação de carboidratos da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382.

[0081] Outras cepas de *Parabacteroides* que são úteis nas composi-

ções e métodos da invenção, tais como biótipos da bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382, podem ser identificadas usando qualquer método ou estratégia apropriada, incluindo os ensaios descritos nos exemplos. Por exemplo, as cepas para uso na invenção podem ser identificadas cultivando-se com células de neuroblastoma e depois avaliando os níveis de citocinas e os níveis de neuroproteção ou neuroproliferação. Particularmente, as cepas bacterianas que têm padrões de crescimento, tipo metabólico e/ou antígenos de superfície semelhantes à bactéria depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 podem ser úteis na invenção. Uma cepa útil terá atividade moduladora imunológica comparável à cepa NCIMB 42382. Em particular, uma cepa de biótipo irá induzir efeitos comparáveis no modelo de hipersensibilidade visceral aos efeitos mostrados nos Exemplos, que podem ser identificados usando os protocolos de cultura e liberação descritos nos Exemplos.

[0082] Uma cepa particularmente preferida da invenção é a cepa *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382. Esta é a cepa 755 exemplificativa testada nos exemplos e que se mostrou eficaz no tratamento de doenças. Portanto, em outro aspecto, a invenção fornece uma célula da cepa de *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382, ou um derivado desta. A invenção também fornece uma composição compreendendo uma célula da cepa de *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382, ou um derivado desta. A invenção também fornece uma cultura biologicamente pura da cepa *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382. A invenção também fornece uma célula da cepa de *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382, ou um derivado desta, para uso em terapia, em particular para as doenças descritas neste documento.

[0083] Um derivado da cepa depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 pode ser uma cepa filha (descendência) ou uma cepa culti-

vada (subclonada) a partir do original. Um derivado de uma cepa da invenção pode ser modificado, por exemplo, a nível genético, sem ablação da atividade biológica. Particularmente, uma cepa derivada da invenção é terapeuticamente ativa. Uma cepa derivada terá atividade moduladora imunológica comparável à cepa NCIMB 42382 original. Particularmente, uma cepa de biótipo irá induzir efeitos comparáveis nos modelos de doença neurodegenerativa e efeitos comparáveis nos níveis de citocina aos efeitos mostrados nos Exemplos, que podem ser identificados usando os protocolos de cultura e liberação descritos nos Exemplos. Um derivado da cepa NCIMB 42382 será geralmente um biótipo da cepa NCIMB 42382.

[0084] As referências às células da cepa de *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 englobam quaisquer células que tenham as mesmas características de segurança e eficácia terapêutica que as cepas depositadas sob o número de acesso NCIMB 42382 e essas células são englobadas pela invenção.

[0085] Nas modalidades preferidas, as cepas bacterianas nas composições da invenção são viáveis e capazes de colonizar parcial ou totalmente o intestino.

[0086] Os inventores descobriram que as cepas de *Parabacteroides distasonis* reduzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8. A IL-8 está implicada na formação da bainha de mielina. A inflamação crônica induzida por IL-6 pode levar à morte celular. Portanto, as cepas bacterianas da invenção são particularmente úteis no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Em algumas modalidades, as cepas bacterianas são úteis no tratamento de condições caracterizadas pela ativação aprimorada de IL-6. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas caracterizadas por desmielinização. Muitas doenças neurodegenerativas são caracterizadas por desmielinização. A desmielinização impede a propagação de potenciais de ação dentro dos neurônios, prejudi-

cando a comunicação eficaz dentro do sistema nervoso. Demonstrou-se que a IL-8 contribui positivamente para a formação e reparo da bainha de mielina. O MRx0029 aumenta a secreção *per se* de IL-8. Portanto, as composições da invenção são particularmente benéficas no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos caracterizados por desmielinização.

[0087] Os inventores também descobriram que as cepas bacterianas da invenção aumentam a ativação do BDNF. O BDNF é um fator de crescimento neurotrófico que demonstrou aumentar a diferenciação e a sobrevivência dos neurônios. Assim, as composições da invenção podem ser utilizadas em um método para melhorar a sobrevivência das células nervosas no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

[0088] Uma outra bactéria que pode ser utilizada nas composições da invenção é a espécie *Megasphaera massiliensis*. Os exemplos demonstram que a *Parabacteroides distasonis* e a *Megasphaera massiliensis* têm atividades neuroprotetoras, mas produzem metabólitos diferentes e podem ter diferentes mecanismos de ação e atividades neuroprotetoras específicas. Portanto, essas espécies podem ser particularmente eficazes quando usadas em combinação. Em modalidades preferidas, a composição compreende uma cepa da espécie *Parabacteroides distasonis* e uma cepa da espécie *Megasphaera massiliensis*.

[0089] A bactéria *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 foi testada nos Exemplos e também é referida neste documento como cepa MRx0005. MRX0005, MRX005, MRx005 e MRx0005 são utilizados neste documento de forma intercambiável. Uma sequência 16S rRNA para a cepa MRx0005 que foi testada é fornecida na SEQ ID NO:9. A cepa MRx0005 foi depositada com a autoridade internacional de depósitos NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escócia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escócia) em 12 de março de 2015 como “*Parabacteroides*

sp 755” e recebeu o número de acesso NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. Posteriormente mudou seu nome para 4D Pharma Research Limited.

[0090] A cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787 é a cepa exemplar MRx0029 testada nos exemplos e demonstrou ser eficaz no tratamento de doenças. A cepa NCIMB 42787 foi depositada junto da autoridade internacional de depósitos NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escócia) por 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escócia) em 13 de julho de 2017 como “*Megasphaera massiliensis* MRx0029” e recebeu o número de acesso NCIMB 42787. Portanto, em outro aspecto, a invenção fornece uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado desta. A invenção também fornece uma composição compreendendo uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado desta. A invenção também fornece uma cultura biologicamente pura da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787. A invenção também fornece uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado desta, para uso em terapia, em particular para as doenças descritas nesta.

[0091] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado ou biótipo desta, e a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42382, ou um derivado ou biótipo da mesma, preferencialmente para uso em terapia, preferencialmente para uso no tratamento de uma doença neurodegenerativa como a doença de Parkinson.

Usos terapêuticos

[0092] Como demonstrado nos exemplos, as composições bacterianas da invenção são eficazes no tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

Em particular, o tratamento com composições da invenção aumenta a neuroproliferação e atua como um neuroprotetor contra agentes que destroem neurônios dopaminérgicos. Portanto, as composições da invenção podem ser úteis para tratar ou prevenir distúrbios neurodegenerativos que são o resultado da morte de neurônios.

[0093] As composições da invenção podem diminuir a ativação do promotor NF κ B, que ativa a produção de citocinas, por exemplo IL-1 β , IL-1 α , IL-18, TNF α e IL-6. O tratamento de células com α -sinucleína mutante é um modelo para o Parkinson familiar. Uma mutação pontual na posição 53 de adenina para treonina leva a um enovelamento anormal da α -sinucleína. A α -sinucleína enovelada incorretamente posteriormente se agrega em fibrilas insolúveis que formam corpos de Lewy. Portanto, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos que são resultado de neuroinflamação, enovelamento anormal de proteínas e/ou exposição ambiental. As composições da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de Parkinson familiar. A ativação do promotor NF κ B é mediada através do ligante de TLR4. Sabe-se que o TLR4 media a morte celular no modelo de camundongo MPTP, que simula a doença de Parkinson. As composições da invenção podem ser usadas para inibir a capacidade de sinalização TLR4 de ativar o promotor NF κ B. De particular relevância para a DP, tanto o TLR2 quanto o TLR4 foram encontrados regulados positivamente no cérebro de pacientes com DP [25]. Além disso, a α -syn foi descrita como um ligante para TLR2 [26] e demonstramos que a α -syn também é um ligante para TLR4 usando células HEK-TLR4.

[0094] As composições da invenção diminuem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, que podem ser induzidas por lipopolissacarídeo (LPS). O tratamento de células com LPS simula Parkinson causado por fatores ambientais. As composições da invenção podem ser usadas para diminuir a secreção de IL-6. As composições da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de Parkinson ambiental.

[0095] Postula-se que as quimiocinas tenham funções importantes no sistema nervoso central (CNS), além de seu principal papel na migração direcional de leucócitos. Em uma linhagem celular precursoras de oligodendrócitos murinos, a quimiocina MCP-1 não aumentou a proliferação de precursores de oligodendrócitos. Nas culturas mielinizadas primárias, o MCP-1 não melhorou a formação do segmento de mielina neste sistema. Os inventores descobriram que o MRx0005 promove os níveis de MCP-1. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento dos níveis de MCP-1 no tratamento de doenças.

[0096] Exemplos de doenças neurodegenerativas a serem tratadas pelas composições da invenção incluem: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia por pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; Doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; esclerose múltipla; Doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; Doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência vascular e frontotemporal; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; Comprometimento cognitivo relacionado ao HIV e degeneração corticobasal. Outras doenças neurodegenerativas a serem tratadas pelas composições da invenção é a neuropatia inflamatória progressiva.

[0097] Em certas modalidades, as composições da invenção podem ser eficazes para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos que ocorrem em pacientes idosos. Os exemplos mostram que as composições da invenção podem tratar a doença de Parkinson, que é predominantemente diagnosticada em pacientes com mais de 65 anos de idade. Nas modalidades preferidas, as composições da invenção são para o tratamento de pacientes com 65 anos ou mais. Em outras certas modalidades, os pacientes têm

entre 40 e 65 anos de idade. Em outras modalidades, os pacientes têm mais de 40 anos. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma doença associada à idade avançada, por exemplo, uma doença diagnosticada após os 50 anos de idade.

[0098] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo mediado ou caracterizado pelo acúmulo de proteína, em particular proteína defeituosa.

[0099] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo associado à perda neuronal de substância cinzenta. Em certas modalidades, as composições da invenção são para o tratamento de um distúrbio neurodegenerativo que não está associado a lesões de substância branca.

[00100] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo associado aos sintomas permanentes.

[00101] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo que não é um distúrbio autoimune. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo que não é esclerose múltipla.

[00102] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução da morte de neurônios, em particular no tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na proteção de neurônios, em particular no tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

[00103] As propriedades neuroprotetoras das composições da invenção, como mostrado nos exemplos, significam que as composições podem ser particularmente eficazes para prevenir ou retardar o início ou a progressão de distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso de retardar o início ou progressão de distúrbios

neurodegenerativos.

[00104] As composições da invenção podem aumentar a secreção de IL-8. Foi demonstrado que a IL-8 desempenha um papel na mielinização dos neurônios. Em algumas modalidades, as composições da invenção podem ser usadas para aumentar a secreção de IL-8.

[00105] As composições terapêuticas da invenção podem aumentar a ativação do BDNF. O BDNF atua em certos neurônios do sistema nervoso central para apoiar a sobrevivência dos neurônios existentes e ajudar no crescimento e desenvolvimento de novos neurônios e sinapses. O BDNF é ativo no hipocampo, no córtex e no prosencéfalo basal e é importante para a memória de longo prazo. As composições da invenção podem, portanto, ser utilizadas para aumentar a secreção de BDNF. As composições podem, portanto, ser utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao comprometimento da memória de longo prazo. As composições da invenção podem ser utilizadas para melhorar a memória de longo prazo, em particular para melhorar a memória de longo prazo que é prejudicada por uma doença neurodegenerativa.

[00106] Em certas modalidades, as composições da invenção aumentam a atividade metabólica das mitocôndrias nas células neuronais.

[00107] Modulação do eixo microbiota-intestino-cérebro

[00108] A comunicação entre o intestino e o cérebro (o eixo microbiota-intestino-cérebro) ocorre através de um sistema de comunicação neuro-humoral bidirecional. Evidências recentes mostram que a microbiota que reside no intestino pode modular o desenvolvimento do cérebro e produzir fenótipos comportamentais através do eixo microbiota-intestino-cérebro. De fato, várias revisões sugerem um papel do eixo microbiota-intestino-cérebro na manutenção da funcionalidade do sistema nervoso central e da disfunção implicada do eixo microbiota-intestino-cérebro no desenvolvimento de distúrbios e condições do sistema nervoso central[**Erro! Indicador não definido.**-27].

[00109] A comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino (*ou seja*, o eixo intestino-cérebro) inclui o sistema nervoso central, sistemas neuroendócrinos e neuroimunes, incluindo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), braços simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo. (ANS), incluindo o sistema nervoso entérico (ENS) e o nervo vago e a microbiota intestinal.

[00110] Como demonstrado nos exemplos, as composições da presente invenção podem modular o eixo microbiota-intestino-cérebro e reduzir a morte celular associada a distúrbios neurodegenerativos. Por conseguinte, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos, em particular aqueles distúrbios e condições associados à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro.

[00111] Em modalidades particulares, as composições são para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; Doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; esclerose múltipla; Doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; Doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência frontotemporal e vascular; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; Comprometimento cognitivo relacionado ao HIV e degeneração corticobasal.

[00112] As composições da invenção podem ser particularmente úteis para tratar ou prevenir doenças crônicas, tratar ou prevenir doenças em pacientes que não responderam a outras terapias (como tratamento com Levodopa, agonistas da dopamina, inibidores de MAO-B, inibidores de COMT, antagonistas do glutamato, e/ou anticolinérgicos) e/ou tratamento ou pre-

venção dos danos e sintomas teciduais associados à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro.

[00113] Em certas modalidades, as composições da invenção modulam o SNC. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o sistema nervoso autônomo (ANS). Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o sistema nervoso entérico (ENS). Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o eixo hipotalâmico, pituitário, adrenal (HPA). Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a via neuroendócrina. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a via neuroimune. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o CNS, o ANS, o ENS, o eixo HPA e/ou as vias neuroendócrinas e neuroimunes. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de metabólitos comensais e/ou a permeabilidade gastrointestinal de um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção podem ser usadas para modular o sistema dopaminérgico.

[00114] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por sistemas neurais. Por conseguinte, em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização em sistemas neurais. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização do sistema nervoso central. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização em neurônios sensoriais. Em outras modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização em neurônios motores. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização no ANS. Em algumas modalidades, o ANS é o sistema nervoso parassimpático. Em modalidades preferidas, as composições da invenção modulam a sinalização do nervo vago. Em outras modalidades, o ANS é o sistema nervoso simpático. Em outras modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização no sistema nervoso entérico. Em certas modalidades, a sinalização dos neurônios ANS e ENS responde direta-

te ao conteúdo luminal do trato gastrointestinal. Em outras modalidades, a sinalização dos neurônios ANS e ENS responde indiretamente aos neuroquímicos produzidos por bactérias luminiais. Em outras modalidades, a sinalização dos neurônios ANS e ENS responde a neuroquímicos produzidos por bactérias luminiais ou células enteroendócrinas. Em certas modalidades preferidas, os neurônios do ENS ativam aferentes vagais que influenciam as funções do CNS. Em algumas modalidades, as composições da invenção regulam a atividade das células enterocromafinas.

Doenças Neurodegenerativas

[00115] As tauopatias são doenças neurodegenerativas associadas à agregação patológica da proteína tau nos emaranhados neurofibrilares ou gliofibrilares no cérebro humano. A doença de Alzheimer é um exemplo de uma tauopatologia. Sinucleinopatias (também chamadas α -Sinucleinopatias) são doenças neurodegenerativas caracterizadas pelo acúmulo anormal de agregados de α -sinucleína em neurônios, fibras nervosas ou células da glia. A doença de Parkinson é um exemplo de uma sinucleinopatologia.

[00116] Há sobreposição clínica e patológica entre essas duas patologias. Os pacientes com doença de Parkinson frequentemente apresentam demência e os pacientes com doença de Alzheimer frequentemente manifestam parkinsonismo [28]. Por exemplo, a paralisia supranuclear progressiva (também conhecida como síndrome de Steele-Richardson-Olszewski) tem uma tauopatologia, mas também leva a parkinsonismo proeminente [29]. Mutações no *LRRK2* conhecidas por causar parkinsonismo estão associadas ao acúmulo de sinucleína, tau, nenhuma ou ambas as proteínas [30].

[00117] A doença corporal de Lewy (LBD) é uma doença neurodegenerativa que é uma das causas mais comuns de demência em idosos. O LBD exemplifica a existência de um continuum entre patologias tau e sinucleinológicas. O LBD compartilha características clínicas e patológicas com a do-

ença de Parkinson, demência e doença de Alzheimer [28].

[00118] Em modalidades particulares, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de tauopatias e/ou sinucleinopatias. Nas modalidades particulares, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de tauopatias. Nas modalidades particulares, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de sinucleinopatias. Em certas modalidades, as composições da invenção podem ser úteis para tratar ou prevenir uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; Doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; e demência; incluindo o corpo de Lewy; demência vascular e frontotemporal.

[00119] Nas modalidades preferidas, as composições da invenção podem ser úteis no tratamento ou prevenção da doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos. Nas modalidades preferidas, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção da doença de Alzheimer, incluindo a síndrome de Benson. Noutras modalidades preferidas, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção da demência; incluindo o corpo de Lewy; demência vascular e frontotemporal.

Doença de Parkinson

[00120] A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa comum caracterizada neuropatologicamente pela degeneração de populações heterogêneas de células neurais (células produtoras de dopamina). O diagnóstico clínico da doença de Parkinson requer bradicinesia e pelo menos

um dos seguintes sintomas principais: tremor em repouso; rigidez muscular e comprometimento do reflexo postural. Outros sinais e sintomas que podem estar presentes ou se desenvolver durante a progressão da doença são distúrbios autonômicos (sialorreia, seborreia, constipação, distúrbios de micção, funcionamento sexual, hipotensão ortostática, hiperidrose), distúrbios do sono e distúrbios no sentido do olfato ou na sensação de temperatura. A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa que pode se desenvolver ou persistir devido à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro. Portanto, em modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção da doença de Parkinson em um sujeito.

[00121] Nas modalidades adicionais preferidas, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides* para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson. As composições compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides* podem melhorar as funções motoras e cognitivas em modelos da doença de Parkinson. O tratamento com as cepas *Parabacteroides* pode modular a sinalização nos sistemas nervosos central, autonômico e entérico; pode modular a atividade da via do eixo HPA; pode modular vias neuroendócrinas e/ou neuroimunes; e pode modular os níveis de metabólitos comensais, marcadores inflamatórios e/ou permeabilidade gastrointestinal de um sujeito, todos os quais estão implicados na neuropatologia da doença de Parkinson. Nas modalidades preferidas, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana da espécie *Parabacteroides distasonis* para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson. As composições usando *Parabacteroides distasonis* podem ser particularmente eficazes no tratamento da doença de Parkinson.

[00122] Em modalidades preferidas, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam um ou mais dos sintomas da doença de Parkin-

son em um sujeito. Em modalidades preferidas, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas principais da doença de Parkinson em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam a bradicinesia em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam o tremor em repouso; rigidez muscular e/ou comprometimento do reflexo postural em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas associados à progressão da doença de Parkinson selecionados a partir de distúrbios autonômicos (sialorreia, seborreia, constipação, distúrbios de micção, funcionamento sexual, hipotensão ortostática, hiperidrose), distúrbios de sono e distúrbios no sentido do olfato ou na sensação de temperatura.

[00123] Em modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam sintomas depressivos comórbidos com a doença de Parkinson. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a memória verbal e/ou as funções executivas. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a atenção, memória de trabalho, fluência verbal e/ou ansiedade.

[00124] Em outras modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam disfunções cognitivas comórbidas com a doença de Parkinson.

[00125] Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a progressão da doença de Parkinson. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam complicações motoras posteriores. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam flutuações motoras tardias. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a perda neuronal. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas da demência da doença de Parkinson (DDP). Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, re-

duzem ou aliviam o comprometimento da função executiva, atenção e/ou memória de trabalho. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a neurotransmissão dopaminérgica. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a neurotransmissão dopaminérgica prejudicada.

[00126] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas da doença de Parkinson de acordo com uma escala sintomática ou diagnóstica. Em certas modalidades, os testes para avaliar a melhora sintomática da função motora na doença de Parkinson são a Escala Unificada de Classificação da Doença de Parkinson. Em particular, a UPDRS II considera a atividade da vida diária e a UPDRS III considera o exame motor.

[00127] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas associados à DDP de acordo em um teste e/ou escala sintomáticos ou diagnósticos. Em certas modalidades, o teste ou escala são selecionados dentre o Teste de Aprendizagem Verbal de Hopkins - Revisado (HVLRT-R); o Sistema de Função Executiva de Denis-Kaplan (D-KEFS); a Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton (HAM-D 17; depressão); a Escala de Avaliação de Ansiedade de Hamilton (HAM-A; ansiedade) e a Escala Unificada de Avaliação de Doença de Parkinson (UPDRS; gravidade dos sintomas da DP).

[00128] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram a escala da Impressão Global Clínica - Melhora Global (CGI-I) para avaliar distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Em algumas modalidades, as composições da invenção exibem um efeito positivo no comprometimento social e ocupacional global do sujeito com doença de Parkinson.

Doença de Alzheimer e demência

[00129] No DSM-5, o termo demência foi substituído pelos termos distúrbio neurocognitivo maior e distúrbio neurocognitivo leve. O distúrbio neurocognitivo é uma classe heterogênea de doenças psiquiátricas. O distúrbio

neurocognitivo mais comum é a doença de Alzheimer, seguida por demências vasculares ou formas mistas das duas. Outras formas de distúrbios neurodegenerativos (*por exemplo*, doença do corpo de Lewy, demência frontotemporal, demência de Parkinson, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Huntington e síndrome de Wernicke-Korsakoff) são acompanhadas por demência.

[00130] A doença de Alzheimer e a demência também são caracterizadas por perda neuronal, de modo que os efeitos neuroprotetores e neuroproliferativos mostrados nos exemplos para as composições da invenção indicam que eles podem ser úteis no tratamento ou prevenção dessas condições.

[00131] Os critérios sintomáticos para demência sob o DSM-5 são evidências de declínio cognitivo significativo de um nível anterior de desempenho em um ou mais domínios cognitivos selecionados dentre: aprendizado e memória; língua; função executiva; atenção complexa; cognição perceptivo-motora e social. Os déficits cognitivos devem interferir na independência nas atividades cotidianas. Além disso, os déficits cognitivos não ocorrem exclusivamente no contexto de um delírio e não são melhor explicados por outro transtorno mental (por exemplo, MDD ou esquizofrenia).

[00132] Além do sintoma primário, os sujeitos com distúrbios neurodegenerativos apresentam sintomas comportamentais e psiquiátricos, incluindo agitação, agressão, depressão, ansiedade, apatia, psicose e distúrbios do ciclo de vigília.

[00133] Os distúrbios neurodegenerativos podem se desenvolver ou persistir devido à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro. Portanto, em modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos em um sujeito. Em formas modalidades preferidas, o distúrbio neurodegenerativo é a doença de Alzheimer. Em outras modalidades, o distúrbio neurodegenerativo é selecionado dentre demências vasculares; doença de Alzheimer de forma

mista e demência vascular; doença do corpo de Lewy; demência frontotemporal; Demência de Parkinson; Doença de Creutzfeldt-Jakob; Doença de Huntington; e síndrome de Wernicke-Korsakoff.

[00134] Em modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais dos sintomas de distúrbios neurodegenerativos um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam a ocorrência de declínio cognitivo em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram o nível de desempenho de um sujeito com distúrbios neurodegenerativos em um ou mais domínios cognitivos selecionados dentre: aprendizado e memória; língua; função executiva; atenção complexa; cognição perceptivo-motora e social. Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a ocorrência de um ou mais sintomas comportamentais e psiquiátricos associados a distúrbios neurodegenerativos selecionados dentre agitação, agressão, depressão, ansiedade, apatia, psicose e distúrbios do ciclo de vigília.

[00135] Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam doenças sintomáticas por intervenção em mecanismos patogênicos suspeitos em um estágio pré-clínico. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a modificação da doença, com desaceleração ou interrupção da progressão dos sintomas. Em algumas modalidades, a desaceleração ou interrupção da progressão dos sintomas se correlacionam com evidências no atraso do processo neuropatológico subjacente. Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram os sintomas de distúrbios neurodegenerativos compreendendo melhoria cognitiva e funcional aprimorada. Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram os sintomas comportamentais e psiquiátricos da demência (BPSD). Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram a capacidade de um sujeito com distúrbio neurodegenerativo de realizar atividades diárias.

[00136] Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram a cognição e o funcionamento de um sujeito com doença de Alzheimer. Em algumas modalidades, a composição da invenção melhora o desfecho cognitivo em um sujeito com doença de Alzheimer. Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram o desfecho funcional em um sujeito com doença de Alzheimer. Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram o desfecho cognitivo e funcional em um sujeito com doença de Alzheimer. Em ainda outras modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram a resposta clínica geral (o desfecho global) em um sujeito com doença de Alzheimer.

[00137] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas de distúrbios neurodegenerativos de acordo com um teste sintomático ou diagnóstico. Em certas modalidades, os testes para avaliar a melhora sintomática da doença de Alzheimer (e outros distúrbios neurodegenerativos) são selecionados dentre cognições objetivas, atividades da vida diária, avaliação global de mudanças, testes de qualidade de vida relacionados à saúde e testes para avaliar sintomas comportamentais e psiquiátricos de distúrbios neurodegenerativos.

[00138] Em certas modalidades, os testes cognitivos objetivos para avaliação da melhora sintomática usam a subescala cognitiva da Escala de Avaliação da doença de Alzheimer (ADAS-cog) e a escala ADAS clássica. Em certas modalidades, a melhora sintomática da cognição é avaliada usando-se a Bateria de Teste Neurofisiológico para Uso na Doença de Alzheimer (NTB).

[00139] Em algumas modalidades, a avaliação global do teste de mudança usa a escala da Impressão Global Clínica – Melhora Global (CGI-I) para avaliar distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Em algumas modalidades, a escala global é a Impressão de Mudança Baseada na Entrevista com o Clínico Plus (CIBIC-plus). Em algumas modalidades, a escala global é a Impressão Global de Mudança do Clínico da Unidade de Estudo Cooperati-

vo para a Doença de Alzheimer (ADCS-CGIC).

[00140] Em certas modalidades, as medidas de qualidade de vida relacionadas à saúde são a QOL Relacionada à Doença de Alzheimer (ADRQL) e a QOL de Doença de Alzheimer (QOL-AD).

[00141] Em certas modalidades, os testes que avaliam sintomas comportamentais e psiquiátricos de distúrbios neurodegenerativos são selecionados dentre a Escala de Classificação de patologia Comportamental na Doença de Alzheimer (BEHAVE-AD); a Escala de Avaliação Comportamental para Demência (BRSD); o Inventário Neuropsiquiátrico (NPI); e o Inventário de Agitação de Cohen-Mansfield (CMAI).

[00142] Em algumas modalidades, as composições da invenção são particularmente eficazes na prevenção, redução ou alívio de distúrbios neurodegenerativos quando usadas em combinação com outra terapia para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, essas terapias incluem inibidores da acetilcolinesterase, incluindo donepezil (Ari-cept®), galantamina (Razadyne®) e rivastigmina (Exelon®) e memantina.

Esclerose Múltipla

[00143] A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante, na qual a bainha de mielina que circunda os neurônios no cérebro e na medula espinhal é danificada. As causas exatas subjacentes da MS são desconhecidas, mas acredita-se que variem entre os indivíduos. Certas formas de EM são hereditárias. Acredita-se também que fatores ambientais contribuam para a EM. Em alguns indivíduos, uma combinação de fatores genéticos e ambientais pode desencadear o aparecimento da MS.

[00144] Há uma grande variedade de sintomas associados à M. Os sujeitos podem exibir quase qualquer sintoma neurológico associado ao comprometimento dos controles autonômico, visual, motor ou sensorial. Os sintomas exatos variam de acordo com o local do dano neuronal/desmielinização.

[00145] A IL-8 tem sido implicada na formação de bainhas de mielina. As composições da invenção podem, portanto, ser utilizadas na remielinização

de neurônios em sujeitos com EM. As composições da invenção também podem ser usadas para proteger os neurônios da desmielinização. Em outras palavras, as composições da invenção podem ser utilizadas em um método de tratamento ou prevenção da esclerose múltipla, restaurando ou prevenindo a perda de bainhas de neurônios mielina.

[00146] Em algumas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas de MS em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam a fadiga em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam tremores em repouso, fraqueza muscular, espasmos musculares, rigidez muscular, parestesia e/ou ataxia em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas associados à progressão da MS selecionados na lista que consiste em distúrbios autonômicos: constipação, distúrbios de micção, funcionamento sexual, disfagia, disartria, síncope, vertigem e/ou tontura; distúrbios do sono; e distúrbios no sentido do olfato ou na sensação de temperatura. Em algumas modalidades, as composições da invenção impedem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas oculares associados à MS. Em algumas modalidades, o sintoma ocular é selecionado da lista que consiste em perda de visão, dor ocular, daltonismo, visão dupla e/ou movimentos oculares involuntários em um sujeito.

[00147] Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam tontura, vertigem, dores neuropáticas, dores musculoesqueléticas, disfunção cognitiva, incontinência intestinal, disfagia, disartria ou qualquer combinação destas.

[00148] Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam sintomas depressivos ou ansiedade comórbida com MS.

[00149] Em algumas modalidades, as melhorias dos sintomas são determinadas usando os critérios de McDonald de 2017 para o diagnóstico de

EM.

[00150] Em certas modalidades, o tratamento com as composições da invenção resulta em uma redução na incidência ou gravidade da MS. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução da incidência ou gravidade da recaída. Em certas modalidades, o tratamento com as composições da invenção previne um declínio na função motora ou resulta em uma função motora melhorada associada à MS. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção de um declínio na função motora ou para uso na melhoria da função motora no tratamento de MS. Em certas modalidades, o tratamento com as composições da invenção previne o desenvolvimento de paralisia na MS. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção de paralisia no tratamento de MS.

[00151] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção de esclerose múltipla em um paciente que foi identificado como em risco de esclerose múltipla, ou que foi diagnosticado com esclerose múltipla em estágio inicial ou esclerose múltipla "remitente-recorrente". As composições da invenção podem ser úteis para impedir o desenvolvimento de MS. As composições da invenção podem ser úteis para impedir a progressão da MS. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em um paciente identificado como tendo uma predisposição genética para a M, como o fenótipo de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), antígeno leucocitário humano (HLA) -DR2 ou HLA-DR4.

[00152] As composições da invenção podem ser úteis para gerenciar ou aliviar a esclerose múltipla. As composições da invenção podem ser particularmente úteis para reduzir os sintomas associados à esclerose múltipla. O tratamento ou a prevenção podem se referir, por exemplo, a uma atenuação da gravidade dos sintomas ou a uma redução na frequência das exacerbações ou na gama de desencadeantes que são um problema para o

paciente. Em certas modalidades, as composições da invenção retardam ou interrompem a progressão da doença.

[00153] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de MS remitente-recorrente. Em modalidades alternativas, as composições da invenção são para uso no tratamento de MS progressiva, como MS secundária progressiva (SPMS), que se desenvolve ao longo do tempo após o diagnóstico de PPMS, EM primária progressiva MS (PRMS), que exibe deterioração neurológica contínua gradual, e EM recaída progressiva (MS), que é semelhante à PPMS, mas com recaídas sobrepostas.

[00154] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um ou mais dos sintomas de MS selecionados dentre o grupo que consiste em: fadiga, problemas de visão, dormência, formigamento, espasmos musculares, rigidez muscular, fraqueza muscular, problemas de mobilidade, dor, problemas de pensamento, aprendizado e planejamento, depressão e ansiedade, problemas sexuais, problemas de bexiga, problemas intestinais, dificuldades de fala e deglutição.

Fatores neuroquímicos, neuropeptídeos e neurotransmissores e o eixo microbiota-intestino-cérebro

[00155] Como descrito acima, o eixo microbiota-intestino-cérebro é modulado por vários sistemas fisiológicos diferentes. O eixo microbiota-intestino-cérebro é modulado por várias moléculas de sinalização. Mudanças nos níveis dessas moléculas sinalizadoras resultam em doenças neurodegenerativas. As experiências realizadas pelos inventores indicam que a administração de espécies de *Parabacteroides*, e em particular *Parabacteroides distasonis*, podem modular os níveis de indol e quinurenina. A desregulação desses metabólitos pode levar a doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson.

[00156] Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de monoaminas cerebrais e seus metabólitos. Em modalidades

preferidas, o metabólito é quinurenina. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a quinurenina, que é a principal via do metabolismo do triptofano, que serve como uma rota para a produção de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). A quinurenina pode ser metabolizada em compostos neuroativos, como o ácido cinurênico (KYNA) e 3-hidroxi-1-quinurenina (3-OH-1-KYN) e, em outras etapas, no ácido quinolínic (QUIN). A desregulação da via da quinurenina pode levar à ativação do sistema imunológico e ao acúmulo de compostos potencialmente neurotóxicos. Mudanças no metabolismo da quinurenina podem estar envolvidas no desenvolvimento das doenças de Parkinson. Demonstrou-se que os níveis de quinurenina diminuíram no córtex frontal, no putâmen e na pars compacta da substância negra de pacientes com PD [31]. Portanto, em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento dos níveis de quinurenina no tratamento da doença de Parkinson.

[00157] Em certas modalidades da invenção, as composições da invenção podem aumentar os níveis de quinurenina. Demonstrou-se que níveis aumentados de quinurenina atenuadas a morte celular neuronal induzida por MPP⁺ *in vitro* em uma linhagem celular de neuroblastoma dopaminérgico humano [32]. Em certas modalidades, a quinurenina e o ácido cinurênico, podem ativar o receptor GI de aril hidrocarboneto (Ahr) e os receptores GPR35. Ativação do receptor Ahr induz a produção de IL-22, que pode inibir a inflamação local. Ativação do GPR35 induzindo a produção de trifosfato de inositol e mobilização de Ca²⁺.

[00158] Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de indol. Em modalidades preferidas, o metabólito é quinurenina. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam as rotas de quinurenina, que é a principal via do metabolismo do triptofano.

[00159] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por níveis de fatores neuroquímicos, neuropeptídeos e neurotransmissores. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção mo-

dulam níveis de fatores neuroquímicos, neuropeptídeos e neurotransmissores. Por conseguinte, em certas modalidades preferidas, as composições da invenção alteram diretamente a bioquímica do CNS.

[00160] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada pelos níveis de ácido γ -aminobutírico (GABA). Por conseguinte, em modalidades preferidas, as composições da invenção modulam os níveis de GABA. O GABA é um neurotransmissor inibitório que reduz a excitabilidade neuronal. Em certas modalidades, as composições da invenção aumentam os níveis de GABA. Em certas modalidades, as composições da invenção diminuem os níveis de GABA. Em certas modalidades, as composições da invenção mudam a neurotransmissão de GABA. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam o nível de transcrição de GABA em diferentes regiões do sistema nervoso central. Em certas modalidades, o GABA derivado comensal atravessa a barreira hematoencefálica e afeta diretamente a neurotransmissão. Em certas modalidades, as composições da invenção levam a uma redução de GABA no hipocampo, amígdala e/ou locus coeruleus. Em certas modalidades, as composições da invenção levam a um aumento de GABA nas regiões corticais.

Resposta imune

[00161] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por alterações na resposta imune e em fatores e marcadores inflamatórios. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção podem modular a resposta imune. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis sistêmicos das moléculas de sinalização neuroimune circulantes. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a produção e inflamação de citocinas pró-inflamatórias. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam o estado inflamatório. Em certas modalidades, as composições da invenção diminuem a produção e secreção de IL-6. Em certas modalidades, as composições da invenção diminuem a ativação do promotor de NF κ B. Em certas modalida-

des, as composições da invenção são capazes de modular a ativação da produção de IL-6 pelo potente lipopolissacarídeo (LPS) de endotoxina pró-inflamatório. Em certas modalidades, as composições da invenção são capazes de modular a ativação do promotor de NFkB por proteínas mutantes de LPS e α -sinucleína, como a A53T. Níveis circulantes aumentados de citocinas estão intimamente associados a vários distúrbios neurodegenerativos, incluindo Parkinson, demência e Alzheimer. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução dos níveis de IL-6 e/ou NFkB no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo.

[00162] Em algumas modalidades, as composições da invenção aumentam a secreção de IL-8. Foi demonstrado que IL-8 induz a formação da bainha de mielina e restaura ou preserva a comunicação neuronal eficaz. Assim, em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso na indução da formação de bainha de mielina no tratamento de doenças neurodegenerativas. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso na restauração da comunicação neuronal. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso na preservação da comunicação neuronal.

[00163] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por níveis de metabólitos comensais. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis sistêmicos dos metabólitos da microbiota. Em certas modalidades preferidas, as composições da invenção modulam o nível de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs). Em certas modalidades, o nível de SCFAs é aumentado ou diminuído. Em algumas modalidades, o SCFA é ácido butírico (BA) (ou butirato). Em algumas modalidades, o SCFA é ácido propiônico (PPA). Em algumas modalidades, o SCFA é ácido acético. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a capacidade dos SCFAs de atravessar a barreira hematoencefálica.

[00164] A acetilação e desacetilação de histonas são importantes regu-

ladores epigenéticos da expressão gênica. Um desequilíbrio na acetilação e desacetilação de histonas pode resultar em apoptose. A desregulação dessa histona acetiltransferase tem sido implicada na patogênese associada a doenças neurodegenerativas associadas à idade, como doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e declínio cognitivo [33]. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção podem modular a atividade da histona desacetilase. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a atividade da histona desacetilase. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a atividade da histona acetilase.

[00165] Pacientes com doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, apresentam altos níveis de peroxidação lipídica. Os lipídios são vulneráveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio, e o cérebro é rico em ácidos graxos poli-insaturados. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção podem modular a peroxidação lipídica. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a peroxidação lipídica. A redução do dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio pode ser usada para atingir precocemente os estágios das doenças neurodegenerativas. Dessa forma, em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de neurodegeneração em estágio inicial. Também dessa forma, em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção do desenvolvimento de um distúrbio neurodegenerativo. Em tais modalidades, as composições da invenção podem ser usadas em um paciente que foi identificado como em risco de desenvolver um distúrbio neurodegenerativo.

[00166] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por níveis de permeabilidade gastrointestinal. Por conseguinte, em algumas modalidades, as composições da invenção alteram a integridade do epitélio do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da inven-

ção modulam a permeabilidade do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a função de barreira e a integridade do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a motilidade do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a translocação de metabólitos comensais e moléculas de sinalização inflamatória para a corrente sanguínea a partir do lúmen do trato gastrointestinal.

[00167] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada pela composição do microbioma no trato gastrointestinal. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção modulam a composição de microbioma do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção evitam a disbiose do microbioma e aumentos associados de metabólitos tóxicos (por exemplo, LPS). Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de *Clostridium* no trato gastrointestinal. Em modalidades preferidas, as composições da invenção reduzem o nível de *Clostridium* no trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem os níveis de *Campylobacter jejuni*. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a proliferação de bactérias anaeróbicas prejudiciais e a produção de neurotoxinas produzidas por essas bactérias. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de microbioma de *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de microbioma dos gêneros *Sutterella*, *Prevotella*, *Ruminococcus* e/ou da família *Alcaligenaceae*. Em certas modalidades, as composições da invenção aumentam o nível de *Lactobacillus plantarum* e/ou *Saccharomyces boulardii*.

Lesão cerebral

[00168] Os exemplos demonstram que as composições da invenção são neuroprotetoras e possuem atividade inibidora de HDAC. O HDAC2 é um alvo crucial para a recuperação funcional do derrame [34] e a inibição do

HDAC pode prevenir lesões na substância branca [35], de modo que as composições da invenção podem ser úteis no tratamento de lesões cerebrais.

[00169] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral. Em algumas modalidades, a lesão cerebral é uma lesão cerebral traumática. Em algumas modalidades, a lesão cerebral é uma lesão cerebral adquirida. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de trauma. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de um tumor. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de um acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de uma hemorragia cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de encefalite. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de hipoxia cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de anoxia cerebral.

[00170] Nas modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral. Os efeitos mostrados nos exemplos são particularmente relevantes para o tratamento de acidente vascular cerebral. O acidente vascular cerebral ocorre quando o fluxo sanguíneo para pelo menos uma parte do cérebro é interrompido. Sem um suprimento adequado de sangue para fornecer oxigênio e nutrientes ao tecido cerebral e remover resíduos do tecido cerebral, as células cerebrais rapidamente começam a morrer. Os sintomas do derrame dependem da região do cérebro afetada pelo fluxo sanguíneo inadequado. Os sintomas incluem paralisia, dormência ou fraqueza dos músculos, perda de equilíbrio, tontura,

dores de cabeça súbitas e graves, comprometimento da fala, perda de memória, perda de capacidade de raciocínio, confusão súbita, comprometimento da visão, coma ou até morte. Um derrame também é conhecido como ataque cerebral ou acidente vascular cerebral (AVC). Os sintomas do AVC podem ser breves se o fluxo sanguíneo adequado for restaurado dentro de um curto período de tempo. No entanto, se o fluxo sanguíneo inadequado continuar por um período significativo, os sintomas podem ser permanentes.

[00171] Em algumas modalidades, o AVC é isquemia cerebral. A isquemia cerebral ocorre quando há fluxo sanguíneo insuficiente para os tecidos do cérebro para atender à demanda metabólica. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral é isquemia cerebral focal, ou seja, confinada a uma região específica do cérebro. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral é isquemia cerebral global, ou seja, abrangendo uma ampla área do tecido cerebral. A isquemia cerebral focal geralmente ocorre quando um vaso cerebral fica bloqueado, parcial ou completamente, reduzindo o fluxo sanguíneo para uma região específica do cérebro. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral focal é um acidente vascular cerebral isquêmico. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é trombótico, isto é, causado por um trombo ou coágulo sanguíneo, que se desenvolve em um vaso cerebral e restringe ou bloqueia o fluxo sanguíneo. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é um acidente vascular cerebral trombótico. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é embólico, isto é, causado por um êmbolo ou uma massa não acoplada que viaja através da corrente sanguínea e restringe ou bloqueia o fluxo sanguíneo em um local distante do seu ponto de origem. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é um acidente vascular cerebral embólico. A isquemia cerebral global ocorre geralmente quando o fluxo sanguíneo no cérebro como um todo é bloqueado ou reduzido. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral global é cau-

sada por hipoperfusão, ou seja, devido a choque. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral global é resultado de uma parada cardíaca.

[00172] Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu isquemia cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu isquemia cerebral focal. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral isquêmico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral trombótico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral embólico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu isquemia cerebral global. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu hipoperfusão. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma parada cardíaca.

[00173] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de isquemia cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de isquemia cerebral focal. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral trombótico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral embólico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de isquemia cerebral global. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de hipoperfusão.

[00174] Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral é acidente vascular cerebral hemorrágico. O acidente vascular cerebral hemorrágico é causado pelo sangramento dentro ou ao redor do cérebro, resultando em inchaço, pressão e danos às células e tecidos do cérebro. O acidente vascular cerebral hemorrágico é geralmente o resultado de um vaso

sanguíneo enfraquecido que se rompe e sangra no cérebro circundante. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é uma hemorragia intracerebral, ou seja, causada por sangramento dentro do próprio tecido cerebral. Em algumas modalidades, a hemorragia intracerebral é causada por uma hemorragia intraparenquimatosa. Em algumas modalidades, a hemorragia intracerebral é causada por uma hemorragia intraventricular. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é uma hemorragia subaracnoidea, isto é, sangramento que ocorre fora do tecido cerebral, mas ainda dentro do crânio. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é resultado de angiopatia amiloide cerebral. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é resultado de um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é resultado de malformação arteriovenosa cerebral (AVM).

[00175] Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral hemorrágico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia intracerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia intraparenquimatosa. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia intraventricular. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia subaracnoidea. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu angiopatia amiloide cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu AVM cerebral.

[00176] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral hemorrágico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia intracerebral. Em algumas modalidades, as composi-

ções da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia intraparenquimatosa. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia intraventricular. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia subaracnoidea. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma angiopatia amiloide cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de AVM cerebral.

[00177] A restauração do fluxo sanguíneo adequado para o cérebro após um período de interrupção, embora eficaz no alívio dos sintomas associados ao AVC, pode paradoxalmente resultar em mais danos ao tecido cerebral. Durante o período de interrupção, o tecido afetado sofre com uma falta de oxigênio e nutrientes, e a repentina restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em inflamação e danos oxidativos pela indução de estresse oxidativo. Isso é conhecido como lesão de reperfusão e está bem documentada não apenas após o AVC, mas também após um ataque cardíaco ou outro dano tecidual quando o suprimento sanguíneo retorna ao tecido após um período de isquemia ou falta de oxigênio. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu lesão de reperfusão como resultado de AVC. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão por reperfusão como um resultado de AVC.

[00178] Um ataque isquêmico transitório (TIA), geralmente chamado de mini-AVC, é um sinal de alerta reconhecido para um AVC mais grave. Os sujeitos que sofreram um ou mais TIAs estão, portanto, em maior risco de AVC. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um TIA. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um TIA. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral em um su-

jeito que sofreu um TIA.

[00179] Pressão alta, colesterol alto, histórico familiar de AVC, doenças cardíacas, diabetes, aneurismas cerebrais, malformações arteriovenosas, doença das células falciformes, vasculite, distúrbios hemorrágicos, uso de anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), tabagismo, fumo de tabaco, consumo de grandes quantidades de álcool, uso de drogas ilegais, obesidade, falta de atividade física e uma dieta não saudável são considerados fatores de risco para AVC. Em particular, foi demonstrado que a redução da pressão arterial evita AVCs isquêmicos e hemorrágicos [36-37]. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral em um sujeito que possui pelo menos um fator de risco para AVC. Em algumas modalidades, o sujeito tem dois fatores de risco para AVC. Em algumas modalidades, o sujeito tem três fatores de risco para AVC. Em algumas modalidades, o sujeito tem quatro fatores de risco para AVC. Em algumas modalidades, o sujeito tem mais de quatro fatores de risco para AVC. Em algumas modalidades, o sujeito tem pressão alta. Em algumas modalidades, o sujeito tem colesterol alto no sangue. Em algumas modalidades, o sujeito tem um histórico familiar de acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma doença cardíaca. Em algumas modalidades, o sujeito tem diabetes. Em algumas modalidades, o sujeito tem um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem malformações arteriovenosas. Em algumas modalidades, o sujeito tem vasculite. Em algumas modalidades, o sujeito tem doença falciforme. Em algumas modalidades, o sujeito tem um distúrbio hemorrágico. Em algumas modalidades, o sujeito tem um histórico de uso de anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs). Em algumas modalidades, o sujeito fuma tabaco. Em algumas modalidades, o sujeito consome grandes quantidades de álcool. Em algumas modalidades, o sujeito usa drogas ilegais. Em algumas modalidades, o sujeito é obeso. Em algumas modalidades, o sujeito está acima do peso. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma falta de atividade fí-

sica. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma dieta não saudável.

[00180] Os exemplos indicam que as composições da invenção podem ser úteis no tratamento de lesões cerebrais e auxiliar na recuperação quando liberadas antes da ocorrência do evento de lesão. Portanto, as composições da invenção podem ser particularmente úteis no tratamento de lesão cerebral quando liberadas em sujeitos em risco de lesão cerebral, como AVC.

[00181] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução do dano causado por uma potencial lesão cerebral, preferencialmente um AVC. As composições podem reduzir o dano causado quando são administradas antes da ocorrência de uma potencial lesão cerebral, em particular quando liberadas em um paciente identificado como em risco de uma lesão cerebral.

[00182] Os exemplos indicam que as composições da invenção podem ser úteis no tratamento de lesões cerebrais e auxiliar na recuperação quando liberadas depois da ocorrência do evento de lesão. Portanto, as composições da invenção podem ser particularmente úteis no tratamento de lesão cerebral quando liberadas em sujeitos em risco de lesão cerebral, como AVC.

[00183] Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais reduzindo o dano motor. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a função motora. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a força muscular. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a memória. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar o reconhecimento social. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a função neurológica.

[00184] O tratamento de lesão cerebral pode se referir, por exemplo, a

um alívio da gravidade dos sintomas. O tratamento de lesões cerebrais também pode se referir à redução das deficiências neurológicas após o AVC. As composições da invenção para uso no tratamento de AVC podem ser fornecidas ao sujeito antes do início do AVC, por exemplo, em um paciente identificado como estando em risco de AVC. As composições da invenção para uso no tratamento de AVC podem ser fornecidas após a ocorrência de um AVC, por exemplo, durante a recuperação. As composições da invenção para uso no tratamento de AVC podem ser fornecidas durante a fase aguda da recuperação (isto é, até uma semana após o AVC). As composições da invenção para uso no tratamento de AVC podem ser fornecidas durante a fase subaguda de recuperação (isto é, de uma semana a três meses após o AVC). As composições da invenção para uso no tratamento de acidente vascular cerebral podem ser fornecidas durante a fase crônica de recuperação (três meses após o acidente vascular cerebral).

[00185] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em combinação com um agente ativo secundário. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em combinação com aspirina ou ativador de plasminogênio tecidual (tPA). Outros agentes secundários incluem outras antiplaquetas (como o clopidogrel), anticoagulantes (como heparinas, varfarina, apixaban, dabigatran, edoxaban ou rivaroxaban), anti-hipertensivos (como diuréticos, inibidores da ACE, bloqueadores dos canais de cálcio, betabloqueadores ou alfa-bloqueadores) ou estatinas. As composições da invenção podem melhorar a resposta do paciente ao agente ativo secundário.

[00186] Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem o efeito da isquemia nos tecidos. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem a quantidade de danos nos tecidos causados por isquemia. Em certas modalidades, os tecidos danificados pela isquemia são os tecidos cerebrais. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem a necrose ou o número de células necróticas. Em certas modali-

dades, as composições da invenção reduzem a apoptose ou o número de células apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem o número de células necróticas e apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem a morte celular por necrose e/ou apoptose. Em certas modalidades, as composições da invenção impedem a morte celular por necrose e/ou apoptose causada por isquemia. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a recuperação do tecido danificado por isquemia. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a velocidade de depuração de células necróticas e/ou células apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a eficácia da depuração de células necróticas e/ou células apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a substituição e/ou regeneração de células dentro dos tecidos. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a substituição e/ou regeneração de células dentro de tecidos danificados por isquemia. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a histologia geral do tecido (por exemplo, em uma biópsia).

Modos de administração

[00187] Preferencialmente, as composições da invenção devem ser administradas no trato gastrointestinal para permitir a transmissão para e/ou a colonização parcial ou total do intestino com a cepa bacteriana da invenção. Geralmente, as composições da invenção são administradas oralmente, mas podem ser administradas por via retal, intranasal ou por via bucal ou sublingual.

[00188] Em certas modalidades, as composições da invenção podem ser administradas como uma espuma, como um spray ou um gel.

[00189] Em certas modalidades, as composições da invenção podem ser administradas como um supositório, tal como um supositório retal, por exemplo na forma de um óleo de teobroma (manteiga de cacau), gordura dura sintética (por exemplo, suppcire, witepsol), glicerolatina, polietileno-

glicol ou composição de glicerina de sabão.

[00190] Em certas modalidades, a composição da invenção é liberada no trato gastrointestinal através de um tubo, tal como um tubo nasogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de jejunostomia (tubo J), gastronomia endoscópica percutânea (PEG), ou uma porta, tal como uma porta de parede torácica que fornece acesso ao estômago, jejuno e outras portas de acesso adequadas.

[00191] As composições da invenção podem ser administradas uma vez, ou podem ser administradas sequencialmente como parte de um regime de tratamento. Em certas modalidades, as composições da invenção devem ser administradas diariamente.

[00192] Em certas modalidades da invenção, o tratamento de acordo com a invenção é acompanhado por avaliação da microbiota intestinal do paciente. O tratamento pode ser repetido se a transmissão e/ou colonização parcial ou total com a cepa da invenção não for alcançada de modo que a eficácia não seja observada, ou o tratamento pode ser interrompido se a transmissão e/ou colonização parcial ou total for bem-sucedida e se for observada eficácia.

[00193] Em certas modalidades, a composição da invenção pode ser liberada em um animal gestante, por exemplo, a um mamífero tal como uma humana para prevenir uma doença inflamatória ou autoimune de se desenvolver em seu filho *in utero* e/ou após o nascimento.

[00194] As composições da invenção podem ser liberadas em um paciente que foi diagnosticado com uma doença neurodegenerativa ou que foi identificado como estando em risco de uma doença neurodegenerativa. As composições também podem ser liberadas como uma medida profilática para prevenir o desenvolvimento de doença neurodegenerativa em um paciente saudável.

[00195] As composições da invenção podem ser liberadas em um paciente que tenha sido identificado como tendo uma microbiota intestinal

anormal. Por exemplo, o paciente pode ter uma colonização reduzida ou ausente por *Parabacteroidese*, em particular, *Parabacteroides distasonis*.

[00196] As composições da invenção podem ser administradas como um produto alimentício, tal como um suplemento nutricional.

[00197] Geralmente, as composições da invenção são para o tratamento de humanos, embora possam ser usadas para tratar animais incluindo mamíferos monogástricos tais como aves de domésticas, porcos, gatos, cães, cavalos ou coelhos. As composições da invenção podem ser úteis para melhorar o crescimento e desempenho dos animais. Se liberada a animais, a gavagem oral pode ser usada.

Composições

[00198] Geralmente, a composição da invenção compreende bactérias. Nas modalidades preferidas da invenção, a composição é formulada sob a forma liofilizada. Por exemplo, a composição da invenção pode compreender grânulos ou cápsulas de gelatina, por exemplo, cápsulas de gelatina duras, compreendendo uma cepa bacteriana da invenção.

[00199] Preferencialmente, a composição da invenção compreende bactérias liofilizadas. A liofilização de bactérias é um procedimento bem estabelecido e uma orientação relevante está disponível, por exemplo, nas referências [38-40].

[00200] Alternativamente, a composição da invenção pode compreender uma cultura bacteriana ativa e viva.

[00201] Em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi inativada, por exemplo, não foi inativada por calor. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi morta, por exemplo, não foi morta por calor. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi atenuada, por exemplo, não foi atenuada pelo calor. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi morta, inativada e/ou atenuada. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na

composição da invenção é viva. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é viável. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é viável e capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino.

[00202] Em algumas modalidades, a composição compreende uma mistura de cepas bacterianas vivas e cepas bacterianas que foram mortas.

[00203] Em algumas modalidades, a composição da invenção é encapsulada para permitir a transmissão da cepa bacteriana ao intestino. A encapsulação protege a composição da degradação até sua transmissão no local alvo através de, por exemplo, ruptura com estímulos químicos ou físicos tais como pressão, atividade enzimática ou desintegração física, que podem ser desencadeados por mudanças no pH. Qualquer método de encapsulação apropriado pode ser usado. Exemplos de técnicas de encapsulação incluem aprisionamento dentro de uma matriz porosa, ligação ou adsorção em superfícies carreadoras sólidas, autoagregação por floculação ou com agentes de reticulação e contenção mecânica atrás de uma membrana microporosa ou uma microcápsula. As orientações sobre encapsulação que podem ser úteis para preparar as composições da invenção estão disponíveis, por exemplo, nas referências [41] e [42].

[00204] A composição pode ser administrada oralmente e pode estar sob a forma de um comprimido, cápsula ou pó. Produtos encapsulados são preferidos porque as *Parabacteroides* são anaeróbicas. Outros ingredientes (como a vitamina C, por exemplo), podem ser incluídos como eliminadores de oxigênio e substratos prebióticos para melhorar a distribuição e/ou a colonização parcial ou total e a sobrevivência *in vivo*. Alternativamente, a composição probiótica da invenção pode ser administrada oralmente como um produto alimentício ou nutricional, tal como leite ou produto lácteo fermentado à base de soro de leite, ou como um produto farmacêutico.

[00205] A composição pode ser formulada como um probiótico.

[00206] Uma composição da invenção inclui uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma cepa bacteriana da invenção. Uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma cepa bacteriana é suficiente para exercer um efeito benéfico sobre um paciente. Uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma cepa bacteriana pode ser suficiente para resultar na distribuição e/ou colonização parcial ou total do intestino do paciente.

[00207] Uma dose diária adequada da bactéria, por exemplo, para um ser humano adulto, pode ser de cerca de 1×10^3 a cerca de 1×10^{11} unidades formadoras de colônias (CFU); por exemplo, de cerca de 1×10^7 a cerca de 1×10^{10} CFU; em outro exemplo, de cerca de 1×10^6 a cerca de 1×10^{10} CFU.

[00208] Em certas modalidades, a composição contém a cepa bacteriana em uma quantidade de cerca de 1×10^6 a cerca de 1×10^{11} CFU/g, em relação ao peso da composição; por exemplo, de cerca de 1×10^8 a cerca de 1×10^{10} CFU/g. A dose pode ser, por exemplo, 1 g, 3g, 5g e 10g.

[00209] Tipicamente, um probiótico, tal como a composição da invenção, é opcionalmente combinado com pelo menos um composto prebiótico adequado. Um composto prebiótico é geralmente um carboidrato não digerível, como um oligo ou polissacarídeo, ou um álcool de açúcar, que não é degradado ou absorvido no trato digestivo superior. Os prebióticos conhecidos incluem produtos comerciais tais como inulina e trans-galacto-oligossacarídeos.

[00210] Em certas modalidades, a composição probiótica da presente invenção inclui um composto prebiótico em uma quantidade de cerca de 1 a cerca de 30% em peso, em relação à composição do peso total (por exemplo, de 5 a 20% em peso). Os carboidratos podem ser selecionados dentre o grupo que consiste em: fruto-oligossacarídeos (ou FOS), fruto-oligossacarídeos de cadeia curta, inulina, isomalto-oligossacarídeos, pectinas, xilo-oligossacarídeos (ou XOS), oligossacarídeos de quitosana (ou COS), beta-

glucanos, amidos de goma arábica modificada e resistente, polidextrose, D-tagatose, fibras de acácia, alfarroba, aveia e fibras de citrinos. Em um aspecto, os prebióticos são os fruto-oligossacarídeos de cadeia curta (para simplicidade, mostrado abaixo como FOSs-c.c); os referidos FOSs-c.c não são carboidratos digeríveis, geralmente obtidos pela conversão do açúcar de beterraba e incluindo uma molécula de sacarose à qual três moléculas de glicose são ligadas.

[00211] Em certas modalidades, as composições da invenção são usadas em combinação com outro composto terapêutico para tratar ou prevenir o distúrbio neurodegenerativo. Em algumas modalidades, as composições da invenção são administradas com suplementos nutricionais que modulam neuroproteção ou neuroproliferação. Em modalidades preferidas, os suplementos nutricionais compreendem ou consistem em vitaminas nutricionais. Em certas modalidades, as vitaminas são vitamina B6, magnésio, dimetilglicina (vitamina B16) e vitamina C. Em certas modalidades, as composições da invenção são administradas em combinação com outro probiótico.

[00212] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento do efeito de um segundo agente em uma doença neurodegenerativa. Os efeitos imunomoduladores das composições da invenção podem tornar o cérebro mais suscetível a terapias convencionais, como Levodopa, agonistas da dopamina, inibidores da MAO-B, inibidores da COMT, antagonistas do glutamato ou anticolinérgicos, que são agentes secundários exemplares a serem administrados em combinação (sequencialmente ou contemporaneamente) com as composições da invenção.

[00213] As composições da invenção podem compreender excipientes ou carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Os exemplos de tais excipientes adequados podem ser encontrados na referência [43]. Os carreadores ou diluentes aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica e estão descritos, por exemplo, na referência [44]. Os exemplos de carreadores adequados incluem lactose, amido, glicose, metil-

celulose, estearato de magnésio, manitol, sorbitol e semelhantes. Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água. A escolha do carreador, excipiente ou diluente farmacêutico pode ser selecionada em relação à via de liberação pretendida e à prática farmacêutica padrão. As composições farmacêuticas podem compreender como, ou em adição, o carreador, excipiente ou diluente quaisquer ligantes, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de revestimento e agentes solubilizantes adequados. Exemplos de ligantes adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glicose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, edulcorantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose e polietilenoglicol. Exemplos de lubrificantes adequados incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e semelhantes. Conservantes, estabilizantes, corantes e mesmo agentes aromatizantes podem ser fornecidos na composição farmacêutica. Exemplos de conservantes incluem benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Antioxidantes e agentes de suspensão também podem ser usados.

[00214] As composições da invenção podem ser formuladas como um produto alimentício. Por exemplo, um produto alimentício pode fornecer um benefício nutricional para além do efeito terapêutico da invenção, tal como em um suplemento nutricional. De um modo semelhante, um produto alimentício pode ser formulado para melhorar o sabor da composição da invenção ou para tornar a composição mais atrativa para o consumo ao torná-la mais semelhante a um artigo alimentício comum, em vez de uma composição farmacêutica. Em certas modalidades, a composição da invenção é formulada como um produto à base de leite. O termo "produto à base de leite" significa qualquer produto à base de leite ou soro de leite líquido ou semissólido com um teor de gordura variável. O produto à base de leite pode ser, por exemplo, leite de vaca, leite de cabra, leite de ovelha, leite des-

natado, leite integral, leite reconstituído a partir de leite em pó e soro de leite sem qualquer processamento, ou um produto processado, como iogurte, leite coalhado, coalhada, leite azedo, leite integral azedo, leitelho e outros produtos lácteos azedos. Outro grupo importante inclui bebidas lácteas, como bebidas de soro de leite, leites fermentados, leites condensados, leites infantis ou para bebês; leites aromatizados, sorvetes; alimentos contendo leite, como doces.

[00215] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem uma ou mais cepas bacterianas do gênero *Parabacteroides* e não contêm bactérias de nenhum outro gênero, ou que compreendem apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outro gênero. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma ou mais cepas bacterianas do gênero *Parabacteroides*, que não contém bactérias de nenhum outro gênero ou que compreende apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outro gênero, para uso em terapia.

[00216] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Parabacteroides distasonis* e não contêm bactérias de nenhuma outra espécie, ou que compreendem apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outra espécie. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Parabacteroides distasonis*, que não contém bactérias de nenhuma outra espécie ou que compreende apenas quantidades *minimizadas* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outras espécies, para uso em terapia.

[00217] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Parabacteroides distasonis* e não contêm bactérias de nenhuma outra espécie *Parabacteroides*, ou que compreendem apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente

irrelevantes de bactérias de outra espécie *Parabacteroides*. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Parabacteroides distasonis*, que não contém bactérias de nenhuma outra espécie *Parabacteroides* ou que compreende apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outras espécies *Parabacteroides*, para uso em terapia.

[00218] Em certas modalidades, as composições da invenção contêm uma única cepa ou espécie bacteriana e não contêm quaisquer outras cepas ou espécies bacterianas. Tais composições podem compreender apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de outras cepas ou espécies bacterianas. Tais composições podem ser uma cultura que é substancialmente isenta de outras espécies de organismos.

[00219] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma única cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*, que não contém bactérias de nenhuma outra cepa ou que compreende apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outra cepa para uso em terapia.

[00220] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma única cepa bacteriana da espécie *Parabacteroides distasonis*, que não contém bactérias de nenhuma outra cepa ou que compreende apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outra cepa para uso em terapia.

[00221] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem mais de uma cepa bacteriana. Por exemplo, em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem mais de uma cepa dentro da mesma espécie (por exemplo, mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ou 45 cepas), e, opcionalmente, não contêm bactérias de qualquer outra espécie. Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem menos de 50 cepas dentro da mesma espécie (por exemplo, menos de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ou 3

cepas) e, opcionalmente, não contêm bactérias de qualquer outra espécie. Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, ou 31-50 cepas dentro da mesma espécie e, opcionalmente, não contêm bactérias de qualquer outra espécie. A invenção compreende qualquer combinação dos precedentes.

[00222] Em algumas modalidades, a composição compreende um consórcio microbiano. Por exemplo, em algumas modalidades, a composição compreende a cepa bacteriana *Parabacteroides* como parte de um consórcio microbiano. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana *Parabacteroides* está presente em combinação com uma ou mais (por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 ou 20) outras cepas bacterianas de outros gêneros com os quais pode viver simbioticamente *in vivo* no intestino. Por exemplo, em algumas modalidades, a composição compreende uma cepa bacteriana de *Parabacteroides* em combinação com uma cepa bacteriana de um gênero diferente. Em algumas modalidades, o consórcio microbiano compreende duas ou mais cepas bacterianas obtidas a partir de uma amostra de fezes de um único organismo, por exemplo, um humano. Em algumas modalidades, o consórcio microbiano não é encontrado em conjunto na natureza. Por exemplo, em algumas modalidades, o consórcio microbiano compreende cepas bacterianas obtidas a partir de amostras de fezes de pelo menos dois organismos diferentes. Em algumas modalidades, os dois organismos diferentes são da mesma espécie, por exemplo, dois seres humanos diferentes. Em algumas modalidades, os dois organismos diferentes são um ser humano infantil e um humano adulto. Em algumas modalidades, os dois organismos diferentes são um humano e um mamífero não humano.

[00223] Em algumas modalidades, a composição da invenção compreende adicionalmente uma cepa bacteriana que possui as mesmas caracte-

rísticas de segurança e eficácia terapêutica que a cepa MRX005, mas que não é MRX0005 ou que não é uma *Parabacteroides distasonis*.

[00224] Em algumas modalidades em que a composição da invenção compreende mais de uma cepa, espécie ou gênero bacterianos, as cepas, espécies ou gêneros bacterianos individuais podem ser destinados a administração separada, simultânea ou sequencial. Por exemplo, a composição pode compreender todas as mais de uma cepa, espécie ou gênero bacterianos, ou as cepas, espécies ou gêneros bacterianos podem ser armazenados separadamente e ser administrados separadamente, simultaneamente ou sequencialmente. Em algumas modalidades, as mais de uma cepa, espécie ou gênero bacterianos são armazenadas separadamente, mas são misturadas antes do uso.

[00225] Em algumas modalidades, a cepa bacteriana para uso na invenção é obtida a partir de fezes humanas adultas. Em algumas modalidades em que a composição da invenção compreende mais de uma cepa bacteriana, todas as cepas bacterianas são obtidas a partir de fezes humanas adultas ou se estiverem presentes outras cepas bacterianas, estão presentes apenas em quantidades *de minimis*. As bactérias podem ter sido cultivadas após serem obtidas a partir das fezes humanas adultas e serem utilizadas em uma composição da invenção.

[00226] Em algumas modalidades, a cepa bacteriana para uso na invenção é obtida a partir das fezes infantis humanas. Em algumas modalidades em que a composição da invenção compreende mais de uma cepa bacteriana, todas as cepas bacterianas são obtidas a partir de fezes infantis humanas ou se estiverem presentes outras cepas bacterianas, estão presentes apenas em quantidades *de minimis*. As bactérias podem ter sido cultivadas após serem obtidas a partir das fezes infantis humanas e serem utilizadas em uma composição da invenção

[00227] Como mencionado acima, em algumas modalidades, uma ou mais cepas bacterianas de *Parabacteroides* é/são o(s) único(s) agente(s)

terapeuticamente ativo(s) em uma composição da invenção. Em algumas modalidades, a(s) cepa(s) bacteriana(s) na composição é/são o(s) único(s) agente(s) therapeuticamente ativo(s) em uma composição da invenção.

[00228] As composições para uso de acordo com a invenção podem ou não requerer aprovação comercial.

[00229] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a referida cepa bacteriana é liofilizada. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a referida cepa bacteriana é seca por pulverização. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que está viva. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que está viva. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que é capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que é viável e capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino.

[00230] Em alguns casos, a cepa bacteriana liofilizada é reconstituída antes da administração. Em alguns casos, a reconstituição é feita através de um diluente descrito neste documento.

[00231] As composições da invenção podem compreender excipientes, diluentes ou carreadores farmacêuticamente aceitáveis.

[00232] Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo: uma cepa bacteriana da invenção; e um excipiente, carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável; em que a cepa bacteriana está em uma quantidade suficiente para tratar um distúrbio neurodegenerativo quando administrado a um sujeito em necessidade desta.

[00233] Em certas modalidades, a invenção fornece composição farma-

cêutica compreendendo: uma cepa bacteriana da invenção; e um excipiente, carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável; em que a cepa bacteriana está em uma quantidade suficiente para tratar ou prevenir um distúrbio neurodegenerativo.

[00234] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a quantidade da cepa bacteriana é de cerca de 1×10^3 a cerca de 1×10^{11} unidades formadoras de colônias por grama em relação ao peso da composição.

[00235] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a composição é administrada em uma dose de 1 g, 3 g, 5 g ou 10 g.

[00236] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a composição é administrada por um método selecionado dentre o grupo que consiste em oral, retal, subcutânea, nasal, bucal e sublingual.

[00237] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um carreador selecionado dentre o grupo que consiste em lactose, amido, glicose, metilcelulose, estearato de magnésio, manitol e sorbitol.

[00238] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um diluente selecionado dentre o grupo que consiste em etanol, glicerol e água.

[00239] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um excipiente selecionado dentre o grupo que consiste em amido, gelatina, glicose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, edulcorante de milho, acácia, tragacanto, alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietilenoglicol, oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio e cloreto de sódio.

[00240] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição far-

macêutica acima, compreendendo ainda pelo menos um dentre um conservante, um antioxidante e um estabilizador.

[00241] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um conservante selecionado dentre o grupo que consiste em benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

[00242] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a referida cepa bacteriana é liofilizada.

[00243] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que quando a composição é armazenada em um recipiente vedado a cerca de 4°C ou cerca de 25°C e o recipiente é colocado em uma atmosfera com 50% de umidade relativa, pelo menos 80% da cepa bacteriana medida em unidades formadoras de colônias permanece após um período de pelo menos cerca de: 1 mês, 3 meses, 6 meses, 1 ano, 1,5 anos, 2 anos, 2,5 anos ou 3 anos.

[00244] Em algumas modalidades, a composição da invenção é fornecida em um recipiente vedado compreendendo uma composição como descrita neste documento. Em algumas modalidades, o recipiente vedado é um sachê ou garrafa. Em algumas modalidades, a composição da invenção é fornecida em uma seringa compreendendo uma composição como descrita neste documento.

[00245] A composição da presente invenção pode, em algumas modalidades, ser fornecida como uma formulação farmacêutica. Por exemplo, a composição pode ser fornecida como um comprimido ou cápsula. Em algumas modalidades, a cápsula é uma cápsula de gelatina (“gel-cap”).

[00246] Em algumas modalidades, as composições da invenção são administradas por via oral. A administração oral pode envolver a deglutição, de modo que o composto entre no trato gastrointestinal e/ou a administração bucal, lingual ou sublingual, através das quais o composto entra na corrente sanguínea diretamente a partir da boca.

[00247] Formulações farmacêuticas adequadas para administração oral incluem tampões sólidos, micropartículas sólidas, semissólidos e líquidos (incluindo múltiplas fases ou sistemas dispersos) tais como comprimidos; cápsulas moles ou duras contendo multi ou nanopartículas, líquidos (por exemplo, soluções aquosas), emulsões ou pós; pastilhas (incluindo cheias de líquido); mastigáveis; géis; formas de dosagem de dispersão rápida; películas; óvulos; sprays; e adesivos bucais/mucoadesivos.

[00248] Em algumas modalidades, a formulação farmacêutica é uma formulação entérica, isto é, uma formulação gastrorresistente (por exemplo, resistente ao pH gástrico) que é adequada para a transmissão da composição da invenção para o intestino por liberação oral. As formulações entéricas podem ser particularmente úteis quando as bactérias ou outro componente da composição forem sensíveis ao ácido, por exemplo, propensos à degradação em condições gástricas.

[00249] Em algumas modalidades, a formulação entérica compreende um revestimento entérico. Em algumas modalidades, a formulação é uma forma de dosagem com revestimento entérico. Por exemplo, a formulação pode ser um comprimido com revestimento entérico ou uma cápsula com revestimento entérico, ou semelhante. O revestimento entérico pode ser um revestimento entérico convencional, por exemplo, um revestimento convencional para um comprimido, cápsula ou semelhante para transmissão oral. A formulação pode compreender um revestimento de película, por exemplo, uma camada de película fina de um polímero entérico, por exemplo, um polímero insolúvel em ácido.

[00250] Em algumas modalidades, a formulação entérica é intrinsecamente entérica, por exemplo, gastrorresistente sem a necessidade de um revestimento entérico. Assim, em algumas modalidades, a formulação é uma formulação entérica que não compreende um revestimento entérico. Em algumas modalidades, a formulação é uma cápsula feita de um material termogelante. Em algumas modalidades, o material de termogelação é um

material celulósico, tal como metilcelulose, hidroximetilcelulose ou hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Em algumas modalidades, a cápsula compreende um invólucro que não contém qualquer polímero formador de película. Em algumas modalidades, a cápsula compreende um invólucro e o invólucro compreende hidroxipropilmetilcelulose e não compreende qualquer polímero formador de película (por exemplo, ver [i]). Em algumas modalidades, a formulação é uma cápsula intrinsecamente entérica (por exemplo, Vcaps® da Capsugel).

[00251] Em algumas modalidades, a formulação é uma cápsula mole. Cápsulas moles são cápsulas que podem, devido a adições de amaciantes, tais como, por exemplo, glicerol, sorbitol, maltitol e polietilenoglicóis, presentes no invólucro da cápsula, ter certa elasticidade e suavidade. Cápsulas moles podem ser produzidas, por exemplo, com base em gelatina ou amido. Cápsulas moles à base de gelatina estão comercialmente disponíveis através de vários fornecedores. Dependendo do método de administração, tal como, por exemplo, oral ou retalmente, as cápsulas moles podem ter várias formas, podem ser, por exemplo, redondas, ovais, oblongas ou em forma de torpedo. As cápsulas moles podem ser produzidas por processos convencionais, tais como, por exemplo, pelo processo Scherer, pelo processo Accogel ou pelo processo de gotejamento ou sopro.

Métodos de cultura

[00252] As cepas bacterianas para uso na presente invenção podem ser cultivadas utilizando técnicas convencionais de microbiologia, como detalhado, por exemplo, nas referências [46-48].

[00253] O meio sólido ou líquido utilizado para a cultura pode ser, por exemplo, meio de ágar YCFA ou meio YCFA. O meio YCFA pode incluir (por 100 ml, valores aproximados): Casitone (1,0 g), extrato de levedura (0,25 g), NaHCO_3 (0,4 g), cisteína (0,1 g), K_2HPO_4 (0,045 g), KH_2PO_4 (0,045 g), NaCl (0,09 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 g), CaCl_2 (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 μg), cobalamina (1

µg), *p*- ácido aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) e piridoxamina (15 µg).

Cepas bacterianas para serem usadas em composições de vacinas

[00254] Os inventores identificaram que as cepas bacterianas da invenção são úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. É provável que isto seja um resultado do efeito que as cepas bacterianas da invenção têm no sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, as composições da invenção também podem ser úteis para prevenir distúrbios neurodegenerativos, quando administradas como composições de vacina. Em certas tais modalidades, as cepas bacterianas da invenção podem ser mortas, inativadas ou atenuadas. Em certas tais modalidades, as composições podem compreender um adjuvante de vacina. Em certas modalidades, as composições são para administração via injeção, tal como através de injeção subcutânea.

Geral

[00255] A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado em contrário, métodos convencionais da química, bioquímica, biologia molecular, imunologia e farmacológica, dentro do âmbito da técnica. Essas técnicas são totalmente explicadas na literatura. Ver, *por exemplo*, as referências [49] e [50-56], *etc*.

[00256] O termo “compreendendo” engloba “incluindo” bem como “consistindo”, *por exemplo*, uma composição “compreendendo” X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo adicional, *por exemplo*, X + Y.

[00257] O termo “cerca de” em relação a um valor numérico *x* é opcional e significa, *por exemplo*, $x \pm 10\%$.

[00258] A palavra “substancialmente” não exclui “completamente”, *por exemplo*, uma composição que é “substancialmente livre” de Y pode estar completamente livre de Y. Quando necessário, a palavra “substancialmente” pode ser omitida da definição da invenção.

[00259] Referências a uma identidade de sequência percentual entre

duas sequências nucleotídicas significa que, quando alinhadas, essa porcentagem de nucleotídeos é a mesma na comparação das duas sequências. Este alinhamento e a porcentagem de homologia ou identidade de sequência podem ser determinadas utilizando programas de software conhecidos na técnica, por exemplo os descritos na seção 7.7.18 das ref. [57]. Um alinhamento preferido é determinado pelo algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman, utilizando uma pesquisa de lacuna afim com uma penalidade de abertura de lacuna de 12 e uma penalidade de extensão de lacuna de 2, matriz de BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é divulgado nas ref. [58].

[00260] A menos que especificamente indicado, um processo ou método compreendendo inúmeras etapas pode compreender etapas adicionais no início ou no fim do método, ou pode compreender etapas intervenientes adicionais. Além disso, as etapas podem ser combinadas, omitidas ou executadas em uma ordem alternativa, se apropriado.

[00261] Várias modalidades da invenção são descritas neste documento. Será apreciado que as características especificadas em cada modalidade podem ser combinadas com outras características especificadas, para fornecer outras modalidades. Em particular, as modalidades destacadas neste documento como sendo adequadas, típicas ou preferidas, podem ser combinadas umas com as outras (exceto quando forem mutuamente exclusivas).

MODOS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Exemplo 1 - Eficácia da inoculação bacteriana para atuar como neuroprotetora

SUMÁRIO

[00262] As células de neuroblastoma foram tratadas com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção. As células de neuroblastoma SH-SY5Y utilizadas são produtoras de dopamina e estão bem estabelecidas como modelo *in vitro* para o estudo de doenças neuro-

degenerativas. Foi observada a capacidade das cepas bacterianas de aumentar a neuroproliferação. As células do neuroblastoma foram tratadas com neurotoxina dopaminérgica 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP), que induz sintomas permanentes da doença de Parkinson nas células do neuroblastoma. A capacidade das cepas bacterianas de agir como um neuroprotetor contra MPP foi investigada.

Material e Métodos

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*, *Megasphaera massiliensis* MRx0029

Linhagem celular

[00263] As células de neuroblastoma SH-SY5Y foram adquiridas na EC-CACC (Cat. No: 94030304) e foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, gatp. M2279) suplementado com Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich, cat. N4888).

Método

[00264] Uma vez cultivadas, as células de neuroblastoma SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 96 poços a 11.000 células/poço e incubadas por 2 dias. As células foram então transferidas para o meio de diferenciação (que contém FBS a 1%) e 10 uM de ácido retinoico (Sigma Aldrich, cat. N. R2625-100MG). O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram colhidas aos 7 dias de diferenciação. As células foram pré-tratadas com ou sem MPP (Sigma Aldrich, cat. N° D048-1G) durante 8 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com sobrenadante bacteriano a 10% e incubadas durante a noite. A viabilidade celular foi medida usando o reagente CCK-8 (Sigma Aldrich, Cell Counting Kit - 8, cat. N° 96992-3000TESTS-F) e lida a 450nm de comprimento de onda.

Resultados

[00265] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 1. O tratamento de células de neuroblastoma com MRx0005 ou MRx0029 levou a um aumento na proliferação de neurônios. As células de neuroblas-

toma que foram tratadas com MPP em conjunto com a cepa bacteriana aumentaram a viabilidade celular em comparação com as células tratadas apenas com MPP (que tiveram viabilidade reduzida). Esses dados mostram que as cepas bacterianas podem atuar como um neuroprotetor.

Exemplo 2A - Eficácia do inóculo bacteriano para reduzir a secreção de IL-6.

Sumário

[00266] A ativação de citocinas pró-inflamatórias tem sido associada a danos nos neurônios em doenças neurodegenerativas. O lipopolissacarídeo (LPS) é um estimulador conhecido da citocina pró-inflamatória IL-6. As células de astrocitoma de glioblastoma humano foram tratadas com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção em combinação com LPS para observar sua capacidade de modular os níveis de IL-6.

Material e Métodos

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

Linhagem celular

[00267] MG U373 é um astrocitoma de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno e foi adquirido de Sigma-Aldrich (cat. 08061901-1VL). As células de astrocitoma de glioblastoma humano MG U373 foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M-2279) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, 1mM de L-Glut, 1X de solução de Aminoácido Não essencial de MEM e 1X de Piruvato de Sódio.

Método

[00268] Uma vez cultivadas, as células MG U373 foram plaqueadas em placas de 24 poços a 100.000 células/poço. As células foram tratadas com LPS (1ug/mL) isoladamente ou com 10% de bactérias sobrenadantes de MRx0005 por 24h. Também foi realizado um controle onde as células foram incubadas em meio não tratado. Depois, os sobrenadantes livres de células

foram coletados, centrifugados a 10.000g por 3min a 4°C. A IL-6 foi medida usando o Human IL-6 ELISA Kit da Peprotech (cat # 900-K16) de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

[00269] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 2A. O tratamento de células de neuroblastoma com LPS e as cepas de bactérias levou a uma diminuição no nível de IL-6 secretada.

Exemplo 2B – Eficácia da inoculação bacteriana para modular a secreção de IL-8.

Sumário

[00270] Como a neuroinflamação desempenha um papel central nas doenças neurodegenerativas e a IL-8 demonstrou ter efeitos neuropositivos, o efeito de composições compreendendo cepas bacterianas da invenção e LPS na ativação da IL-8 foi avaliado. As células de astrocitoma de glioblastoma humano foram tratadas com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção em combinação com LPS para observar sua capacidade de modular os níveis de IL-8.

Material e Métodos

Cepas bacterianas

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linhagem celular

[00271] MG U373 é um astrocitoma de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno e foi adquirido de Sigma-Aldrich (cat. 08061901-1VL). As células de astrocitoma de glioblastoma humano MG U373 foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M-2279) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, 1mM de L-Glut, 1X de solução de Aminoácido Não essencial de MEM e 1X de Piruvato de Sódio.

Método

[00272] Uma vez cultivadas, as células MG U373 foram colocadas em placas de 24 poços a 100.000 células/poço. As células foram tratadas com

LPS (1ug/mL) isoladamente ou com 10% de bactérias sobrenadantes de MRX0029 por 24h. Depois, os sobrenadantes livres de células foram coletados, centrifugados a 10.000g por 3min a 4°C. A IL-8 foi medida usando o Kit Humano IL-8 ELISA da Peprotech (cat # 900-K18) de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

[00273] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 2B.

Exemplo 2C – Eficácia da inoculação bacteriana para reduzir a inflamação induzida por α -sinucleína.

Sumário

[00274] A neuroinflamação desempenha um papel central na doença de Parkinson e a α -sinucleína demonstrou induzir neuroinflamação *in vivo*. Portanto, foi avaliada a capacidade das cepas de bactéria da invenção de inibir a neuroinflamação induzida por α -sinucleína. Uma co-cultura de células de astrocitoma de glioblastoma humano e células de neuroblastoma foi exposta à α -sinucleína do tipo selvagem e às isoformas mutantes E46K e A53T e tratada com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção. A capacidade das cepas de bactérias para inibir a secreção de IL-6 induzida por α -sinucleína foi então testada.

Material e Métodos

Cepas bacterianas

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linhagem celular

[00275] MG U373 é um astrocitoma de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno e foi adquirido de Sigma-Aldrich (cat. 08061901-1VL). As células de astrocitoma de glioblastoma humano MG U373 foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M-2279) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, 1mM de L-Glut, 1X de solução de Aminoácido Não essencial de MEM e 1X de Piruvato de Sódio.

[00276] SH-SY5Y é uma linhagem celular de neuroblastoma humano de-

rivada de um neuroblastoma maligno e pode ser adquirida de Sigma-Aldrich (cat. 94030304-1VL). As células foram cultivadas em 50% de MEM e 50% de meio de mistura de nutrientes F-12 Ham suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de FBS inativado pelo calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. As células no meio de crescimento foram plaqueadas em placas de 96 poços a 11.000 células/poço e colocadas na incubadora. Após 2 dias, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram usadas após 7 dias de diferenciação.

Método

[00277] As células SHSY5Y foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 50.000 células/poço. As células foram cultivadas em 50% de MEM e 50% de meio de mistura de nutrientes F-12 Ham suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de FBS inativado pelo calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. As células no meio de crescimento foram plaqueadas em placas de 96 poços a 11.000 células/poço e colocadas na incubadora. Após 2 dias, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram usadas após 7 dias de diferenciação. Os U373 foram plaqueados em 12 placas transpoço (membrana de poliéster de 0,4 µm, Costar) a uma densidade de 50.000 células/poço por 72 horas. As células foram co-cultivadas em conjunto por 24 horas antes do tratamento em meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS sem ácido retinoico).

[00278] Posteriormente, as células foram tratadas com 25-µg/ml de α-sinucleína (Wt, A53T, E46K) na presença ou ausência de 10% de bactérias sobrenadantes durante 48 horas. Os sobrenadantes livres de células foram coletados, centrifugados a 10000g por 3 min a 4C, divididos em alíquotas e

armazenados a -80°C . A IL-6 e IL-8 humanas foram medidas como descrito acima.

Resultados

[00279] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 3. O tratamento de células com α -sinucleína do tipo selvagem e as isoformas mutantes E46K e A53T induziu secreção moderada de IL-6. A secreção de IL-6 induzida por α -sin foi inibida em células tratadas com as cepas de bactéria.

Exemplo 3 – Eficácia de inóculos bacterianos para reduzir a ativação de NF κ B

Sumário

[00280] A ativação do promotor NF κ B leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-1 α , IL-18, TNF α e IL-6. O promotor de NF κ B pode ser ativado por α -sinucleína e LPS, estimulando o ligante de TLR4. Mutações na α -sinucleína, como a α -sinucleína A53T, estão implicadas no Parkinson familiar. O tratamento de células neuronais com LPS simula Parkinson causado por fatores ambientais. A capacidade das composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para inibir a ativação do promotor NF κ B foi investigada.

Material e Métodos

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

Linhagem celular

[00281] O TLR4 Hek blue humano foi adquirido da InvivoGen (cat. N. Hkb-htlr4). O TLR4 Hek blue humano foi cultivado em DMEM com alta glicose (Sigma Aldrich, cat. D-6171) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4 mM de L-Glut, Normocin e solução de seleção 1X HEK Blue.

Método

[00282] Uma vez cultivadas, as células Hek blue humanas foram plaqueadas em placas de 96 poços a 25.000 células/poço em 4 repetições.

Um conjunto de células foi tratado com α -sinucleína A53T (1ug/mL) sozinho ou com 10% de bactérias sobrenadantes do MRx0005 por 22h. O segundo conjunto de células foi tratado com LPS (10 ng/mL, de Typhimurium de sorotipo de Salmonella enterica, Sigma Aldrich, cat nº L6143) sozinho ou com 10% de bactérias sobrenadantes do MRx0005 por 22 h. As células foram subsequentemente centrifugadas e 20uL do sobrenadante foram misturados com 200uL de reagente Quanti Blue (InvivoGen, cat n. rep-qb2), incubados por 2 h e a absorvência lida a 655 nm.

Resultados

[00283] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 4 e 5. A Figura 4 mostra que a ativação do promotor NFkB por α -sinucleína é inibida por MRx0005. A Figura 5 mostra que a ativação do promotor de NFkB por LPS é inibida por MRx0005.

Exemplo 4 - Eficácia de inóculos bacterianos para alterar a capacidade antioxidante

Sumário

[00284] A capacidade de composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para alterar a capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante da cepa bacteriana foi estabelecida usando o conhecido ensaio ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

Método

[00285] As células bacterianas (10^6 ou superior) foram coletadas e centrifugadas. Eles foram ressuspensos em tampão de ensaio (usando três vezes o volume de sedimento). A suspensão foi sonicada em gelo por 5 minutos e depois centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e medido usando o kit de ensaio ABTS produzido pela Sigma Aldrich (código CS0790), de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

[00286] Os resultados destes experimentos são mostrados nas Figura 6. A Figura 6 mostra que o MRx0005 tem uma capacidade antioxidante de aproximadamente 0,5 mM em comparação com o Trolox.

Exemplo 5 – Eficácia de inóculos bacterianos para alterar os níveis de peroxidação lipídica

Sumário

[00287] A capacidade das composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para alterar os níveis de peroxidação lipídica foi investigada. O ensaio de substâncias reativas tiobarbitúricas (TBARs) foi utilizado para medir os subprodutos da peroxidação lipídica.

Material e Métodos

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

Método

[00288] As células bacterianas (10^6 ou superior) foram coletadas e centrifugadas, uma etapa de lavagem foi realizada com solução salina isotônica antes de o sedimento ser ressuspenso em tampão de ensaio de cloreto de potássio. A suspensão foi sonicada em gelo por 10 minutos e depois centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o nível de peroxidação lipídica avaliado usando o ensaio de substâncias reativas tiobarbitúricas.

Resultados

[00289] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 7. A Figura 7 mostra que o MRx0005 é capaz de inibir a peroxidação lipídica em aproximadamente 20%, que é uma capacidade antioxidante mais alta que o controle positivo, hidroxitolueno butilado (1% p/v).

Exemplo 6 - Eficácia da inoculação bacteriana na atividade da histona desacetilase

Sumário

[00290] A capacidade das composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para alterar a atividade da histona desacetilase foi investigada. A desregulação da histona desacetilase tem sido implicada na patogênese associada a doenças neurodegenerativas associadas à idade.

Material e Métodos

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

Linhagem celular

[00291] A linhagem celular HT-29 foi usada porque a histona desacetilase está presente.

Método

[00292] Os sobrenadantes isentos de células de culturas bacterianas de fase estacionária foram isolados por centrifugação e filtração em um filtro de 0,22 µm. As células HT-29 foram usadas 3 dias após a confluência e foram reduzidos em 1 mL de DTS 24 horas antes do início do experimento. As células HT-29 foram expostas com sobrenadante livre de células a 10% diluído em DTS e este foi deixado a incubar por 48 horas. As proteínas nucleares foram então extraídas usando o kit de extração Sigma Aldrich Nuclease e as amostras foram congeladas rapidamente antes da medição da atividade do HDAC. A atividade HDAC foi avaliada fluorometricamente usando o kit Sigma Aldrich (Reino Unido).

Resultados

[00293] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 8. A Figura 8 mostra que o MRX0005 é capaz de reduzir os níveis de atividade da histona desacetilase.

Exemplo 7 - Nível de produção de indol em bactérias

Sumário

[00294] A capacidade das bactérias da invenção de produzir indol foi investigada. O indol tem sido implicado na atenuação da inflamação e do es-

teste oxidativo.

Material e Métodos

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

[00295] ATCC 11775 é uma cepa de referência bacteriana que é conhecida por produzir indol.

Método

[00296] As células bacterianas intactas em fase estacionária foram incubadas com triptofano 6mM por 48 horas. As espécies bacterianas que possuem a enzima triptofanase utilizarão o triptofano como substrato para produzir indol. Após o período de incubação de 48 horas, o sobrenadante foi removido e adicionado ao reagente de Kovac para quantificação de indol. Padrões, soluções de estoque e reagentes foram preparados usando métodos padronizados validados internamente.

Resultados

[00297] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 9. A Figura 9 mostra que o MRx0005 tem a capacidade de produzir indol a partir do triptofano, em concentrações de aproximadamente 0,2 mM.

Exemplo 8 – Nível de produção de quinurenina em bactérias

Sumário

[00298] A capacidade das bactérias da invenção de produzir indol foi investigada. A desregulação da via da quinurenina pode levar à ativação do sistema imunológico e ao acúmulo de compostos potencialmente neurotóxicos. Mudanças no metabolismo da quinurenina podem estar envolvidas no desenvolvimento das doenças de Parkinson.

Cepa bacteriana

755: *Parabacteroides distasonis*

[00299] O DSM 17136 é uma cepa de *Bacteroides copricola* que é conhecida por produzir quinurenina.

Método

[00300] Os sobrenadantes isentos de células de culturas bacterianas de fase estacionária foram isolados por centrifugação e filtração em um filtro de 0,22 µm e congelados até o uso. Padrões, soluções de estoque e reagentes de quinurenina foram preparados usando métodos padronizados validados internamente. As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético e centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dispensado em uma placa de 96 poços. O reagente de Ehrlich foi utilizado para a detecção de quinurenina e adicionado na razão de 1:1.

Resultados

[00301] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 10. A Figura 10 mostra que o MRx0005 tem capacidade para produzir quinurenina a uma concentração de aproximadamente 70 µM.

Exemplo 9 - neuroproteção

[00302] As células SHSY-5Y diferenciadas de RA foram tratadas com MPP+, o metabólito ativo do MPTP, um produto químico amplamente utilizado para imitar *in vitro* e *in vivo* algumas das características da patologia da DP. A viabilidade celular foi medida como a taxa de respiração das mitocôndrias (Figura 11). Tanto o MRx0005 quanto o MRx0029 mostraram efeitos significativos e promovem *per se* um aumento da atividade metabólica das mitocôndrias nas células SHSY-5Y. A proteção MRx0005 foi de cerca de 20% em comparação com a amostra tratada com YCFA-MPP+, aproximadamente a mesma observada para o controle positivo de quercetina (Fig. 11).

Exemplo 10 – Produção de metabólitos – metabólitos no cérebro

Fundamentos

[00303] Os metabólitos presentes nos sobrenadantes das bactérias podem influenciar diretamente a resposta do hospedeiro ao estresse oxidativo, comunicação célula-célula e neuroproteção. Os metabólitos que desempenham um papel fundamental nos processos neurológicos foram medidos durante a triagem *ex vivo* no tecido cerebral de camundongos alimen-

tados com MRx0005 e MRx0029.

Métodos

Animais

[00304] Os camundongos machos adultos BALBc (Envigo, UK) foram alojados em um ciclo de 12 horas claro-escuro; comida padrão para roedores e água estavam disponíveis *ad libitum*. Todas as experiências foram realizadas de acordo com as diretrizes europeias após a aprovação pelo Comitê de Experimentação de Ética Animal da University College Cork. Os animais tinham 8 semanas de idade no início do experimento.

Projeto de Estudo

[00305] Os animais foram autorizados a habituar-se à sua sala de espera por uma semana após a chegada à unidade animal. Eles recebem gavage oral (dose de 200 μ L) de bioterapêuticos vivos na dose de 1×10^9 CFU por 6 dias consecutivos entre as 15:00 e as 17:00. No dia 7, os animais são decapitados e os tecidos são colhidos para experimentação.

Coleta de Tecidos

[00306] Os animais foram sacrificados de maneira aleatória em relação ao tratamento e condição de teste; a amostragem ocorreu entre 9h e 13h. O sangue do tronco foi coletado em tubos de EDTA de potássio (ácido etilenodiaminotetracético) e girado por 15 min a 4000 g. O plasma foi isolado e armazenado a -80°C para análise posterior. O cérebro foi rapidamente excisado, dissecado e cada região do cérebro foi congelada rapidamente em gelo seco e armazenada a -80°C para análise posterior. O baço foi removido e processado imediatamente após o abate para estimulação imune *ex vivo*. O tecido intestinal (segmentos de 2 cm de íleo e cólon mais próximos do ceco foram excisados e o mais distante 1cm de tecido do ceco foi usado) foram montados nas câmaras Ussing para o ensaio de permeabilidade intestinal. O ceco foi removido, pesado e armazenado a -80°C para análise de SCFAs.

Análise de Monoamina

[00307] A concentração de neurotransmissores foi analisada por HPLC em amostras do tronco cerebral. Resumidamente, o tecido do tronco encefálico foi sonificado em 500 µl de fase móvel refrigerada com 4 ng/40 µl de N-metil 5-HT (Sigma Chemical Co., Reino Unido) como padrão interno. A fase móvel continha ácido cítrico 0,1 M, ácido octano-1-sulfônico 5,6 mM (Sigma), di-hidrogenofosfato de sódio 0,1 M, EDTA 0,01 mM (Alkem/Reagecon, Cork) e 9% (v/v) de metanol (Alkem/Reagecon) e foi ajustado para pH 2,8 usando hidróxido de sódio 4 N (Alkem/Reagecon). Os homogenatos foram então centrifugados por 15 min a $22.000 \times g$ a 4°C e 40 µl do sobrenadante injetado no sistema HPLC que consistia em um controlador de sistema SCL 10-Avp, detector eletroquímico LECD 6A (Shimadzu), uma bomba LC-10AS, um forno CTO-10A, um autoinjeter SIL-10A (com o resfriador de amostras mantido a 40°C) e um desgaseificador Gastorr on-line (ISS, Reino Unido). Uma coluna de fase reversa (Kinetex 2,6 µ C18 100 × 4,6 mm, Phenomenex) mantida a 30°C foi empregada na separação (Vazão 0,9 ml/min). O eletrodo de trabalho de carbono vítreo combinado com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Shimdazu) operou a +0,8 V e os cromatogramas gerados foram analisados usando o software Class-VP 5 (Shimadzu). Os neurotransmissores foram identificados por seus tempos de retenção característicos, determinados por injeções padrão, que são executadas em intervalos regulares durante a análise da amostra. As razões das alturas dos picos de analito versus padrão interno foram medidas e comparadas com a injeção padrão. Os resultados foram expressos em ng de neurotransmissor por g de peso fresco de tecido.

Análise metabólica

[00308] Para análise do metabólito de GC, amostras de sobrenadantes bacterianos foram derivatizadas com cloroformato de metila usando uma versão ligeiramente modificada do protocolo descrito em Smart et al. (DOI: 10.1038/nprot.2010.108). Todas as amostras foram analisadas em ordem aleatória. A análise foi realizada usando GC (7890B, Agilent) acoplado a um

detector de quadropolo (59977B, Agilent). O sistema foi controlado pela ChemStation (Agilent). Os dados brutos foram convertidos para o formato netCDF usando o Chemstation (Agilent), antes de os dados serem importados e processados no Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) usando o software PARADISE descrito por Johnsen et. al (DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.052).

[00309] Para análise de ácidos graxos, amostras foram acidificadas com ácido clorídrico e os padrões internos marcados com deutério foram adicionados. Todas as amostras foram analisadas em ordem aleatória. A análise foi realizada usando uma coluna de alta polaridade (Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. Coluna 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalada em um GC (7890B, Agilent) acoplado a um detector de quadropolo (59977B, Agilent). O sistema foi controlado pela ChemStation (Agilent). Os dados brutos foram convertidos para o formato netCDF usando o Chemstation (Agilent), antes de os dados serem importados e processados no Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) usando o software PARADISE descrito por Johnsen et al (DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.052).

Resultados – produção de neurotransmissores

[00310] Os resultados são mostrados na Figura 12, que mostra que no cérebro de camundongos alimentados com MRx0029, os níveis de noradrenalina aumentam ($p=0,0507$), acompanhados de um leve aumento de serotonina e 5-HIAA. Esses dados apoiam a análise metabólica apresentada abaixo, sugerindo que o MRx00029 é o maior produtor de ácido 4-hidroxifenilacético, um antioxidante conhecido (Weon et al, 2016). Mais importante, o ácido 4-hidroxifenilacético é um intermediário sintético da dopamina e noradrenalina e uma molécula bioativa importante (Huot et al, Parkinson's Disease 2015). De fato, na DP, as alterações degenerativas se estendem além do sistema dopaminérgico, afetando igualmente os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, o que, por sua vez, leva à diminuição dos níveis de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e noradrenalina (noradrenalina), tanto estriatais quanto extra-estruturas estriatais (Scatton B, Javoy-

Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y Brain Res. 1983 Sep 26; 275 (2): 321-8). O L-DOPA tem como principais alvos as características da DP relacionadas à dopamina, no entanto, não abordam as reduções na 5-HT e na noradrenalina. Além disso, quanto maior a duração do tratamento com L-DOPA, mais visíveis são as complicações motoras e não motoras (por exemplo, discinesia, sintomas psiquiátricos) (Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R, Mov Disord. 2005 fev; 20 (2): 190-9.) Portanto, esses dados demonstram que as bactérias que produzem ácidos orgânicos, como o ácido 4-hidroxifenilacético, ácido succínico podem ser úteis na terapia, em particular no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Resultados – produção de metabólitos

[00311] Os metabólitos presentes nos sobrenadantes das bactérias podem influenciar diretamente a resposta do hospedeiro ao estresse oxidativo, comunicação célula-célula e neuroproteção especificamente. Os metabólitos no sobrenadante das culturas de MRX0029 e MRX0005 foram analisados e os resultados são mostrados na Figura 13.

[00312] Alguns metabólitos mostraram uma diferença impressionante entre as duas linhagens analisadas. A concentração de ácido succínico foi particularmente elevada no MRx0005. Curiosamente, a razão amostra/meio para ácido 4-hidroxifenilacético foi significativamente maior no MRx0029 (Fig. 13).

[00313] A análise de ácidos graxos nos sobrenadantes revelou uma dicotomia interessante nas duas linhagens: MRx0005 produziu principalmente ácido acético e propanoico, enquanto MRx0029 produziu ácido butanoico, pentanoico e hexanoico, nas formas linear e ramificada (Fig. 14B). As duas linhagens pareciam muito diferentes e, em particular, a produção de ácido succínico e ácido 4-hidroxifenilacético por MRx0005 e MRx0029, respectivamente, foi notável (Figura 14A). Além disso, o MRx0005 parece produzir mais ácidos graxos de cadeia curta C2 e C3, enquanto o MRx00029 produziu mais C4 (butirato) e ácidos graxos de cadeia média lineares e ra-

mificados, incluindo o ácido hexanoico.

[00314] O ácido succínico é um metabólito do ciclo de Krebs envolvido na fosforilação oxidativa. O complexo de fosforilação oxidativa é uma etapa fundamental para o tráfego sináptico de proteínas e vesículas nas regiões proximal e distal (Budd SL e Nichols, 1998). Sua disfunção tem sido relacionada em distúrbios neurodegenerativos, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson e ataxia espinocerebelosa tipo 1 (Manczak M et al. 2004; Ebadi et al., 2001). Esses achados são particularmente interessantes, pois o ácido succínico pode aumentar a atividade mitocondrial e apoiar neurônios vulneráveis em doenças neurodegenerativas relacionadas a proteínas defeituosas, incluindo DP (Ferro et al, Plos one, 2017). O BDNF e o ácido succínico têm uma atividade protetora semelhante, não apenas na neurodegeneração, mas também em transtornos mentais como depressão e ansiedade, que são bastante comuns entre pacientes diagnosticados com DP ou DA.

[00315] A Figura 14B também demonstra que o MRX0029 é um produtor de butirato (ácido butanoico). Isso pode ser significativo porque o butirato tem um papel conhecido na redução da impermeabilidade da barreira hematoencefálica, que tem um efeito neuroprotetor [59]. Essa propriedade do MRx0029 (e outras bactérias neuroprotetoras) pode contribuir para sua eficácia.

Exemplo 11 - Modulação da expressão de mRNA de proteínas de junção estreita

[00316] Visto que evidências recentes sugerem que a disfunção e inflamação intestinal é um sintoma não motor associado à DP, foi investigada a capacidade das cepas bacterianas da invenção de causar qualquer disfunção da barreira intestinal. As monocamadas celulares epiteliais HT29-mtx, produtoras de mucina (Gagnon et al., J Microbiological Methods, 2013) foram usadas como modelo *in vitro* para avaliar a ruptura da barreira intestinal e a estimulação imunológica após o tratamento com MRx0005 e

MRx0029. Células HT29-mtx diferenciadas expostas ao forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) secretam uma quantidade significativa de IL-8; em contraste, o tratamento por 24h com os sobrenadantes bacterianos de MRx0005 e MRx0029, induziu uma secreção ainda menor de IL-8 em comparação com as células não tratadas e tratadas com YCFA (Fig. 14A).

[00317] A capacidade do MRx0005 e do MRx0029 de regular a permeabilidade epitelial modificando a transdução de sinal intracelular envolvida na expressão e localização de proteínas envolvidas na formação da barreira intestinal foi então investigada.

[00318] O RNA foi isolado e a análise quantitativa de RT-PCR (qRT-PCR) foi realizada para caracterizar as alterações na expressão gênica de proteínas de junção estreita durante a incubação com MRx0005 e MRx0029. A liberação de MRx0029 melhorou a expressão do mRNA de Ocludina, Vilina, Proteína de Junção Estreita 1 e 2 (respectivamente TJP1 e TJP2) após incubação de 2h (Fig. 14B). Por outro lado, a exposição ao MRx0005 não alterou a expressão gênica de proteínas de junção estreita, indicando que as duas cepas agem de maneira diferente na barreira intestinal.

[00319] Os resultados *in vitro* foram comparados com dados da análise paralela *ex vivo* no intestino de camundongos alimentados com MRx0005 e MRx0029. A expressão gênica de TJP2 e ocludina foi quantificada no cólon e no íleo. Os dados *ex vivo* refletem perfeitamente os dados *in vitro*, pois o MRx0029 foi capaz de regular significativamente o TJP1 e a ocludina ($p=0,073$) na região do cólon do intestino murino (Fig. 14C+14D). MRx0029 também foi capaz de diminuir a função de permeabilidade no cólon dos mesmos camundongos (Fig. 14E+14F).

Materiais e métodos - extração de RNA e análise de qPCR

[00320] O RNA total foi extraído usando o mini-kit RNeasy (Qiagen, Manchester, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante, e a concentração de RNA determinada por absorbância a 260/280nm usando

um espectrofotômetro (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE). Para análise da expressão do mRNA, o cDNA foi preparado a partir de 2000 ng de RNA total usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher, Loughborough) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de transcrição reversa foram realizadas em um termociclador (Biometra, Alemanha) a 25° C por 10 minutos, 37° C por 120 minutos e 85° C por 5 minutos. O cDNA resultante foi amplificado em duplicatas pelo ensaio SYBR-Green PCR e os produtos foram detectados na máquina de PCR em tempo real QuantStudio 7 (Applied Biosystems, Reino Unido) usando um perfil padronizado (desnaturação inicial de 95° C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 10 segundos de desnaturação a 95° C e 30 segundos de recozimento/extensão a 60° C). Uma etapa de dissociação foi adicionada após os 40 ciclos para gerar uma curva de fusão. A análise foi realizada usando o software de Applied Biosystems QuantStudio Real-Time PCR Software v1.2. As sequências iniciadoras para Actina, Vilina, Ocludina, TJP1 e TJP2 são fornecidas na listagem de sequência.

Exemplo 12 – Nível de secreção de BDNF nas células SHSY-5Y

Fundamentos

[00321] O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma molécula onipresente no cérebro associada ao desenvolvimento neural, neuroproteção e neuro-regeneração. O BDNF não apenas protege contra a neurodegeneração, mas também distúrbios mentais como depressão e ansiedade, que são bastante comuns entre pacientes diagnosticados com DP ou DA.

Métodos

[00322] As placas SH-SY5-SY foram plaqueadas em placas de 24 poços com densidade de 60.000 células/poço e colocadas na incubadora. Após 24 h, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram usadas no dia 10 de diferenciação. Para o tratamento, o meio de diferenciação foi removi-

do e substituído por 450 µL de meio de crescimento completo e 50 µL de bactérias SN foram adicionadas aos poços tratados ou YCFA+ foi adicionado como Controle negativo.

Resultados

[00323] Os resultados são mostrados na Figura 15, que mostra que a liberação de MRX0005 em combinação com ácido retinoico aumenta a secreção de BDNF de células de neuroblastoma diferenciadas.

Exemplo 13 – Eficácia de inóculos bacterianos para reduzir os níveis oxidativos nas células

Fundamentos

[00324] A geração de espécies reativas de oxigênio contribui para a patologia de doenças neurodegenerativas. Investigou-se a capacidade das cepas bacterianas de proteger células SHSY-5Y e U373 diferenciadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pelo tratamento com Peróxido de Hidrogênio Tert-Butílico (PHTB).

Material e Métodos

Cepa bacteriana

Megasphaera massiliensis MRX0029

Método

[00325] As células SHSY-5Y foram plaqueadas em uma placa preta de fundo plano de 96 poços com densidade de 5000 células/poço e colocadas na incubadora de CO₂. Após 24 h, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias. No Dia 10, o meio de diferenciação foi removido e as células foram lavadas com PBS pré-aquecido e coradas com sonda molecular 10uM DCFDA por 20 minutos em meio de crescimento contendo 1% de FBS. Em seguida, as células foram lavadas com PBS pré-aquecido novamente e tratadas com 100 uM de TBHP na presença ou ausência de 10% de sobrenadante bacteriano por 2h. A intensidade da fluorescência foi medida usando o leitor de placas

TECAN em Ex/Em 485/530 nm.

Resultados

[00326] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 16. A Figura 16b mostra que o MRX0005 é capaz de inibir a produção de ERO em células diferenciadas de neuroblastoma SHSY-5Y. O MRX0005 também reduz a geração de ROS em células de astroglioblastoma (Figura 16a). Isso mostra que o MRX0005 possui atividade antioxidante geral.

Exemplo 14 – Teste de estabilidade

[00327] Uma composição descrita neste documento contendo pelo menos uma cepa bacteriana descrita neste documento é armazenada em um recipiente vedado a 25°C ou 4°C e o recipiente é colocado em uma atmosfera com 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% de umidade relativa. Após 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 ano, 1,5 anos, 2 anos, 2,5 anos ou 3 anos, pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% da cepa bacteriana deve permanecer como medida em unidades de formação de colônias determinadas por protocolos padrão.

Exemplo 15

Métodos

Animais

[00328] Os animais e o projeto de estudo utilizados foram os mesmos do Exemplo 10.

Cepas bacterianas

- 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005)
- *Megasphaera massiliensis* MRX0029

Coleta de Tecidos

[00329] Os animais foram sacrificados de maneira aleatória em relação ao tratamento e condição de teste; a amostragem ocorreu entre 9:00 e 14:30. O sangue do tronco foi coletado em tubos de EDTA de potássio (ácido etilenodiaminotetracético) e girado por 15 min a 4000 g. O plasma foi isolado e armazenado a -80°C para análise posterior. O cérebro foi rapida-

mente excisado, dissecado e cada região do cérebro foi congelada rapidamente em gelo seco e armazenada a -80°C para análise posterior. O baço foi removido, coletado em 5 mL de meio RPMI (com L-glutamina e bicarbonato de sódio, R8758 Sigma + 10% de FBS (F7524, Sigma) + 1% de Pen / Strep (P4333, Sigma)) e processado imediatamente após abates para estimulação imune ex-vivo. O tecido intestinal (segmentos de 2-3 cm de íleo e cólon mais próximos do ceco foram excisados e o mais distante 1 cm de tecido do ceco foi usado) foram montados nas câmaras Ussing para o ensaio de permeabilidade intestinal. O ceco foi removido, pesado e armazenado a -80°C para análise de SCFAs.

Análise de Monoamina

[00330] A concentração de neurotransmissores foi analisada como descrito no Exemplo 10

Ensaio de Citocinas do Baço

[00331] Os baços foram coletados imediatamente em meio RPMI de 5 mL após o sacrifício e cultivados imediatamente. As células do baço foram homogeneizadas pela primeira vez neste meio RPMI, seguidas de 5 minutos de incubação com 1 mL de tampão de lise RBC (11814389001 ROCHE, Sigma). Foram adicionados mais 10 mL de meio RPMI, seguidos de centrifugação 200G por 5 minutos. O sobrenadante foi então filtrado através de um filtro de 40 µm. As células foram contadas e semeadas (4.000.000/mL de meio). Após 2,5 h de adaptação, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS-2 µg/mL) ou concanavalina A (ConA-2,5 µg/mL) por 24 h. Após a estimulação, os sobrenadantes foram colhidos para avaliar a liberação de citocinas usando o Kit V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (camundongo) (Meso Scale Discovery, Maryland, EUA) para TNFα, IL-10, IL-1β, Interferon γ, CXCL2 e IL6. As análises foram realizadas usando o MESO QuickPlex SQ 120, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000, SECTOR S 600.

Análise da Expressão Gênica

[00332] O RNA total foi extraído usando o mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion/Life technologies, Paisley, Reino Unido) e tratado com DNase (Turbo DNA-free, Ambion/life technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada usando o Agilent Bioanalyzer (Agilent, Stockport, Reino Unido) de acordo com o procedimento do fabricante e um número de integridade de RNA (RIN) foi calculado. O RNA com valor de RIN>7 foi usado para experiências subsequentes. O RNA foi transcrito reversamente para cDNA usando o Applied Biosystems High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a Transcriptase Reversa Multiscribe (50 U/μL)(1)(2)(1)(10) foi adicionada como parte da mistura principal de RT, incubada a 25°C por 10 min, 37°C por 2 h, 85°C por 5 min e armazenado a 4°C. A PCR quantitativa foi realizada utilizando sondas (6-carboxifluoresceína - FAM) projetadas pela Applied Biosystems para genes alvo específicos de camundongos, enquanto se utilizava β-actina como controle endógeno. As reações de amplificação continham 1 μL de cDNA, 5 μL da 2X PCR Master Mix (Roche), 900 nM de cada iniciador e foram levadas a um total de 10 μL pela adição de água livre de RNase. Todas as reações foram realizadas em triplicado usando placas de 96 poços no sistema LightCycler®480. As condições de ciclagem térmica foram como recomendadas pelo fabricante (Roche) por 55 ciclos. Para verificar a contaminação de amplicons, cada execução não continha controles de modelo em triplicado para cada sonda usada. Os valores do limiar do ciclo (Ct) foram registrados. Os dados foram normalizados usando a β-actina e transformados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e apresentados como uma modulação vs. grupo controle.

Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta no Conteúdo Cecal

[00333] O conteúdo de ceco foi misturado e agitado no vórtex com água

MilliQ e incubado em temperatura ambiente por 10 min. Os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação (10000 g, 5 min, 4°C) para aglomerar bactérias e outros sólidos e filtração por 0,2 µm. Foi transferido para um frasco de GC claro e o ácido 2-etilbutírico (Sigma) foi usado como padrão interno. A concentração de AGCC foi analisada usando um sistema de ionização por chama Varian 3500 GC, equipado com uma coluna ZB-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm; Phenomenex). Uma curva padrão foi construída com diferentes concentrações de uma mistura padrão contendo acetato, propionato, isobutirato, n-butirato, isovalerato e valerato (Sigma). Os picos foram integrados usando o software Varian Star Chromatography Workstation versão 6.0. Todos os dados do SCFAs são expressos em µmol/g.

Análise Estatística

[00334] Os dados normalmente distribuídos são apresentados como média $\pm$ SEM; Conjuntos de dados não paramétricos são apresentados como mediana com intervalo interquartil. O teste t bicaudal não pareado foi aplicado para analisar os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi usado para não paramétricos. O coeficiente de correlação de classificação de Spearman foi empregado para a análise de correlação nos conjuntos de dados agrupados. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo em todos os casos.

Resultados – Produção de neurotransmissores

[00335] Os resultados na Figura 17 mostram o efeito do tratamento com MRx005 na concentração de neurotransmissores no cérebro de camundongos. Mais notavelmente, o tratamento com MRx005 leva a uma diminuição da dopamina.

Resultados – Expressão gênica

[00336] Expressão de genes para receptores de neurotransmissores [receptor de serotonina 1a(5-HTR1a), receptor de dopamina D1, subunidade B1 do receptor GABA, receptor GABAA, receptor NMDA2A (Grin2A) e receptor NMDA2B (Grin2b)], marcadores inflamatórios [IL-1 β , IL6, CD11b,

TNF α e TLR4] e marcadores endócrinos [fator de liberação de corticosterona (CRF), receptores 1 e 2 do fator de liberação de corticosterona (CRFR1, CRFR2), fator de neurotrofina derivado do cérebro (BDNF), receptor de vasopressina, receptor de ocitocina, receptor de glicocorticoide e receptor de mineralocorticoide] foram analisados no tecido cerebral do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal.

[00337] As Figuras 18-32 mostram as alterações na expressão gênica após o tratamento com MRX005 ou MRX0029 no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. O tratamento com MRx0029 levou a um aumento na expressão do receptor de glicocorticoide na amígdala (Figura 25C). A Figura 26A mostra que o MRx005 aumentou significativamente a expressão de BDNF na amígdala, enquanto o tratamento com MRx0029 aumentou significativamente a expressão de TLR4 na amígdala (Figura 26B).

[00338] Tanto o MRx005 quanto o MRx0029 podem aumentar a expressão de CD11b na amígdala (Figura 27A), enquanto a expressão de IL-6, Grin2a e Grin2b é reduzida após o tratamento com MRx005 (Figuras 27B-D). Além disso, MRx005 e MRx0029 aumentaram significativamente a expressão de GABRA2 e aumentaram a expressão de GABBR1 na amígdala.

[00339] O tratamento com MRx005 levou a um aumento significativo na expressão de BDNF no córtex pré-frontal (Figura 29B).

Discussão

[00340] A administração de MRx005 e MRx0029 causou alterações na expressão gênica, especialmente na amígdala.

Resultados – Efeito na expressão de Tph1 e IDO-1

[00341] A Figura 33 mostra que o MRx0029 pode aumentar significativamente a expressão triptofano hidroxilase-1 (Tph1) no cólon e que o tratamento com MRX005 pode aumentar a expressão de IDO-1 no cólon. O tratamento com MRX005 aumentou a expressão de Tph1 e IDO1 no íleo, enquanto o MRX029 não teve efeito na expressão desses genes no íleo (Figura 34).

[00342] Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase-1 (IDO-1), a primeira enzima limitadora de taxa na via do triptofano/quinurenina, enquanto a triptofano hidroxilase 1 (Tph1), uma isoforma da enzima triptofano hidroxilase, responsável pela síntese da serotonina. Esses dados sugerem que o MRx0029 e o MRx005 podem afetar os níveis de serotonina e a via do triptofano/quinurenina.

Resultados – Efeito nos níveis do metabólito do triptofano

[00343] A Figura 35 mostra o efeito do tratamento com MRx005 nos níveis de quinurenina e triptofano em circulação.

Resultados – Efeito na expressão de citocinas de esplenócitos

[00344] O ensaio de esplenócitos ex-vivo envolve desafiar os esplenócitos (células isoladas do baço - um órgão principal envolvido na defesa imune), com um desafio mimético bacteriano ou mimético viral.

[00345] MRX005 reduziu significativamente os níveis de interferon- γ nos esplenócitos após um desafio com LPS (Figura 36). Além disso, o MRX005 reduziu os níveis de interleucina-6 e o fator de necrose tumoral após um desafio com LPS (Figuras 38 e 39, respectivamente). O tratamento com MRx0029 levou a uma redução no interferon- γ , na interleucina-1 β e na interleucina-6 após um desafio com LPS (Figuras 36, 37 e 38, respectivamente).

[00346] O tratamento com MRx005 e MRx0029 levou a um aumento nos níveis do quimioatrativo CXCL1 (Figura 41).

Resultados - Efeito nos Níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta do Ceco

[00347] Os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) são produzidos quando fibras não digeríveis da dieta são fermentadas por bactérias no intestino. Os efeitos da liberação do MRX005 são mostrados na Figura 42.

Exemplo 16 – Análise adicional das alterações por MRX029 e MRX005 nos níveis de expressão gênica

Métodos

Linhagem celular

Células SH-SY5Y

Cepas bacterianas

- 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005)
- *Megasphaera massiliensis* (MRX0029)

qPCR

[00348] As SHSY5Y foram plaqueadas em placas de Petri de 10cm com uma densidade de 2×10^6 células. Após 24h, as células foram tratadas em meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS sem RA) com 10% de sobrenadantes de bactérias ou YCFA+, 10uM RA, 200uM ácido hexanoico ou 200uM ácido valproico, por 17 horas. Depois, foram obtidas imagens representativas usando o microscópio de núcleo EVOS XL com contraste de fase com ampliação de 40X/0,65. As células foram coletadas e o RNA total foi isolado de acordo com o protocolo do RNeasy mini kit protocol (Qiagen). Os cDNAs foram feitos usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems). A expressão gênica foi medida usando qPCR. GAPDH foi utilizado como controle interno. A mudança de dobra foi calculada de acordo com o método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. As sequências iniciadoras para MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 e NSE são fornecidas na listagem de sequências.

Imunomarcacão e imagem celular

[00349] As células foram semeadas em lâminas de câmara de 8 poços (Marienfeld Laboratory Glassware) a 5×10^4 células/poço durante a noite e foram tratadas com sobrenadante bacteriano a 10% por 24 h. Para diferenciação, as células foram tratadas com 10 nM de RA por 5 dias antes de serem tratadas com sobrenadante bacteriano livre de células por 24 h. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente (TA). As células fixas foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 1% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com tampão de bloqueio (4% BSA/PBS) por 1 hora à temperatura ambiente antes de adicionar anticorpo anti-MAP2 ou β 3-tubulina (sc-74421 e sc-80005 respectiva-

mente, Santa Cruz Biotechnology Inc) diluído em 1% de BSA/PBS por 12 h a 4°C. Eles foram então lavados duas vezes com PBS, seguido de incubação com conjugado Alexa Flour 488 anti-camundongo (Molecular Probes Inc) e faloidina conjugada Alexa Flour 594 (ab176757, Abcam) por 1 h à temperatura ambiente. Após serem lavadas 3X com PBS, as lâminas foram coradas com DAPI e montadas com Vectashield® (Vector Laboratories). As lâminas foram visualizadas usando um microscópio Axioskop 50 (Zeiss) equipado com uma objetiva Korr de 63x/1,2 W e conjuntos de filtros adequados para a detecção dos fluorocromos utilizados. Os tempos de exposição manual para a aquisição digital de imagens imunomarcadas com MAP-2 foram mantidos constantes, permitindo a comparação entre diferentes poços e tratamentos. Os tempos de exposição à faloidina (F-actina) e DAPI variaram de acordo com o campo de visão. Os campos de visão randomizados foram adquiridos usando uma câmera QImaging controlada pelo software Image Pro Plus. As imagens foram salvas como arquivos TIFF e abertas no Adobe Photoshop CC 2015.1.2. Imagens das imagens de MAP-2, DAPI e Phalloidin foram então sobrepostas e fundidas. Imagens representativas foram selecionadas para ilustrar as diferenças de abundância e localização das proteínas examinadas.

Immunoblotting

[00350] Células SH-SY5Y cultivadas nas condições indicadas descritas acima, tratadas com MRx0005 e MRx0029 por 24h e depois lisadas em tampão RIPA contendo coquetel de inibidores de protease (Roche Diagnostics, Reino Unido). A concentração de proteína foi estimada usando o kit de ensaio de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), separada por SDS-PAGE e transferida para uma membrana de PVDF. As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite seco sem gordura ou 5% de BSA e incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários (respectivamente MAP2 e β 3-tubulina). Os blots foram então incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) e

as proteínas foram detectadas pelo kit de detecção por quimioluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Para MAP2 e β 3-tubulina, a β -actina serviu como controle para monitorar a variabilidade da carga de proteínas entre as amostras.

Resultados e Discussão

Expressão gênica

[00351] A Figura 43 apresenta as alterações induzidas por MRx0029 e MRX005 nos níveis de expressão de Actina, Villina, Ocludina TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 e NSE.

Resultados - Microscopia e Immunoblotting

[00352] A Figura 44 mostra a alteração no nível de expressão de MAP2 nas células SHSY5Y, conforme determinado por microscopia confocal. Os níveis de expressão de MAP2 e B3-tubulina também foram quantificados por análise de immunoblot. Os resultados mostrados nas Figuras 44M e N indicam que MRX029 induz um aumento na expressão de nível de MAP2

Sequências

Iniciadores adicionais usados em qPCR (com SEQ ID NO entre colchetes)

Gene ID	Sequência Dianteiro	Sequência Reverso
NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (30)	GCCACCATTGATCACGTTGA (31)
PINK1	CCCAAGCAACTAGCCCCTC (32)	GGCAGCACATCAGGGTAGTC (33)
PARK7	GTAGCCGTGATGTGGTCATTT (34)	CTGTGCGCCCAGATTACCT (35)
SYP	CTCGGCTTTGTGAAGGTGCT (36)	GGCTTCATGGCATCAACTTCA (37)

Sequências

SEQ ID NO: 1 (gene de *Parabacteroides distasonis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 5825 - AB238922)

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcgggg tgtagcaata caccgcccgc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc
121 aacttgcccta tcagaggggg ataaccgggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg
181 gatcccgcat ggggaatattt gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt
241 aggagtttgg cggggtaacg gccacccaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag
301 gtcccccaaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat
361 attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgcgt gagggatgaa ggttctatgg
421 atcgtaaacc tcttttataa ggggaataaag tgcgggacgt gtcccgtttt gtatgtacct

```

481 tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcc a gcagccgcgg taatacggag gatccgagcg
 541 ttatccggat ttattgggtt taaagggcgc gtagggcgcc ttttaagtca gcggtgaaag
 601 tctgtggctc aaccatagaa ttgccgttga aactgggggg cttgagtatg tttgaggcag
 661 gcggaatgcg tgggtgtagcg gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag
 721 gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtgggggatca aacaggatta
 781 gataccctgg tagtccacgc agtaaagcat gatcactagc tgtttgcgat aactgtgaag
 841 cggcacagcg aaagcgtaa gtgatccacc tggggagtag gccggcaacg gtgaaactca
 901 aaggaattga cggggggccc cacaagcggg ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg
 961 aggaacotta cccgggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacott ttctagcaat
 1021 agccgtttgc gaggtgctgc atggttgctg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag
 1081 tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggt
 1141 gggactgcc a gcgtaagctg cgaggaaggc ggggatgacg tcaaatacgc acggccotta
 1201 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaag ggaggccacc tggcgacagg
 1261 gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccoga ctccgtgaag
 1321 ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt
 1381 acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg gggtaacctga agtccgtaac cgaaaggatc
 1441 ggcctagggt aaaactggtg actggggcta agtcgtaaca aggttaacc

SEQ ID NO: 2 (gene de *Parabacteroides distasonis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 13400 - AB238923)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggcgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctggggggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac agtgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgtaagt gatccacctg gggagtagc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtggg ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcggg ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctcgc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacagggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg gggatgacgtc aatacagcac ggccottaca
 1201 tccggggcga cacacgtggt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacaggga

1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caacccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccc ggccttgta
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 3 (gene de *Parabacteroides distasonis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 13401 - AB238924)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac ccgcggcgga cggcgccacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttgcctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggatth attgggttta aagggtgctg agggggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctcgc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacagggt gatgctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg atgccacctg gcgacagggg
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caacccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccc ggccttgta
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 4 (gene de *Parabacteroides distasonis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 13402 - AB238925)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga cggcgccacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat

421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattht attgggttht aagggtgcgt agggggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacagc agaaccccgga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tctactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtagcgc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg gggggcccgca caagcggagg aacatgtggg ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctgctc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggg aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgct aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtggt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 5 (gene de *Parabacteroides distasonis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 13403 - AB238926)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga cgggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggc
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattht attgggttht aagggtgcgt agggggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacagc agaaccccgga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tctactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtagcgc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg gggggcccgca caagcggagg aacatgtggg ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctgctc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggg aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgct aaatcagcac ggcccttaca

1201 tccggggcga cacacgtggtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacagggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccc ggccctgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggttaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 6 (gene de *Parabacteroides distasonis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 13404 - AB238927)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga cggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga agtcggact aataccgcac gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt agggggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacagggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtggtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacagggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccc ggccctgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggttaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 7 (gene de *Parabacteroides merdae* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 9497 - AB238928)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaacgcag atggataggg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag

361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggattttattg ggttttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttacta acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tggtagagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaa atcagcagcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttataa tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttccgacgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacga gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc
 1381 ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcg taaccgcaag
 1441 gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO: 8 (gene de *Parabacteroides merdae* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: JCM 13405 - AB238929)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggttcc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaacgcag atggataggg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag
 361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggattttattg ggttttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct

1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttacta acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tggtagagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaa at cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttaca tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacgt ttccccggcc
 1381 ttgtacacac cgcccgtcaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcg taaccgcaag
 1441 gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO:9 (sequência de consenso de 16S rRNA para a cepa 755 de *Parabacteroides distasonis*)

AMCCGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCTATCAGAGGGGGATAACCCGGCGA
 AAGTCGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGCTAAAGATTCATCGCTGATAGATA
 GGCATGCGTTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTAAACGGCCACCAAACCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGA
 AGGTCCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATG
 GGCGTGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGA
 ATAAAGTGCGGGACGTGTCCCGTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTTTTAAGTCA
 GCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAGAATTGCCGTTGAAACTGGGAGGCTTGAGTATGTTTGAGGCAGGCG
 GAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCA
 TTAGTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGA
 TGATCACTAGCTGTTTTCGATACACTGTAAGCGGCACAGCGAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGGAGTACGC
 CGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGAT
 ACGCGAGGAACCTTACCCGGGTTTGAACGCATTTCGGACMGAKGTGGAACACATTTTCTAGCAATAGCCATTT
 GCGAGGTGCTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCT
 TGCCACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGGACTGCCAGCGTAAGCTGCGAGGAAGGCGGGG
 ATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACATCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGTGGAACAAAGGAAGCC
 ACCTGGCGACAGGGAGCGAATCCCCAAACACGTCTCAGTTTCGGATCGGAGTCTGCAACCCGACTCCGTGAAG
 CTGGATTGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGT
 CAAGCCATGGGAGCCGGGGGTACCTGAAGTCCGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAAACTGGTGACTGGG
 GCTAAGTCGTACGGGG

SEQ ID NO: 10 (sequência do genoma da cepa 755) - ver listagem de sequências eletrônicas.

SEQ ID NO:11 (sequência 16S de rRNA de consenso para a cepa MRX0029 de *Megasphaera massiliensis*)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAACCTGCCCTTCAGATGG
 GGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATACGTTCTTTCCGCCGCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGG
 CCTTCGGGCTTTTCGCTGGAGGAGGGGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAACGGCCACCAAGGCGA
 CGATCAGTAGCCGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGCCTTCGGG
 TTGTAAAGTTCTGTTATATGGGACGAACAGGACATCGGTTAATACCCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGA
 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG

TAAAGGGCGCGCAGGCGGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACT
 GTGAAGCTCGAGTGTGCGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAAGCGGCTTTCTGGACGACAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTA
 GATACCCCGGTAGTCTGGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTGCCGGAGT
 TAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCA
 CAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATTGATTGCTACG
 GAAAGAGATTTCCGGTTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGTGCACGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTG
 AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAGCACCTCGGGTGGGGACTCAGA
 AGAGACTGCCGCAGACAATGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTA
 CACACGTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCCAAAAACAGAGTCC
 CAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCG
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCATTACACCCGAAGCCGGTGAG
 GCAACCGCAAG

Iniciadores usados para qPCR (com SEQ ID NO entre colchetes)

Nome	Sequência Dianteiro	Sequência Reverso
ACTB	GATCAAGATCATTGCTCCTC (12)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAC (13)
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (14)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (15)
MAP2	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (16)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (17)
Ocludina	AAGAGGAATTTTGACACTGG (18)	GCCATGTACTCTTCACTTTC (19)
TJ1	AAGTCACACTGGTGAAATCC (20)	CTCTTGCTGCCAAACTATCT (21)
TJP2	CCCTCCCCTGGATCAGGAT (22)	GCCATCAAACCTCGTCCATCA (23)
Vilina	CATTACCTGCTCTACGTTTG (24)	AGATGGACATAAGATGAGGTG (25)

REFERÊNCIA

- [1] US 2016/0067188
- [2] Eckburg *et al.* (2005) *Science*. 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan *et al.* (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang *et al.* (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580

- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis*. 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad *et al.* (2013) *BMJ*. 347:f6471.
- [16] Mayer *et al* (2014) *The Journal of Neuroscience* 34(46):15490 –15496
- [17] Cryan and Dinan (2015) *Neuropsychopharmacology*, 40: 241-2.
- [18] Zhou and Foster (2015) *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11: 715–723.
- [19] Wang and Kasper (2014) *Brain Behav Immun*. 38: 1–12.
- [20] WO2016/203220
- [21] Chapter 38 - Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system (2014) *Handbook of Clinical Neurology* 119, 577-584
- [22] Sakamoto and Benno (2006) *Int J Syst Evol Microbiol*. 56(Pt 7):1599-605.
- [23] Masco *et al.* (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [24] Srůtková *et al.* (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [25] Pal R *et al*, *Neurol Res* 2016, 38(12):1111-1122
- [26] Daniele SG *et al*, *Sci Signal* 2015, 8(376):ra45
- [27] Wang *et al.* (2016) *J Neurogastroenterol Motil* 22: 589-605.
- [28] Foguem & Manckoundia (2018) *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18: 24
- [29] Ludolph *et al.* (2009) *Eur J Neurol*. 16(3): 297–309.
- [30] Galpern & Lang (2006) *Neurological Progress* 59 (3) 449-458
- [31] Zadori *et al* (2012) *Journal of Neural Transmission*, 119, 2, 275–283
- [32] Lee *et al* (2008) *European J. Cell Biology* 87:389–397
- [33] Pirooznia and Elefant (2013) *Front Cell Neurosci*. 7: 30.
- [34] Tang, *et al.* (2017) *J Am Heart Assoc*, 6(10).
- [35] Wang *et al.* (2015) *PNAS* 112(9):2583-2858
- [36] Psaty *et al.* (2003) *JAMA*, 289(19):2534–44
- [37] *Lancet*. (1995) 346(8991–8992):1647–53

- [38] Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9–24.
- [39] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [40] Leslie *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- [41] Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [42] Kailasapathy *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [43] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Edição, (1994), Editado por A Wade e PJ Weller
- [44] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [45] US 2016/0067188
- [46] *Handbook of Microbiological Media, Quarta Edição* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [47] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [48] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [49] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edição, ISBN: 0683306472.
- [50] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
- [51] *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [52] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir e C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [53] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [54] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [55] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5ª edição (Current Protocols).

[56] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2ª edição (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[57] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30

[58] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

[59] Michel and Prat (2016) *Ann Transl Med.* 4(1): 15.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*, para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; doença de Alzheimer, incluindo a síndrome de Benson; doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência vascular e frontotemporal; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; comprometimento cognitivo relacionado ao HIV e degeneração corticobasal.

2. Composição para uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson.

3. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método de tratamento ou prevenção de doença neurodegenerativa de início precoce.

4. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método para prevenir ou retardar o início ou a progressão de um distúrbio neurodegenerativo.

5. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides*, para uso em um método de tratamento da lesão cerebral.

6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracteri-

zada pelo fato de que a lesão cerebral é acidente vascular cerebral, tal como isquemia cerebral, isquemia cerebral focal, acidente vascular cerebral isquêmico ou acidente vascular cerebral hemorrágico.

7. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana é de *Parabacteroides distasonis*.

8. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana possui uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à sequência de rRNA 16s de uma cepa bacteriana de *Parabacteroides distasonis*.

9. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana possui uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8 ou 9.

10. Composição para uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana possui uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 9, ou em que a cepa bacteriana possui a sequência de 16s rRNA representada pela SEQ ID NO: 9.

11. Composição para uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição compreende uma cepa bacteriana da espécie *Parabacteroides distasonis*, para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson.

12. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a composição é para administração oral.

13. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais excipientes ou veículos farmacêutica-

mente aceitáveis.

14. Composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana é liofilizada.

15. Produto alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende a composição como definida em qualquer uma das reivindicações precedentes, para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

16. Método para tratar ou prevenir um distúrbio neurodegenerativo selecionado do grupo que consiste em doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; doença de Alzheimer, incluindo a síndrome de Benson; doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência vascular e frontotemporal; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; comprometimento cognitivo relacionado ao HIV e degeneração corticobasal, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma composição compreendendo uma cepa bacteriana do gênero *Parabacteroides* a um paciente com sua necessidade.

17. Célula da cepa *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382, para uso no tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo, caracterizada pelo fato de que a célula é para uso em um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

18. Célula de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o distúrbio neurodegenerativo é a doença de Parkinson.

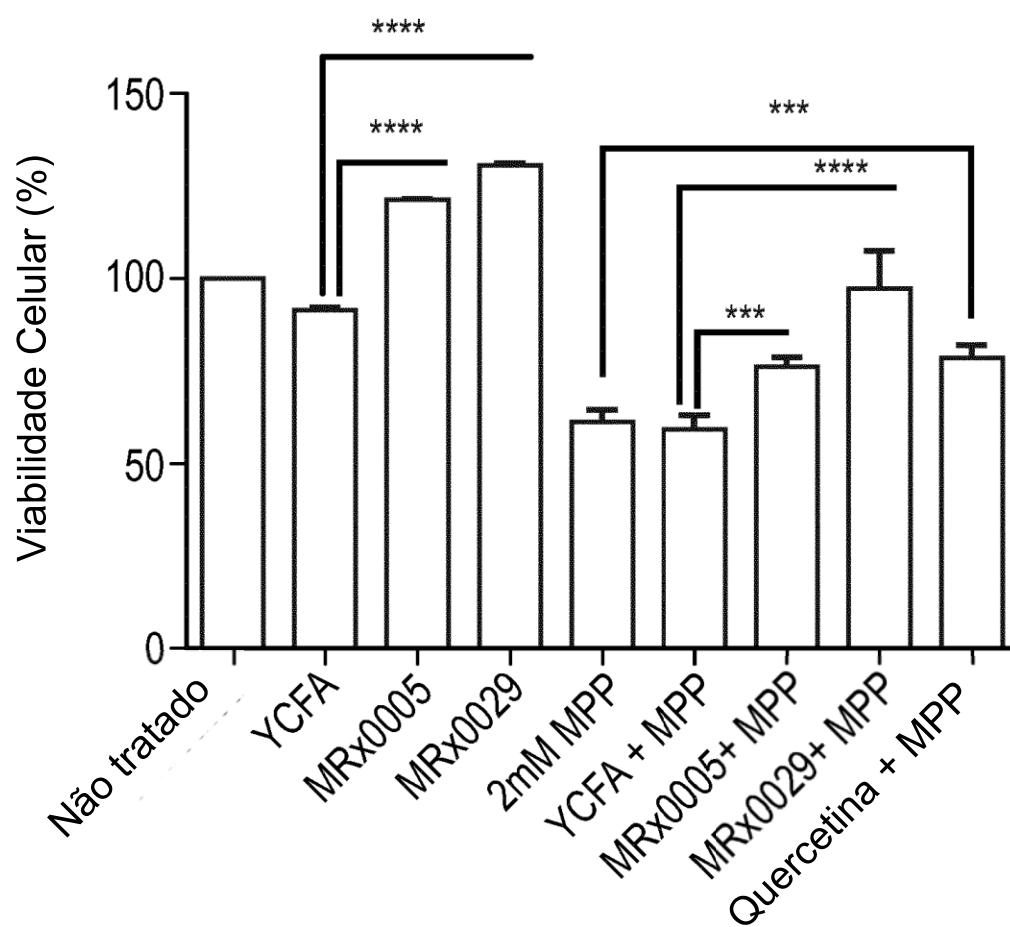
FIG. 1 Proteção contra neurotoxicidade

FIG. 2A Inibição de secreção de IL-6 induzida por LPS nas células MG U373

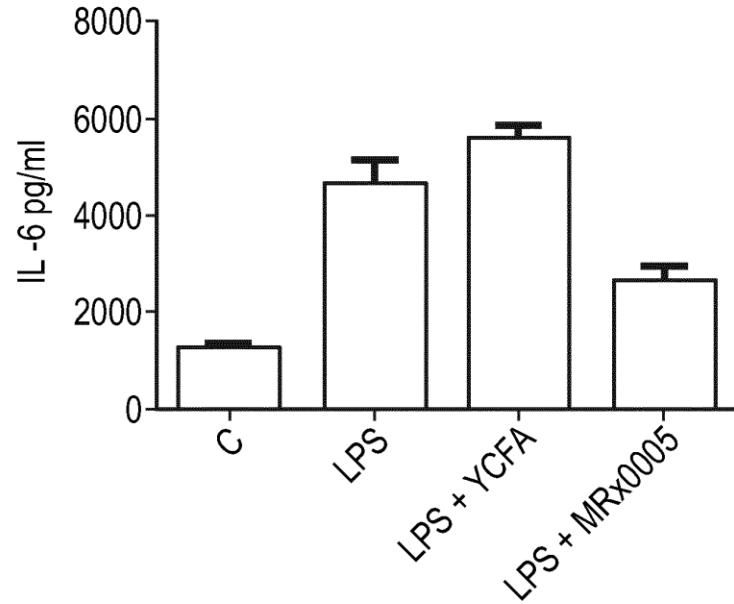


FIG. 2B Secreção de IL-8 de U373

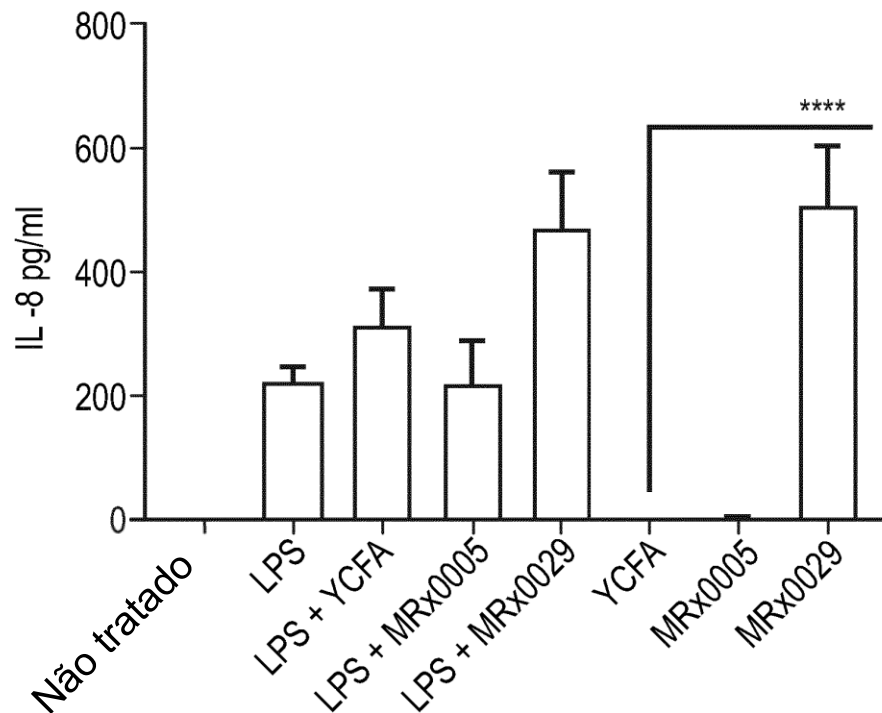


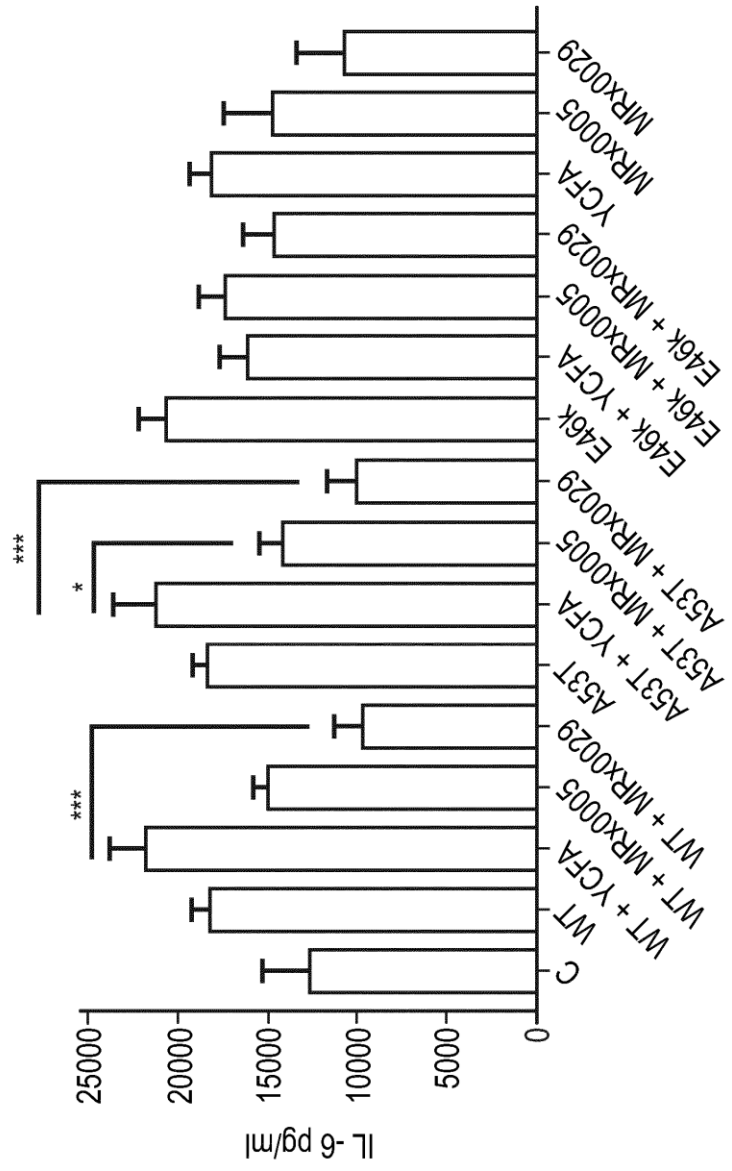
FIG. 3A Secreção de IL-6 de U373

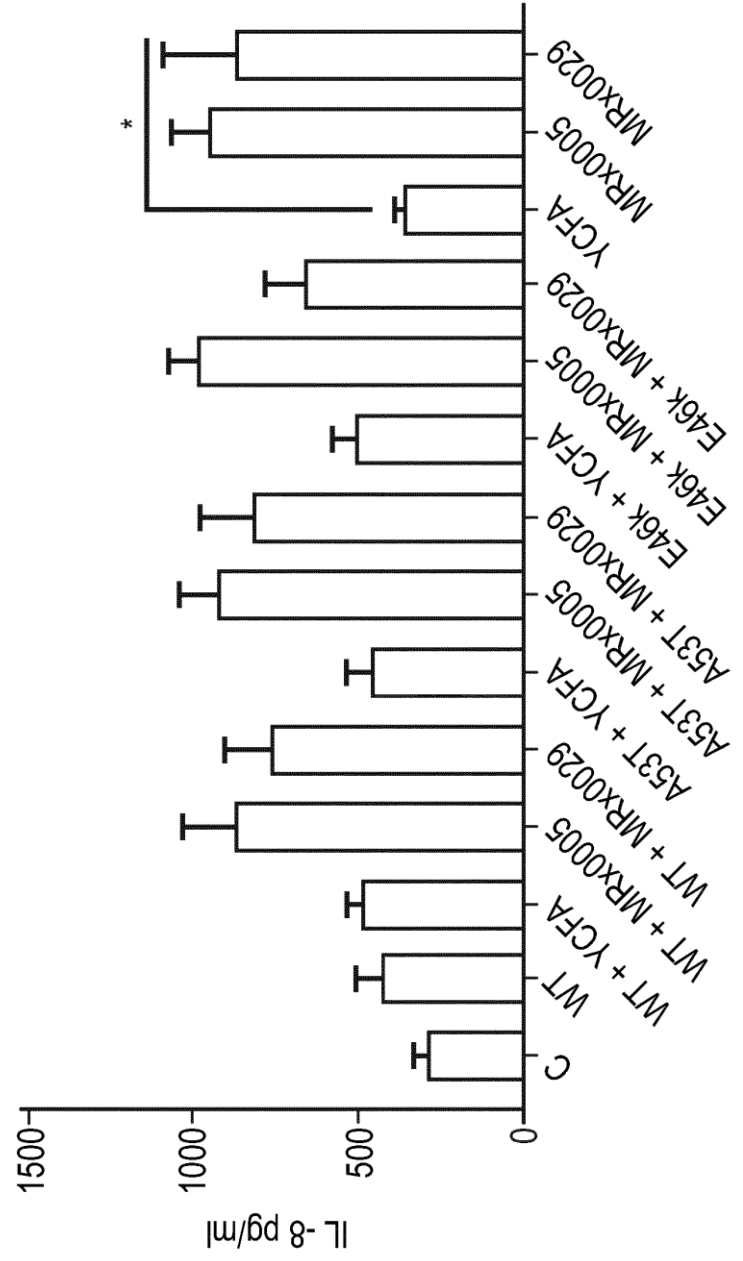
FIG. 3B Secreção de IL-8 de U373

FIG. 4 Inibição de ativação NFkB-AP1 induzida por α -sinucleína em HEK-TLR4

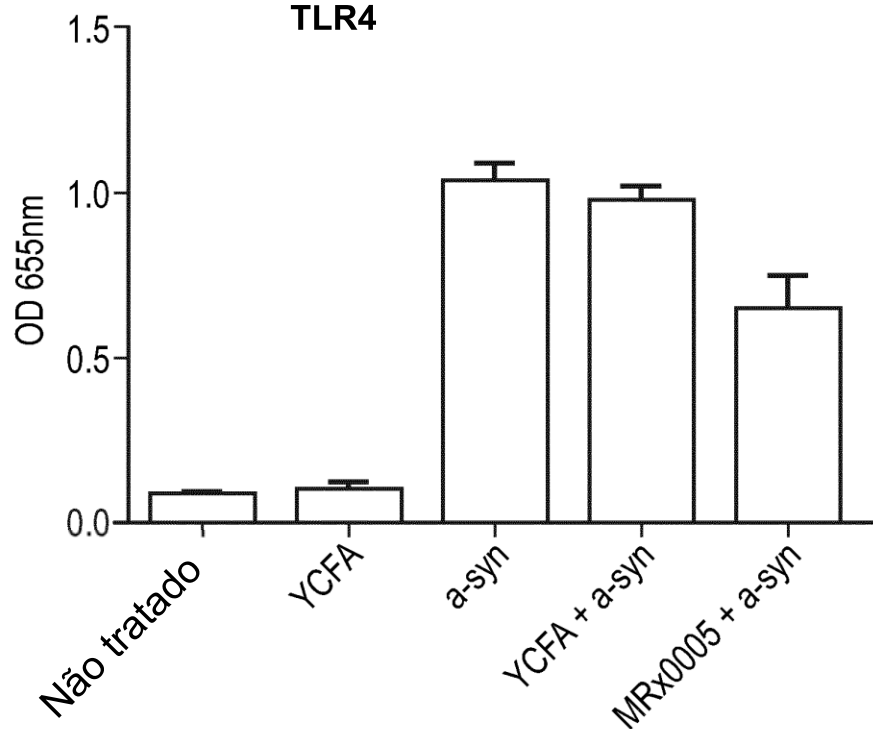


FIG. 5 Inibição de ativação NFkB-AP1 induzida por LPS em HEK-TLR4

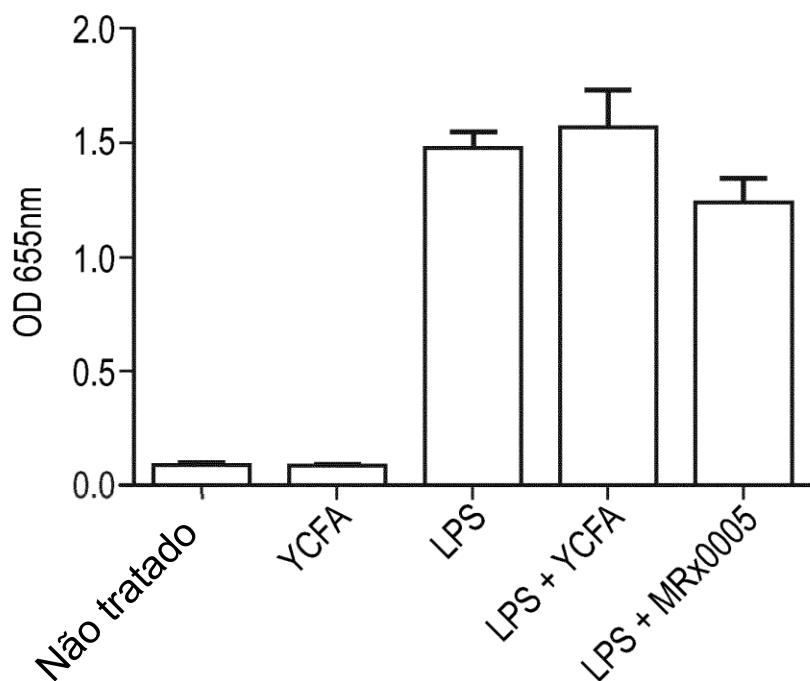


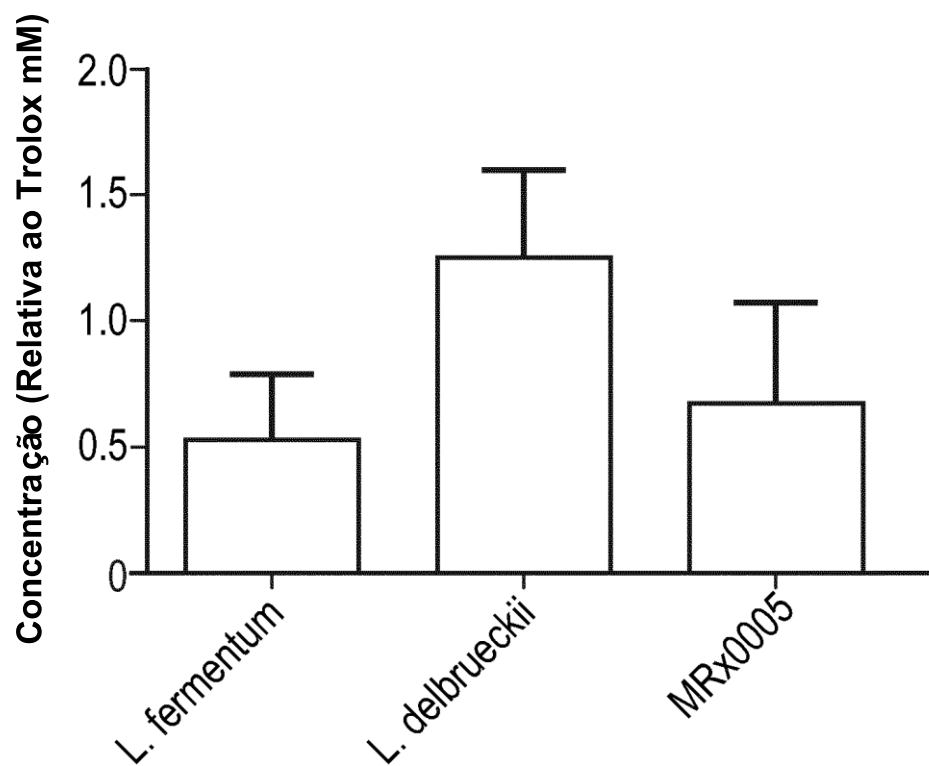
FIG. 6 Ensaio de capacidade antioxidante

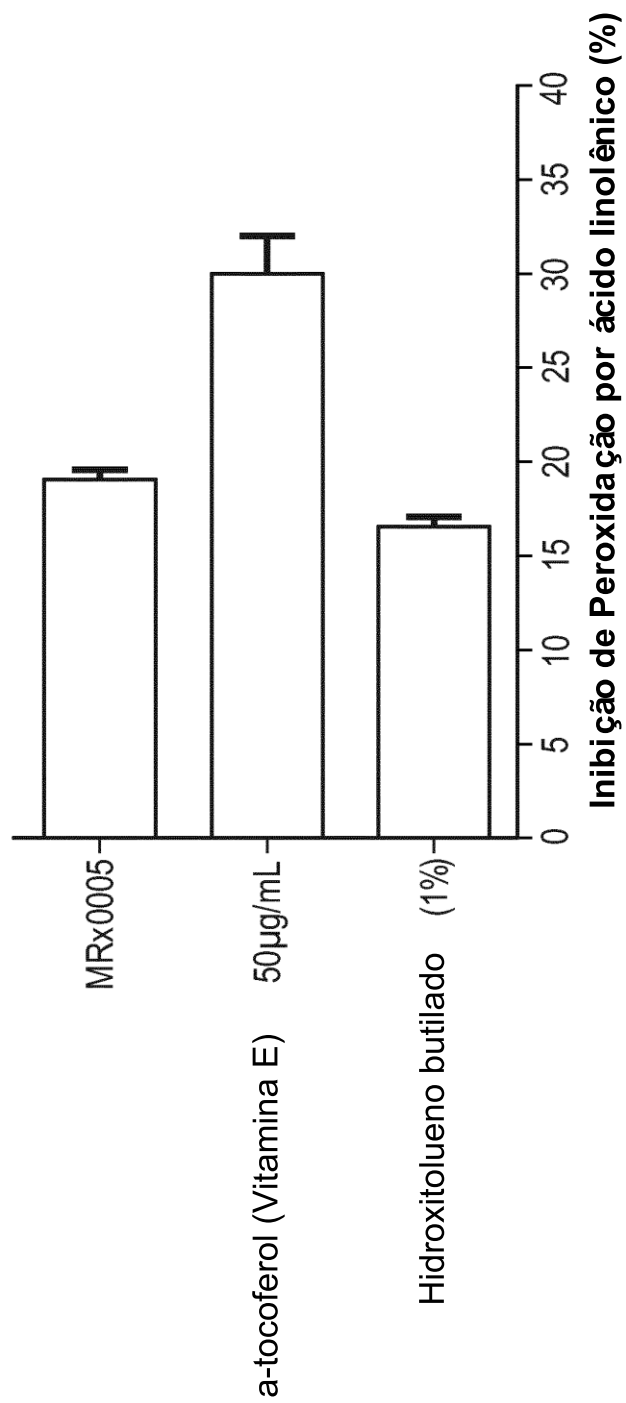
FIG. 7 Capacidade antioxidante total

FIG. 8 Ensaio de atividade HDCA

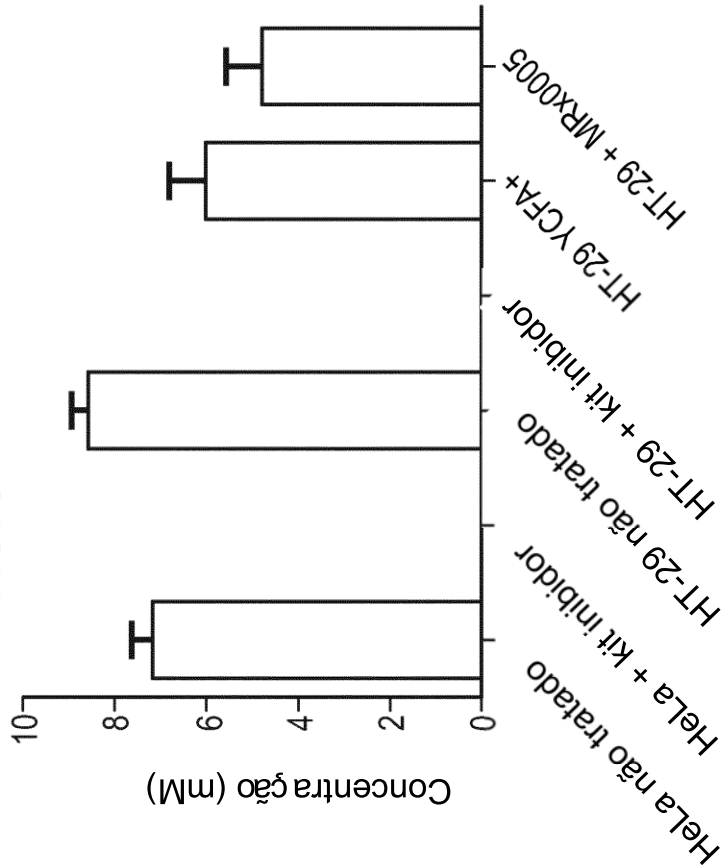


FIG. 9 Ensaio Indole

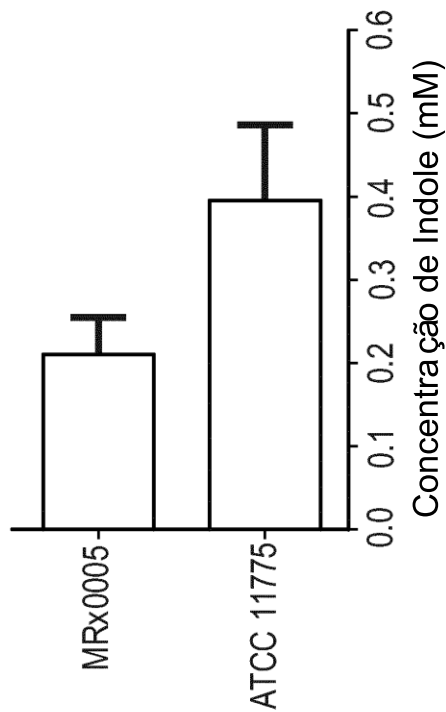


FIG. 10 Ensaio Quinurenina

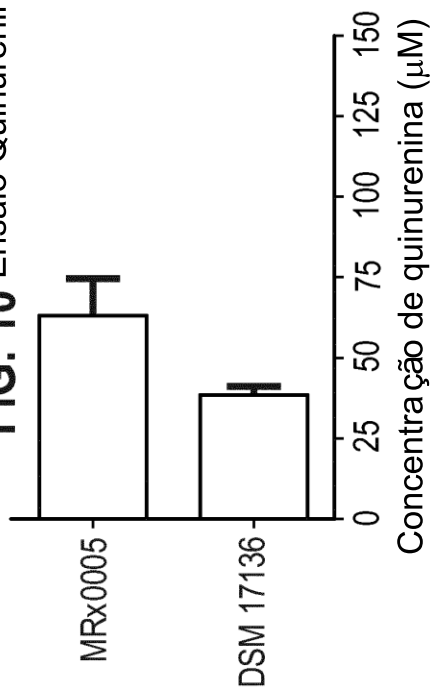


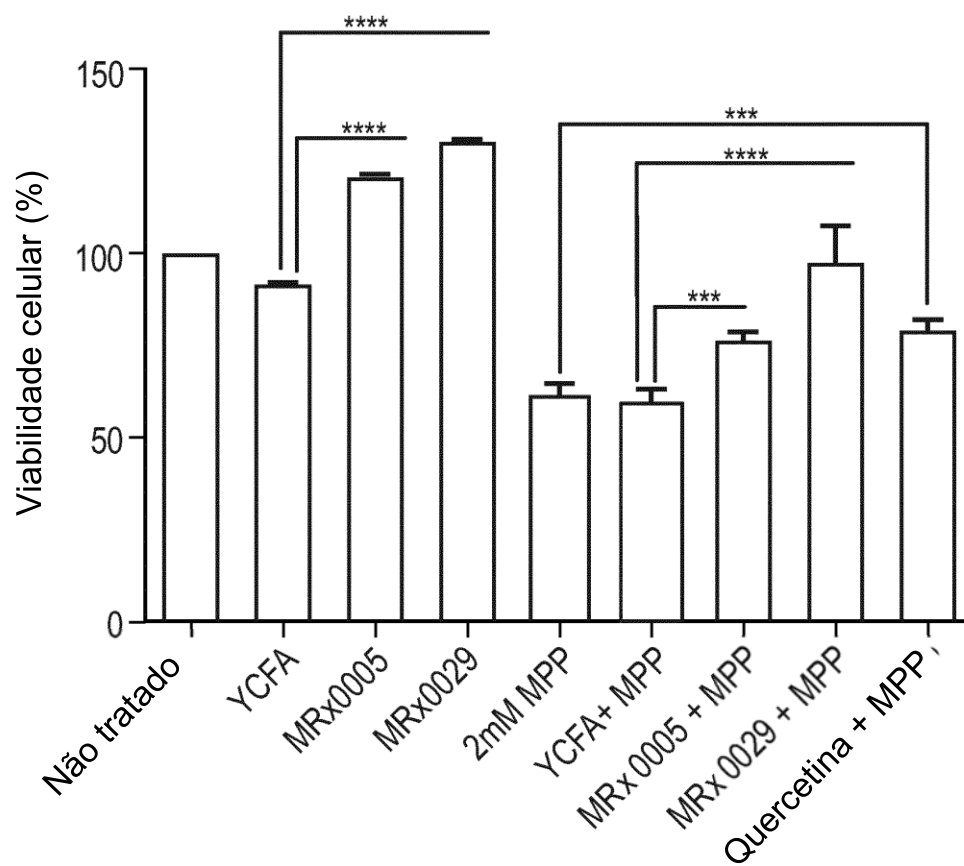
FIG. 11 Viabilidade celular por neuroproteção

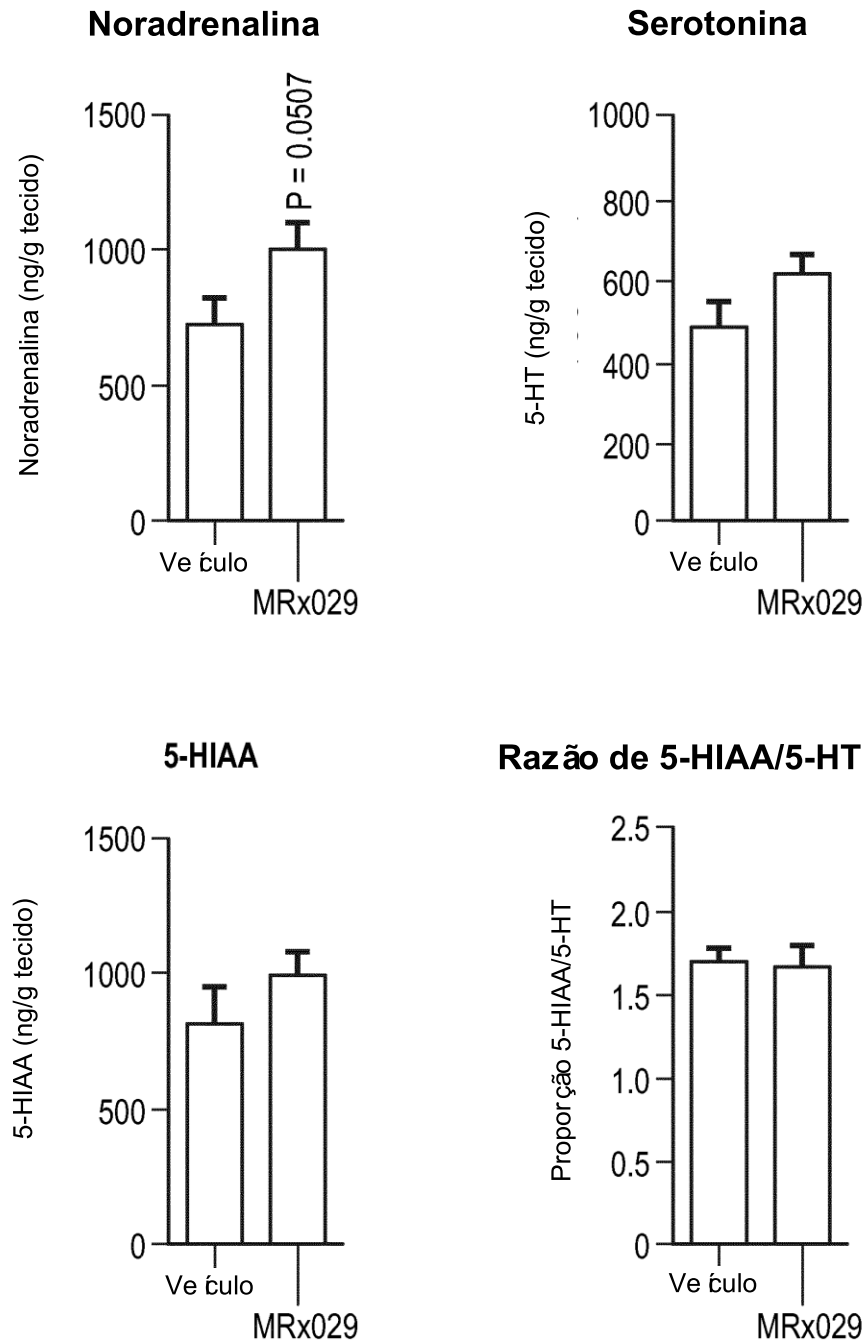
FIG. 12 Produção de neurotransmissores no cérebro

FIG. 13 | Metabólitos bacterianos no sobrenadante

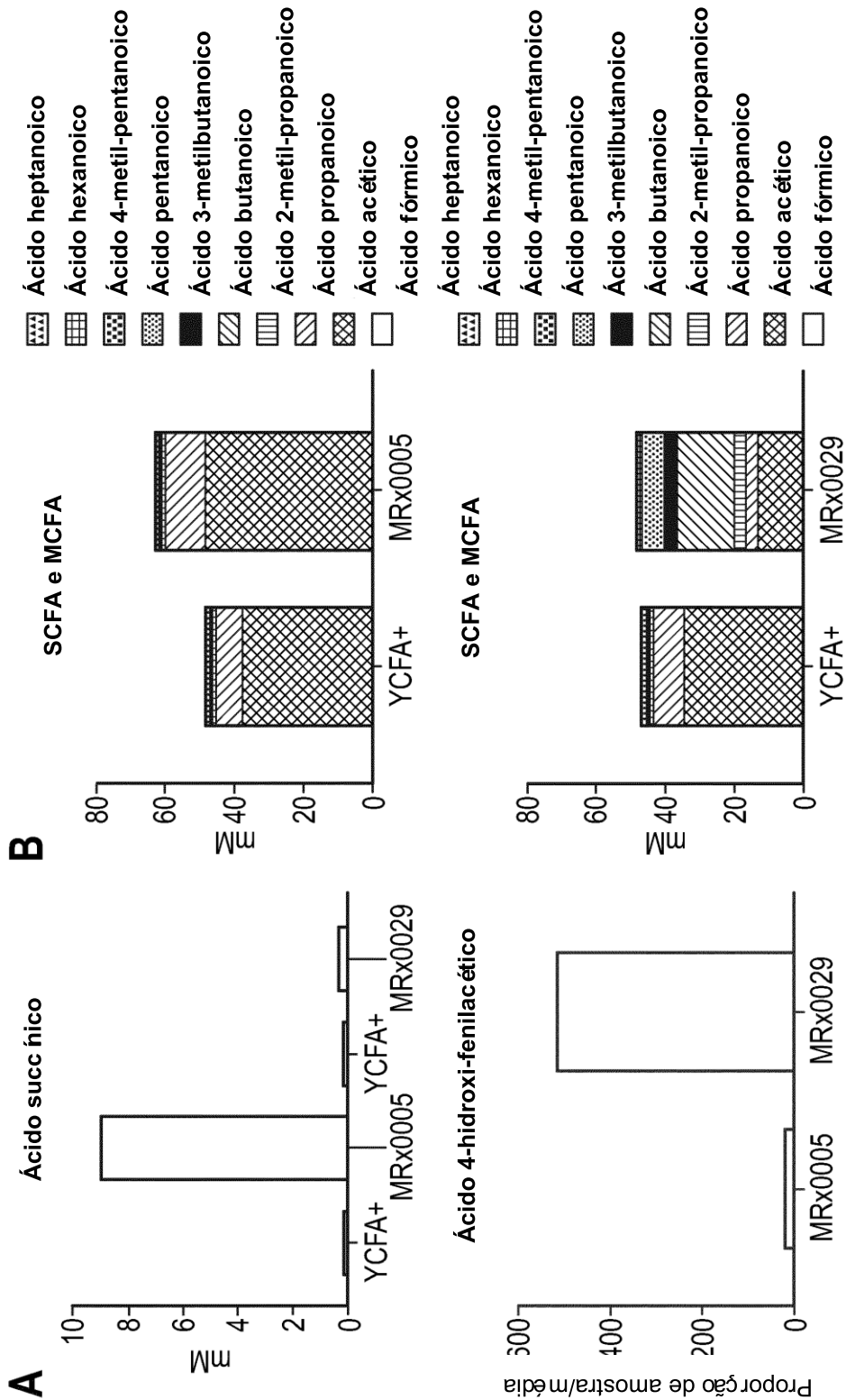
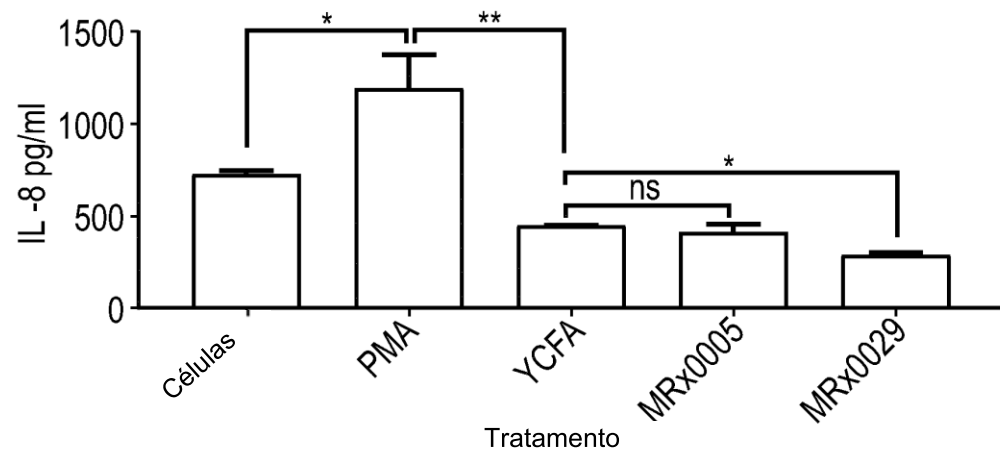


FIG. 14A

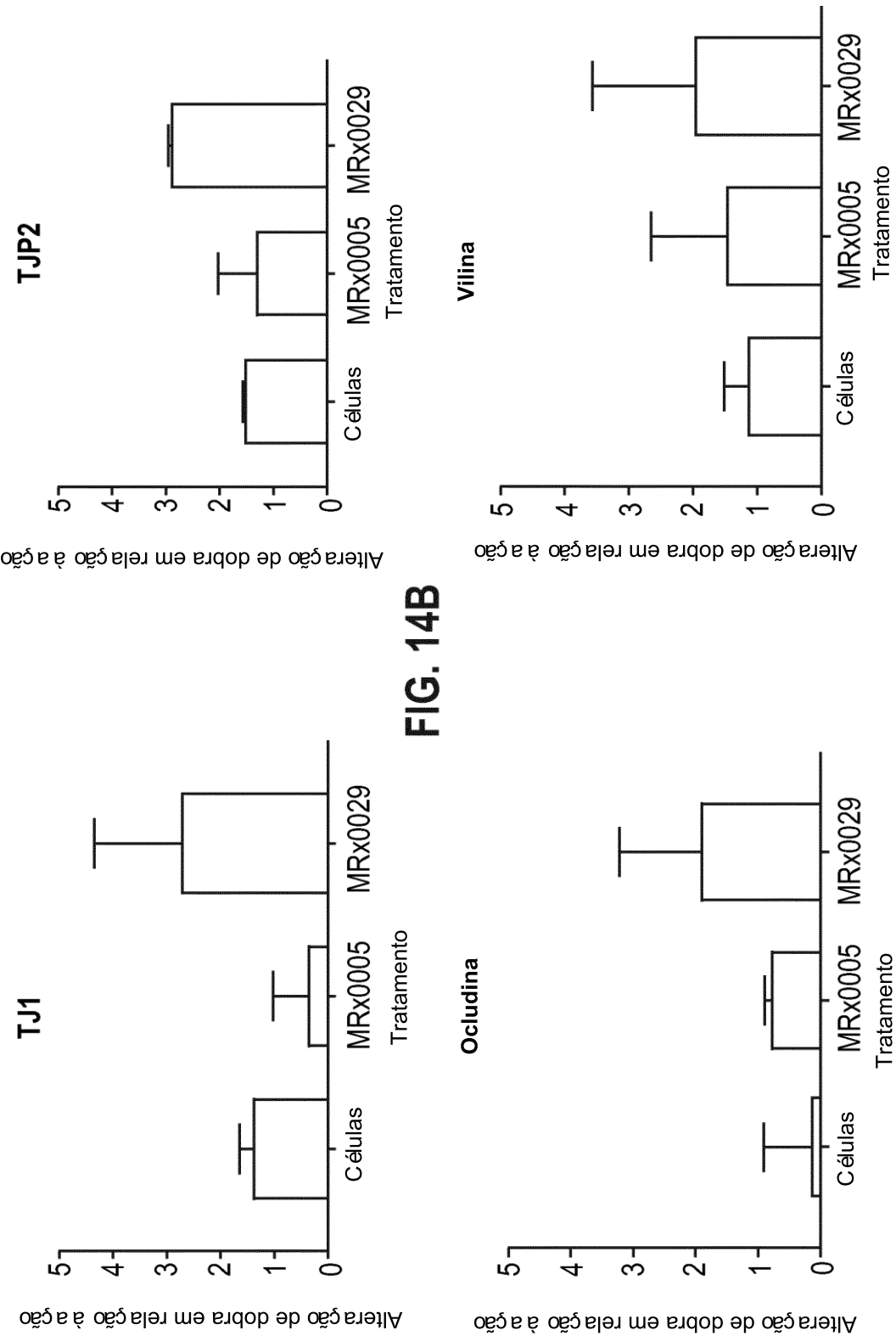


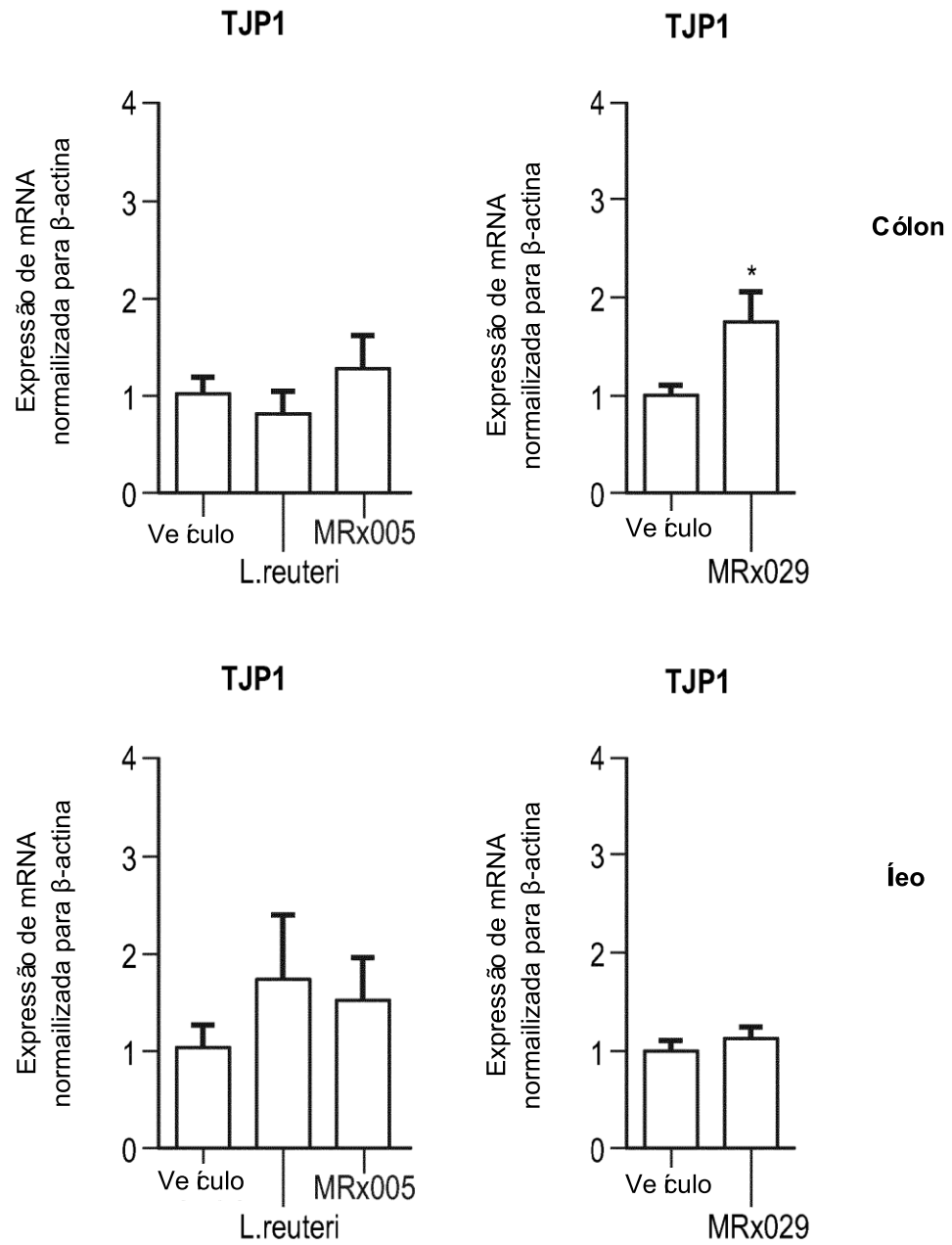
FIG. 14C

FIG. 14D

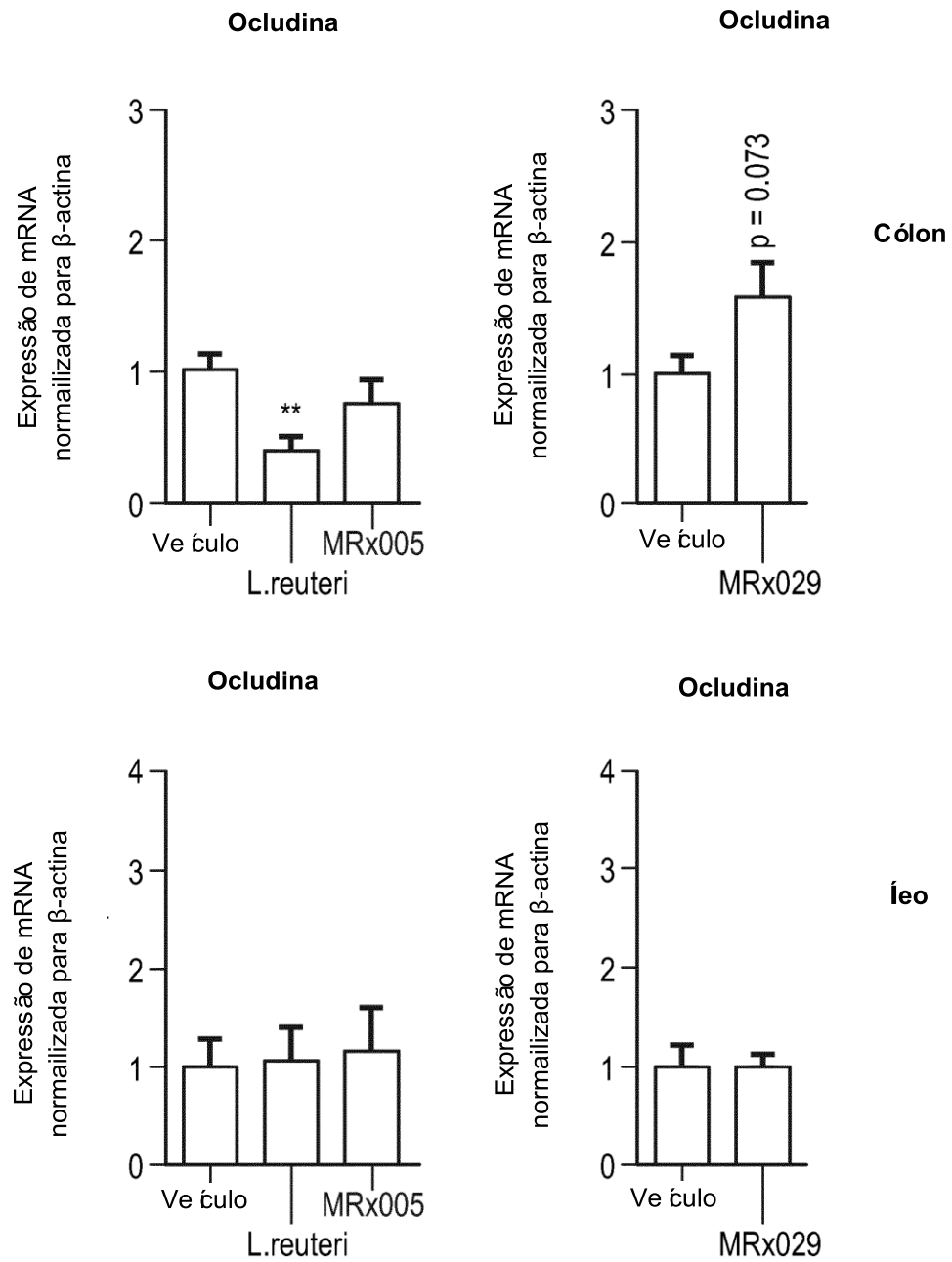


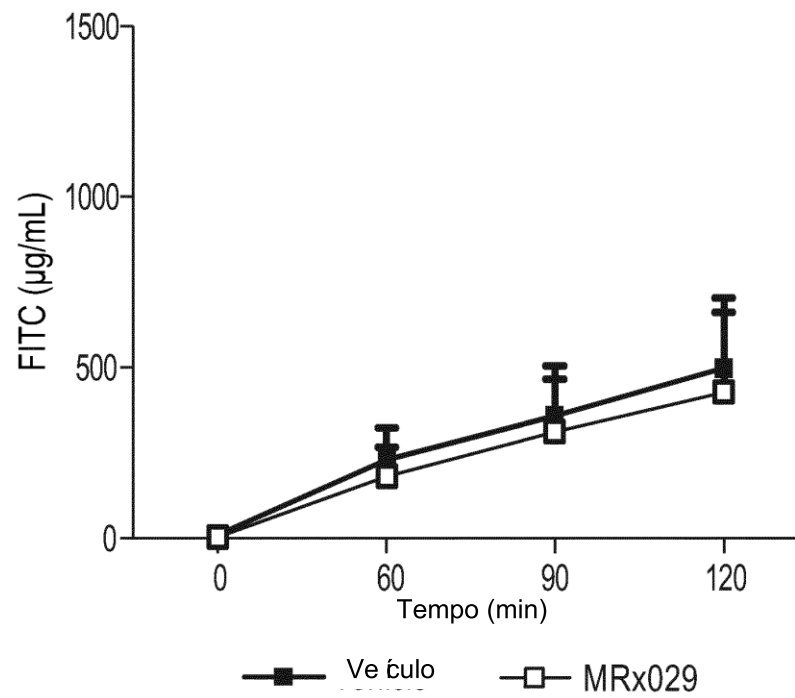
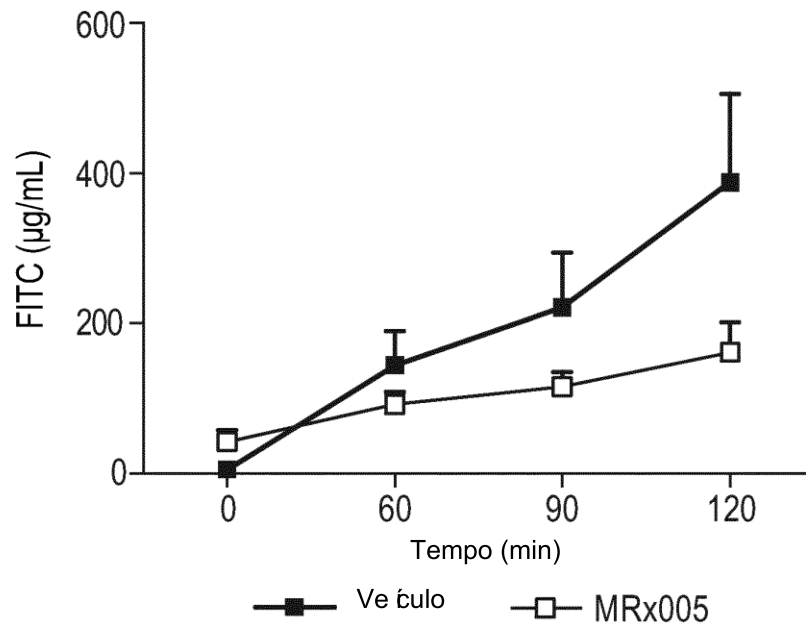
FIG. 14E Permeabilidade no íleo

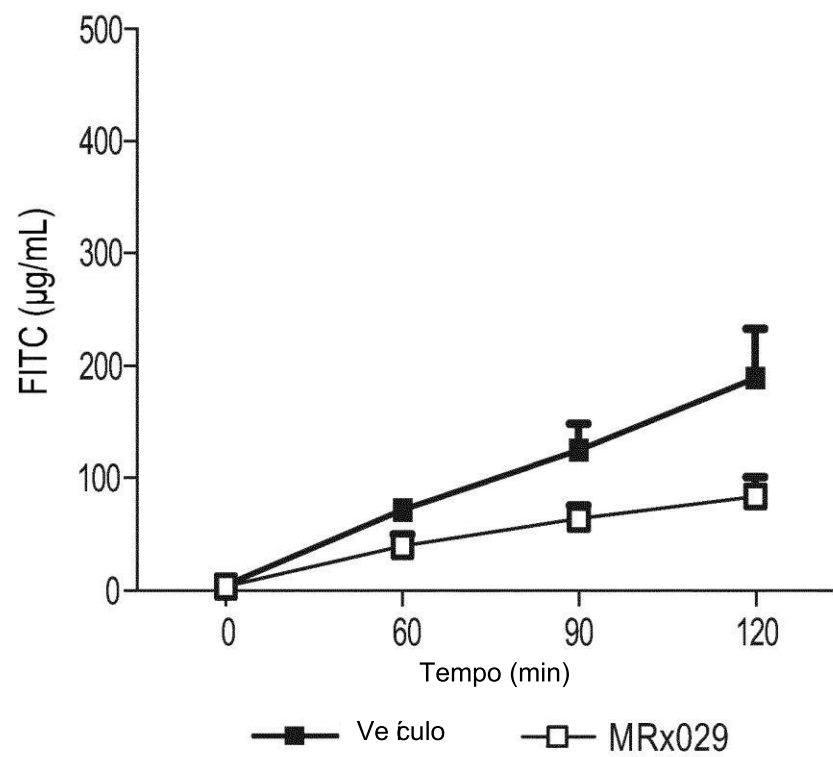
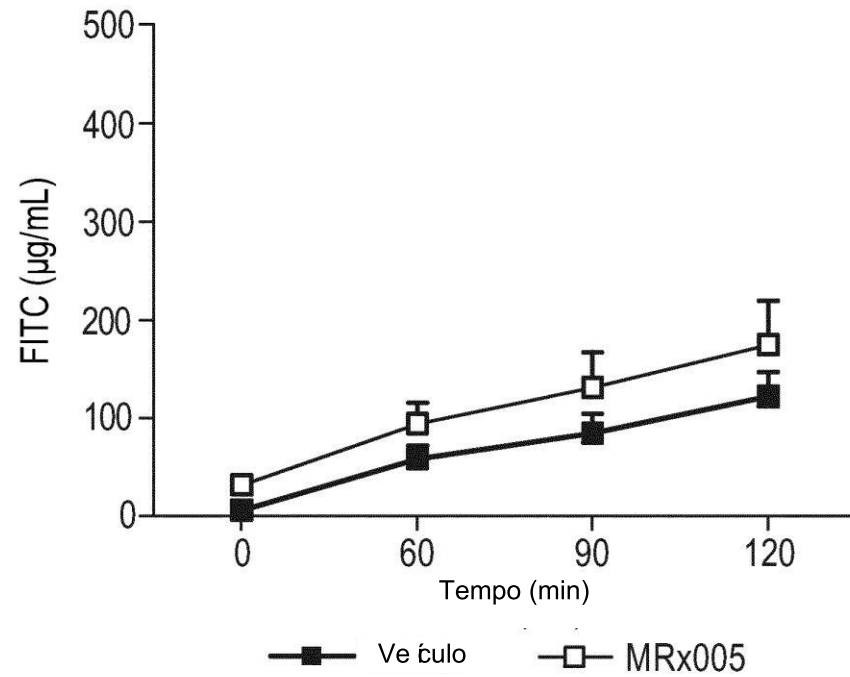
FIG. 14F Permeabilidade no Cólon

FIG. 15 Secreção de BDNF de SH-SY-5Y

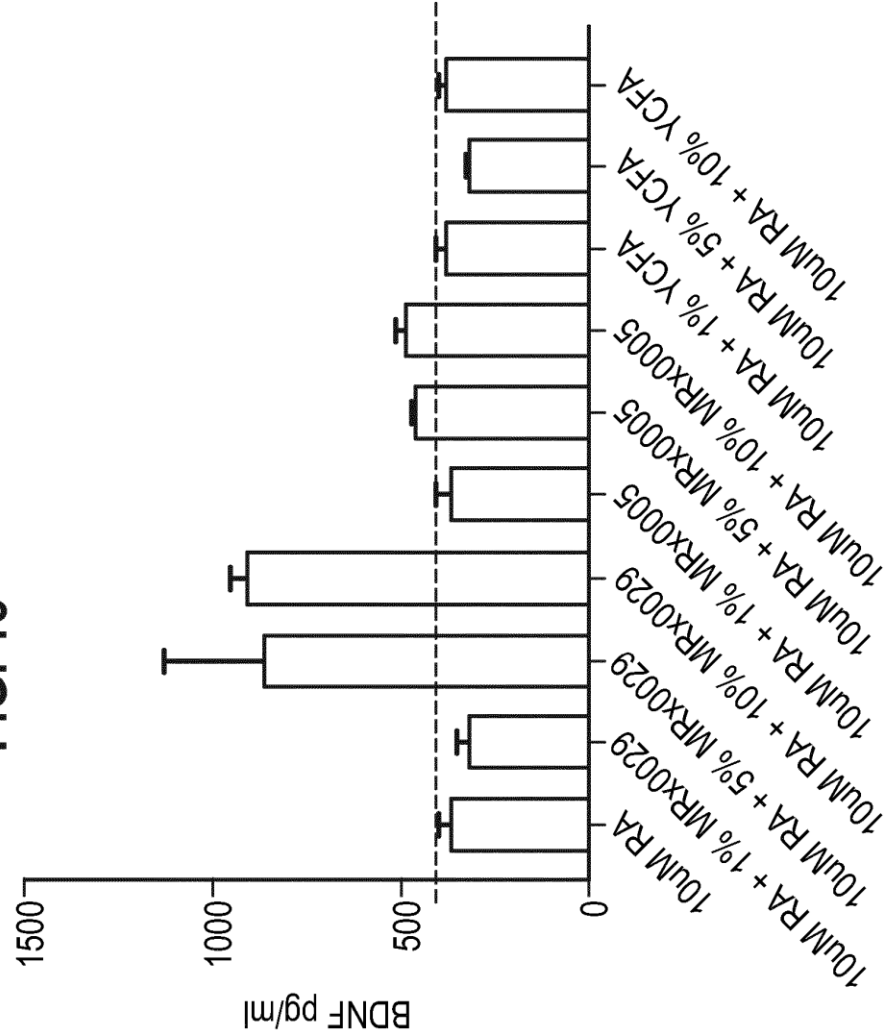
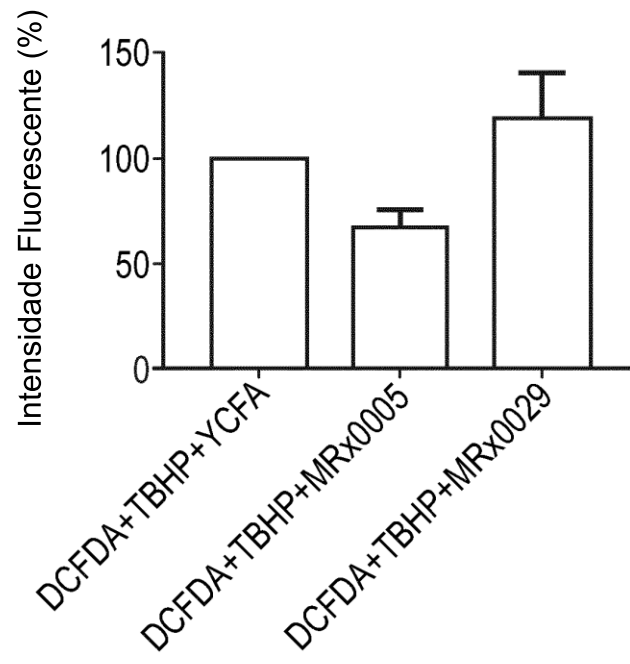
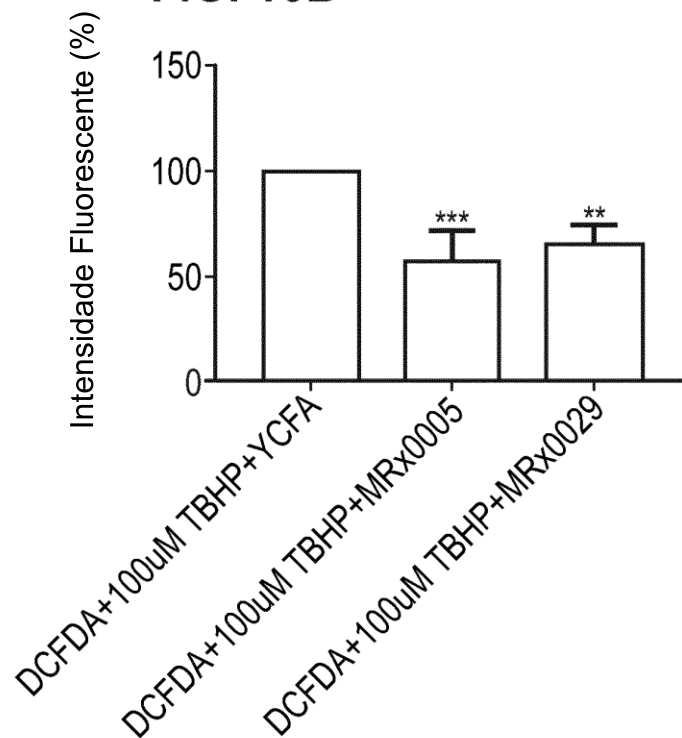
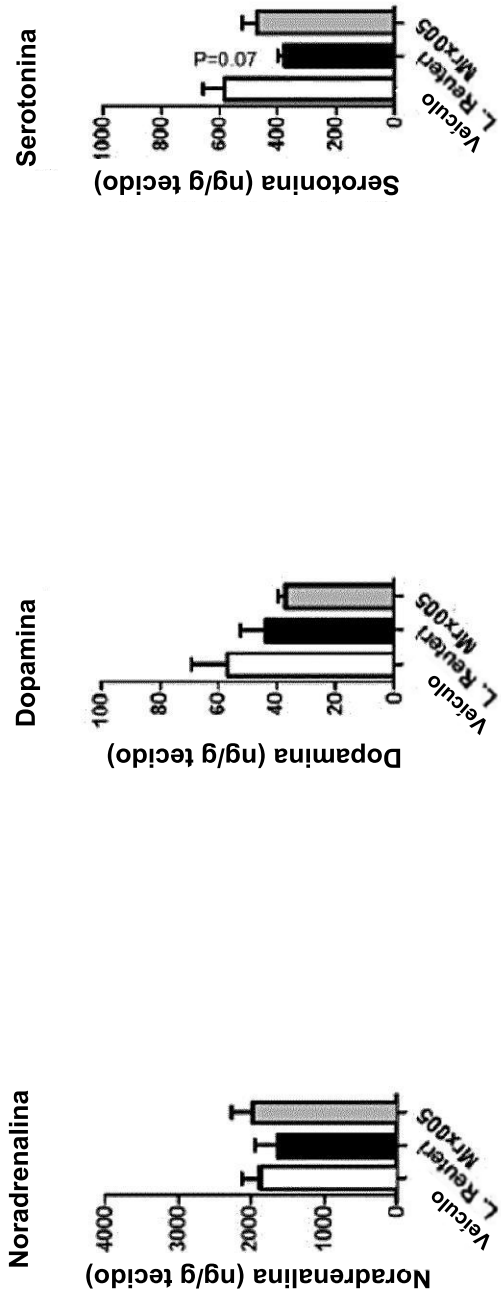
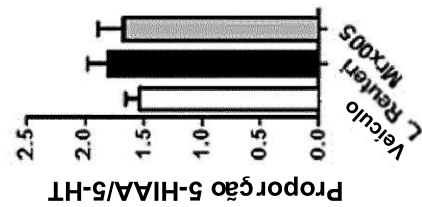


FIG. 16A Produção ROS total**FIG. 16B** Produção ROS total



Índice de metabolismo da serotonina 5-HIAA/5-HT



Ácido de 5-hidroxi-indole-acético (5-HIAA)

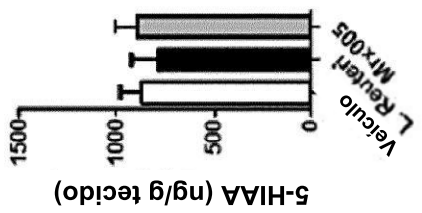
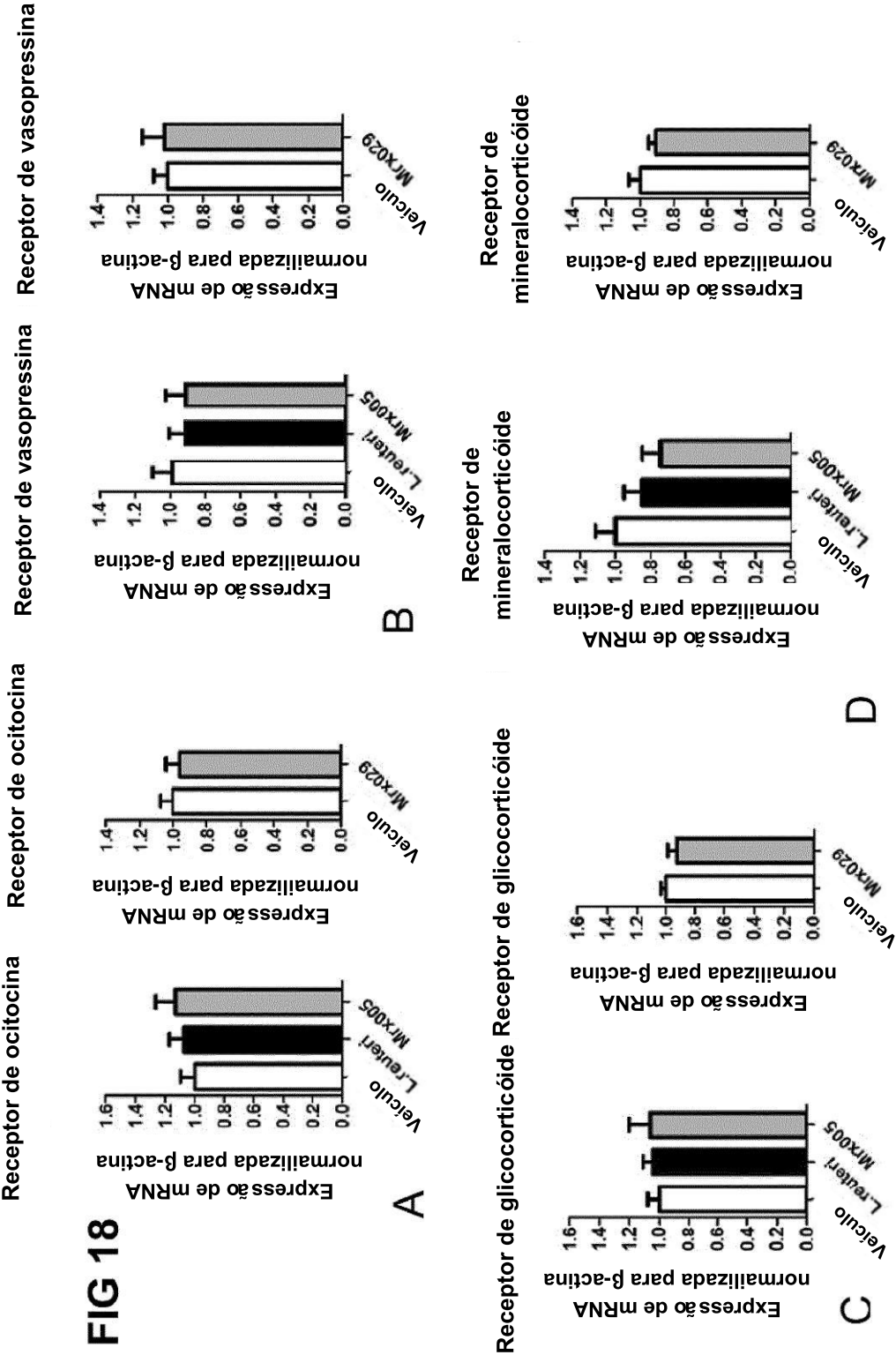


FIG 17



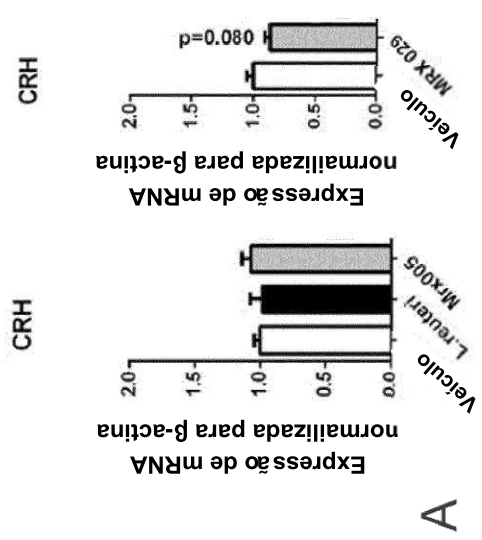
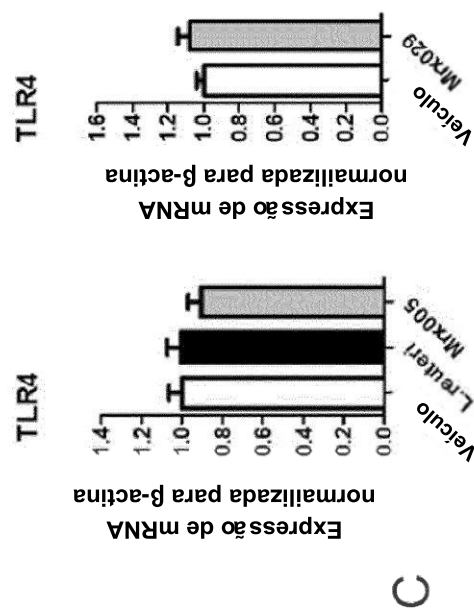
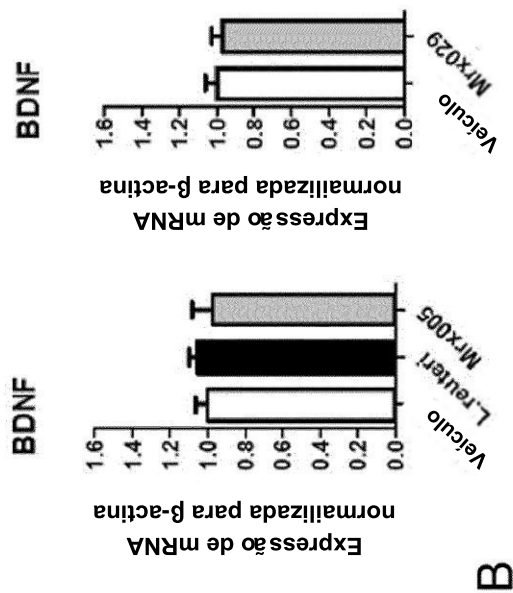


FIG 19

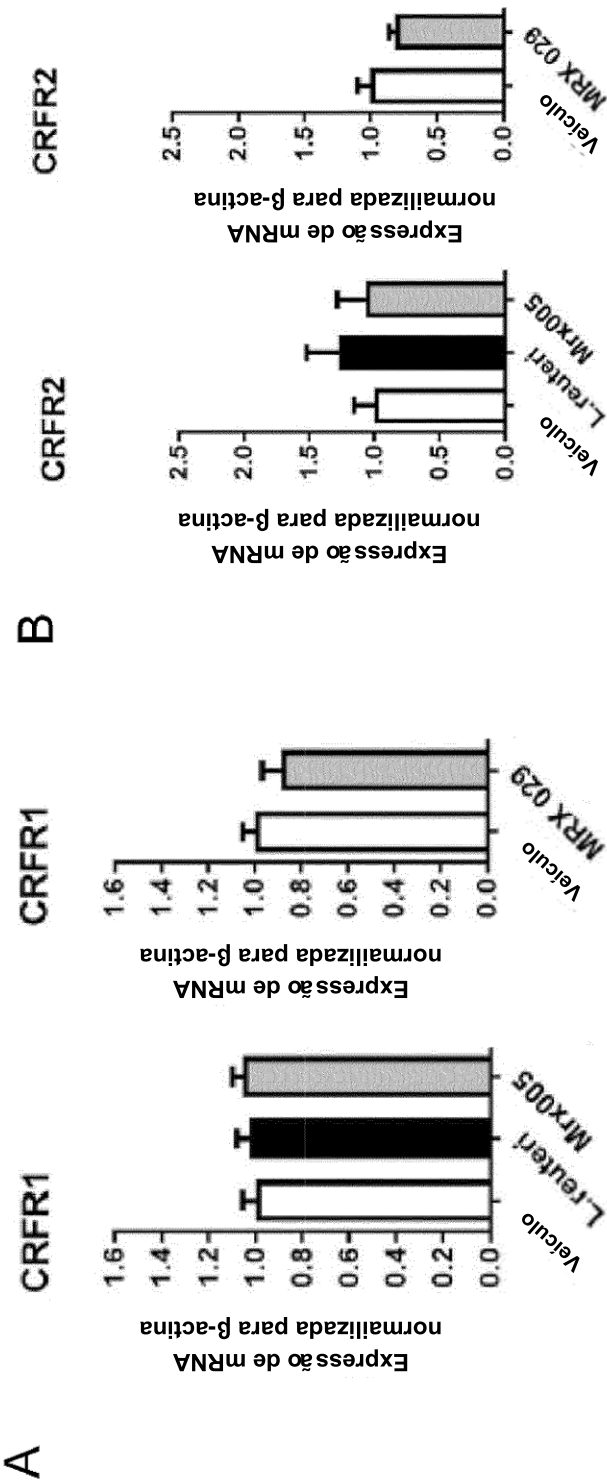
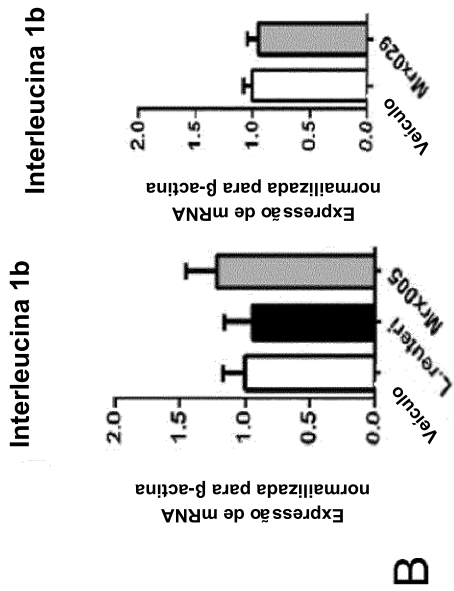
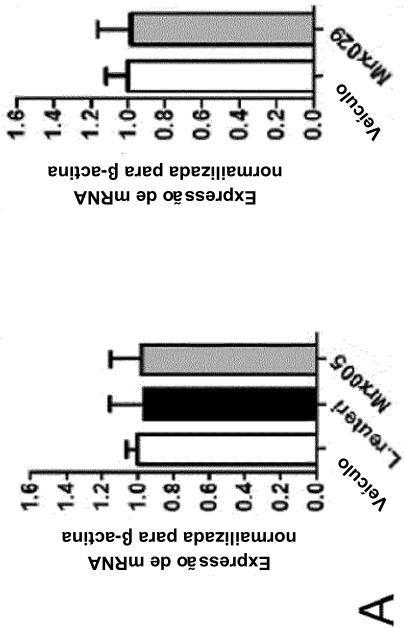
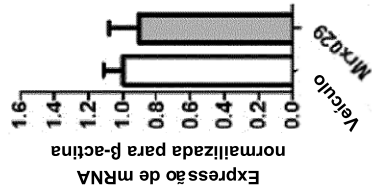


FIG 20

Fator de necrose tumoral- α Fator de necrose tumoral- α



Interleucina-6



Interleucina-6

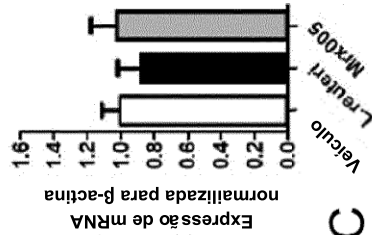
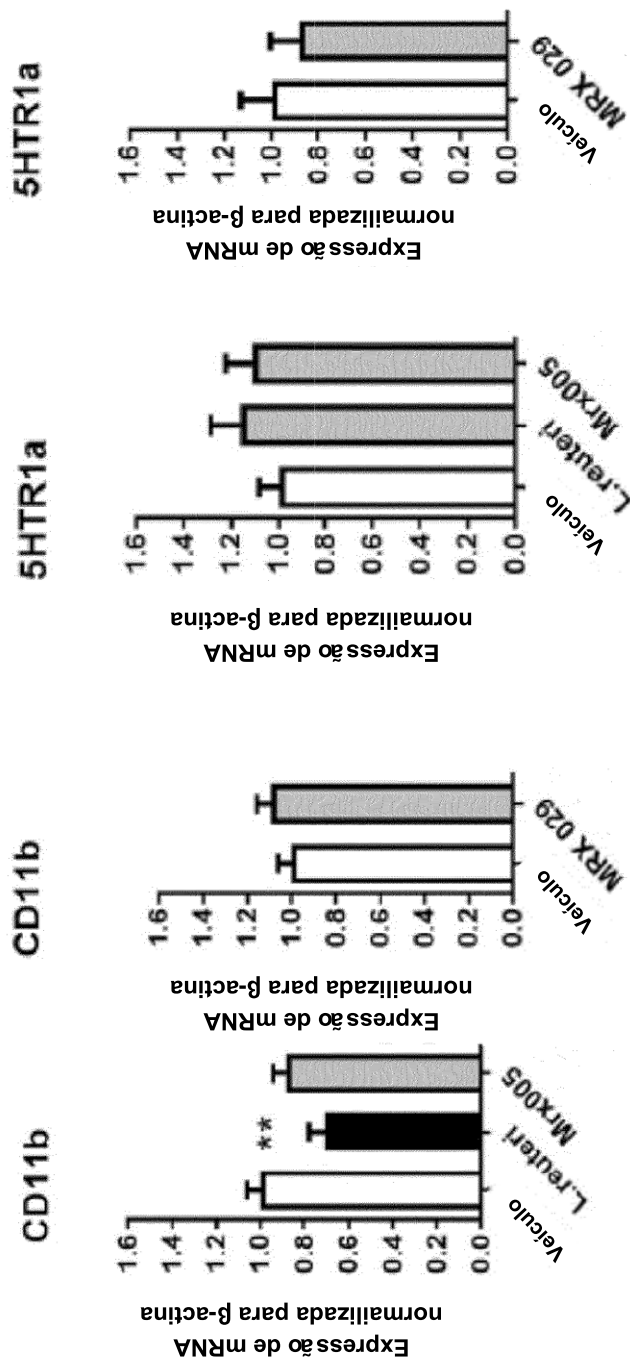


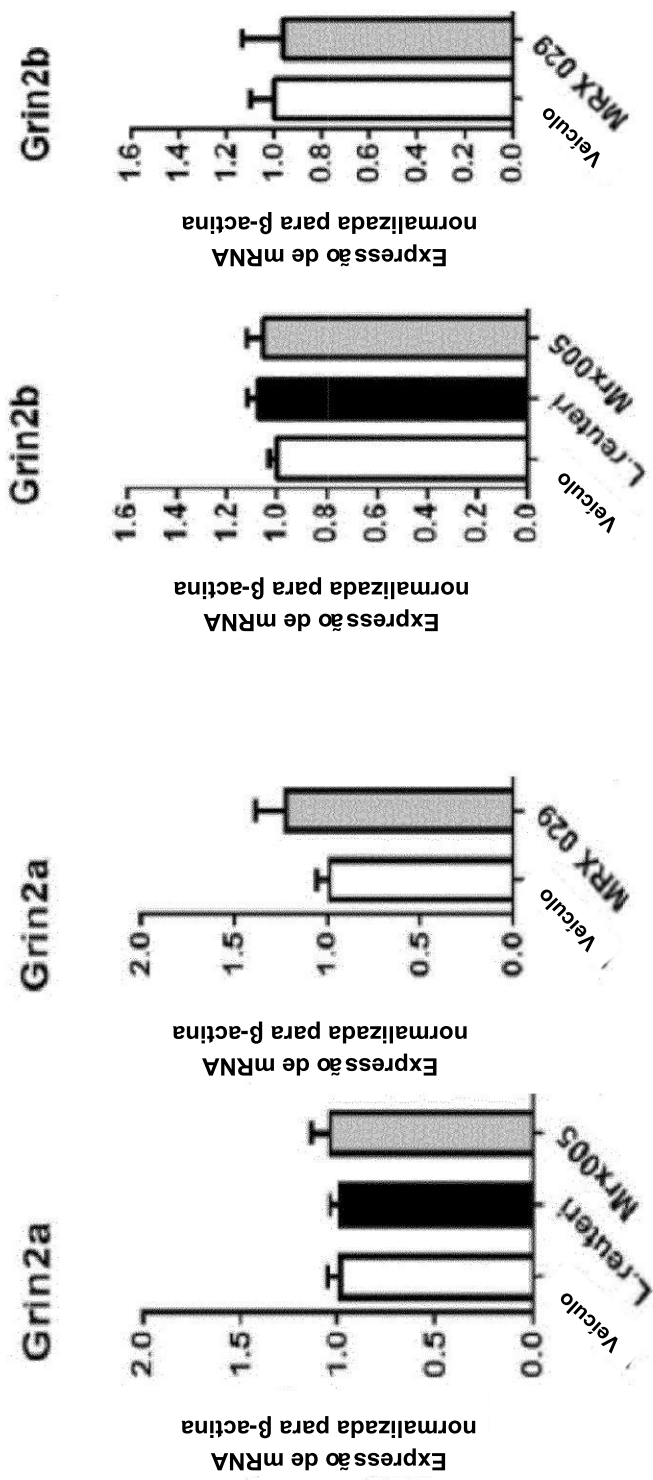
FIG 21



A

B

FIG 22



A

B

FIG 23

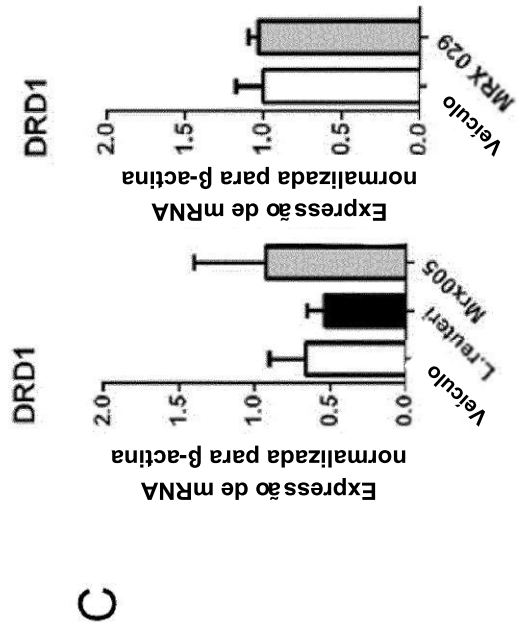
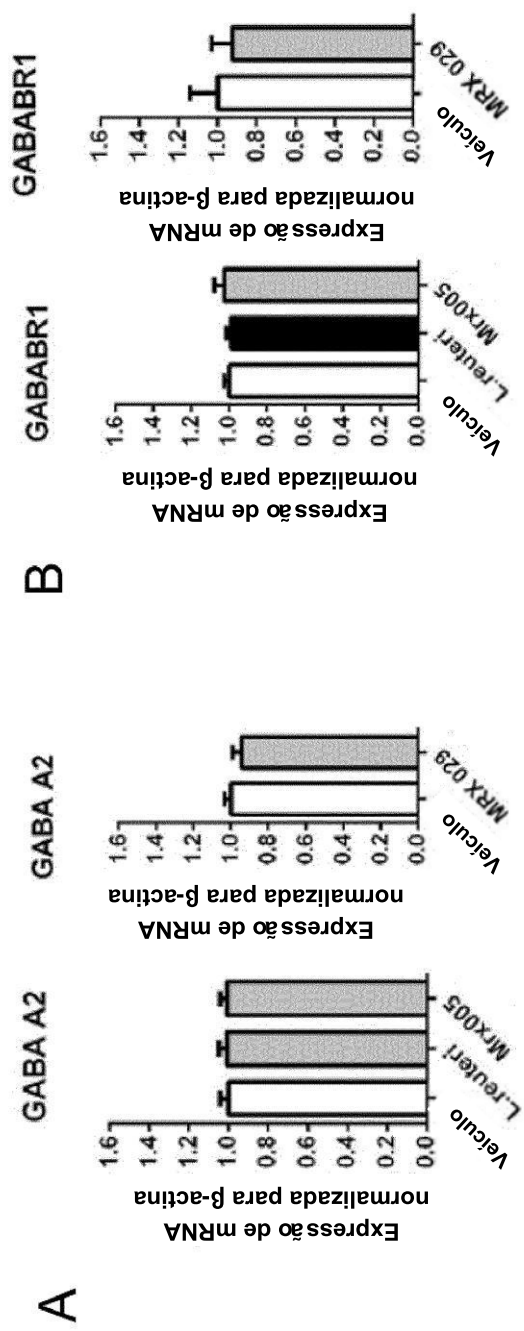


FIG 24

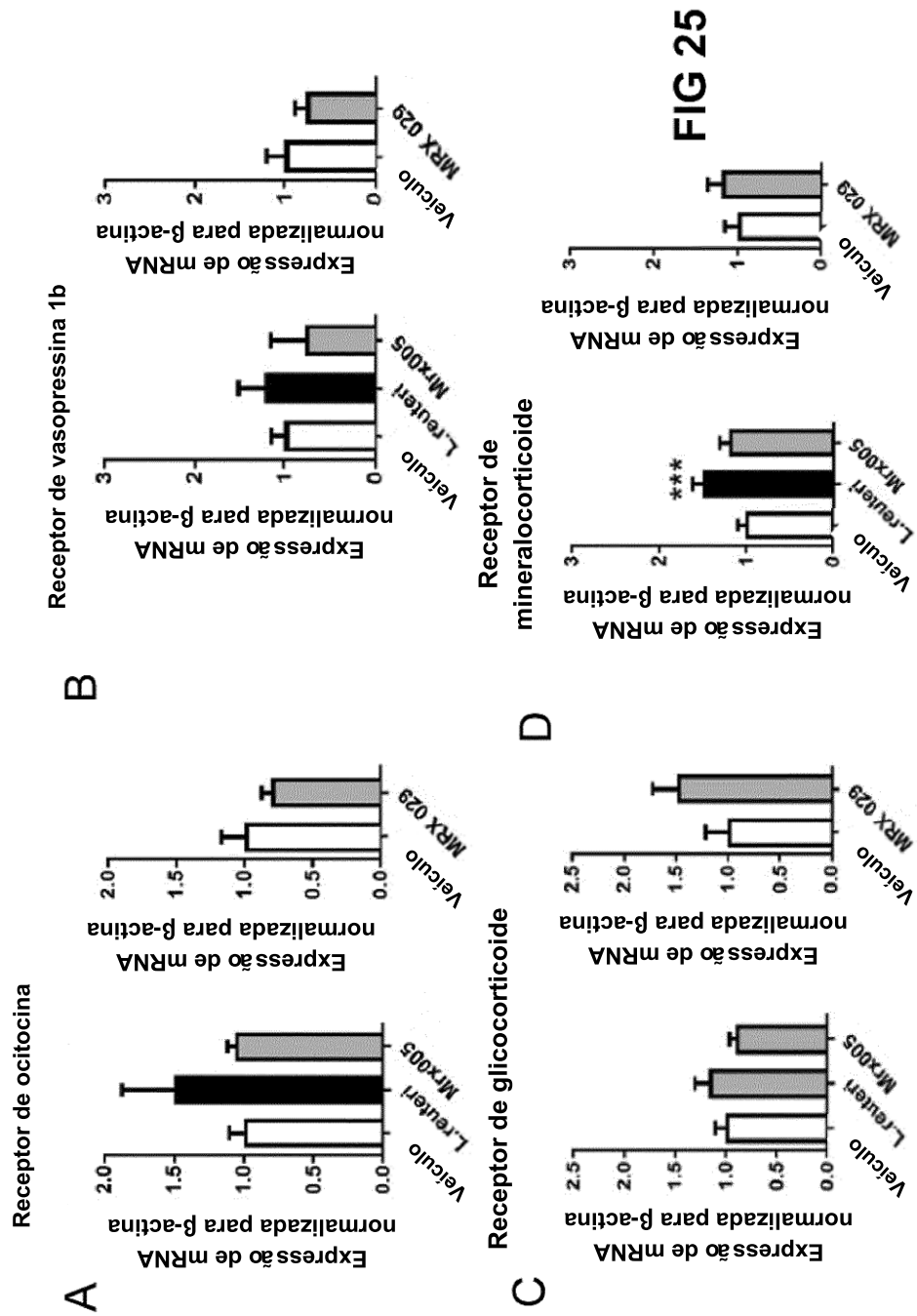


FIG 26

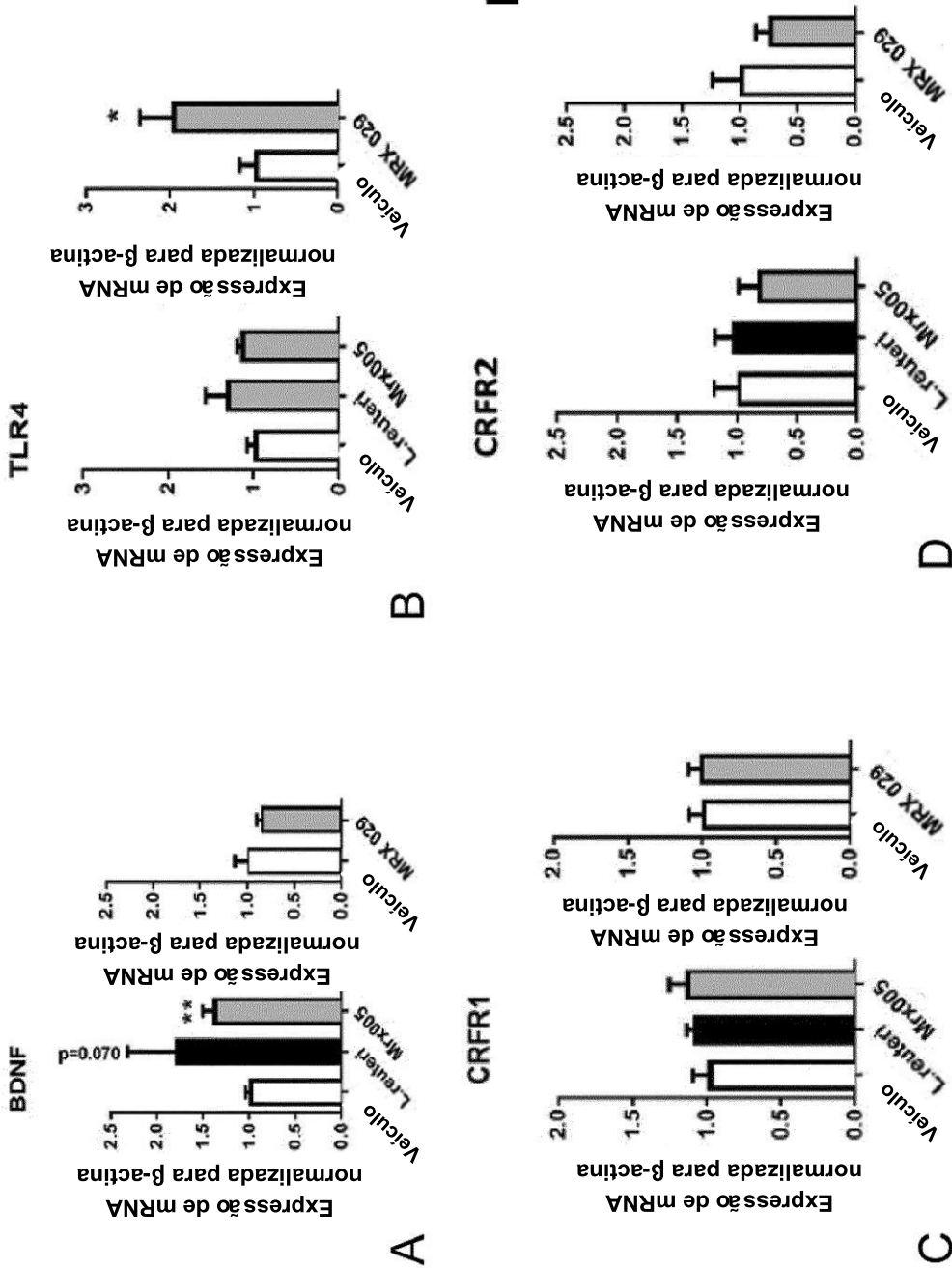


FIG 27

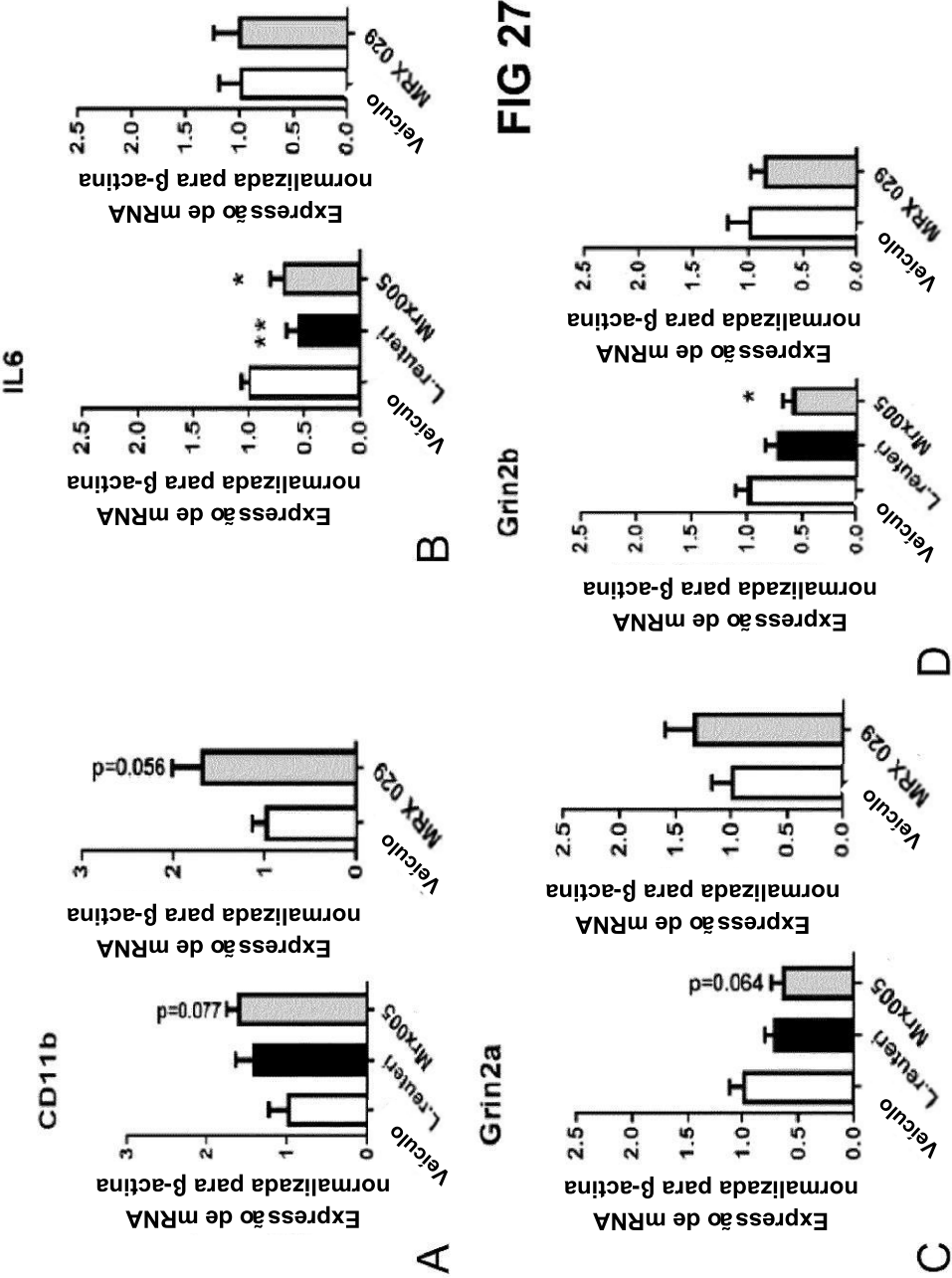
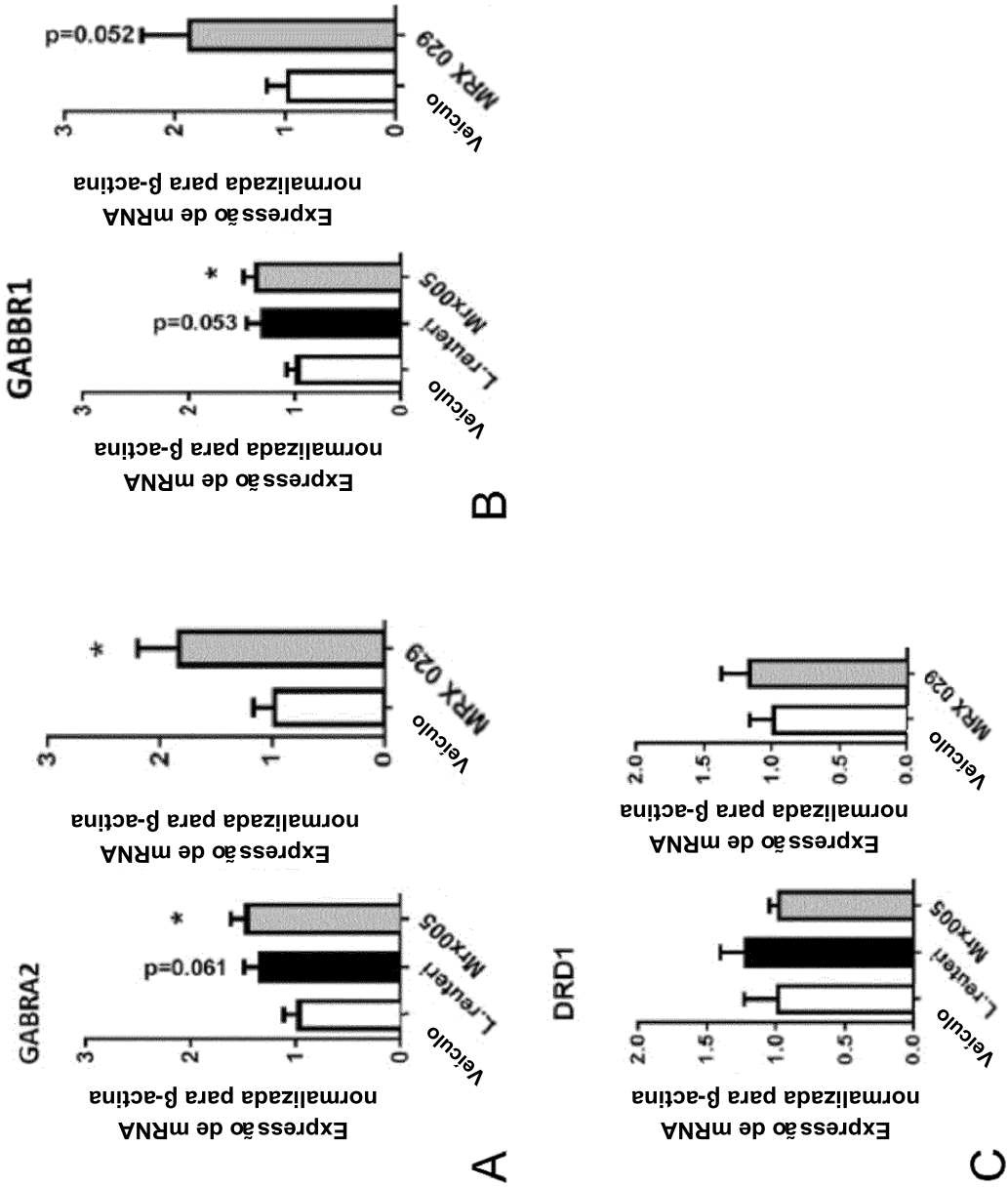
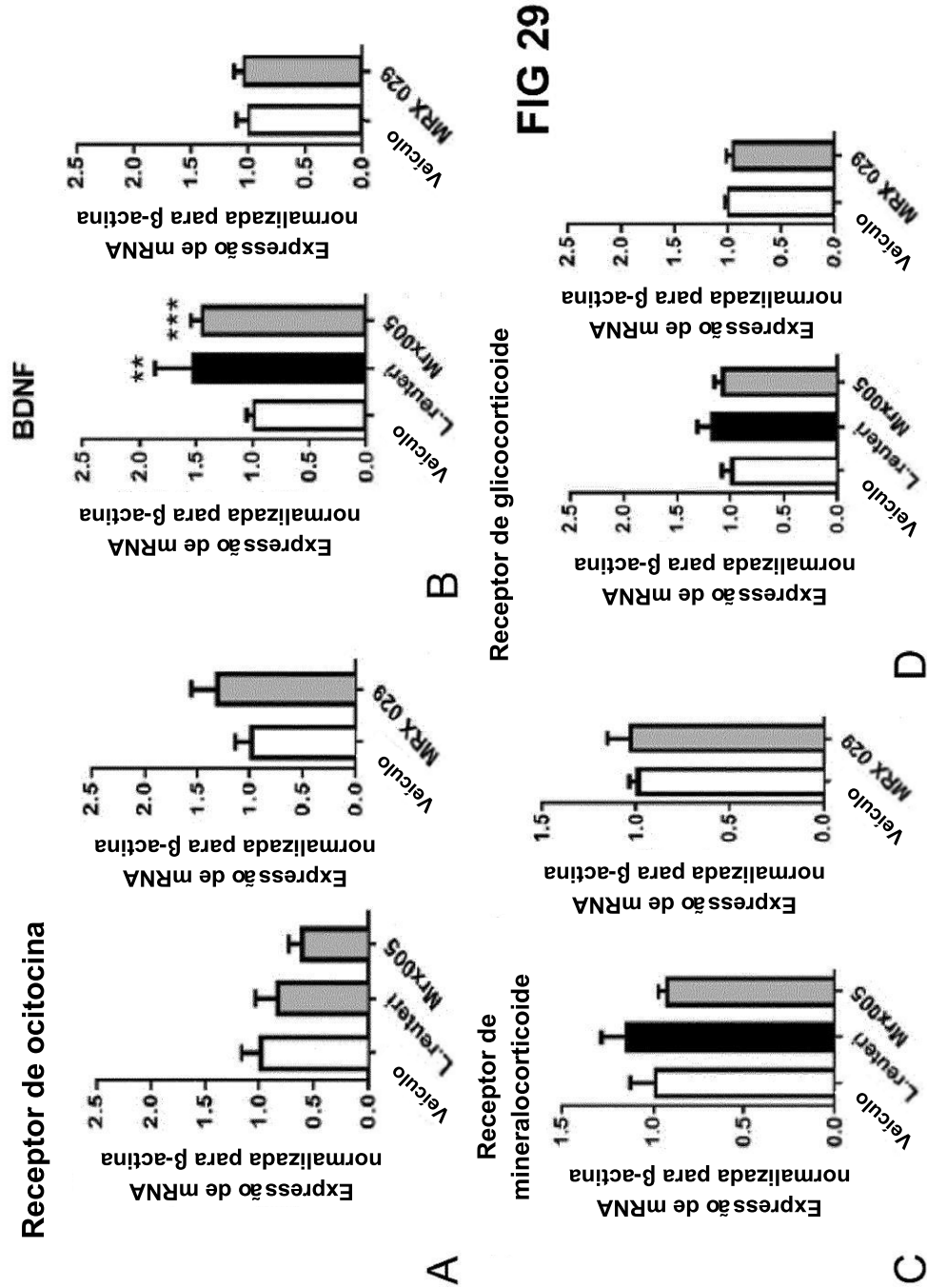


FIG 28





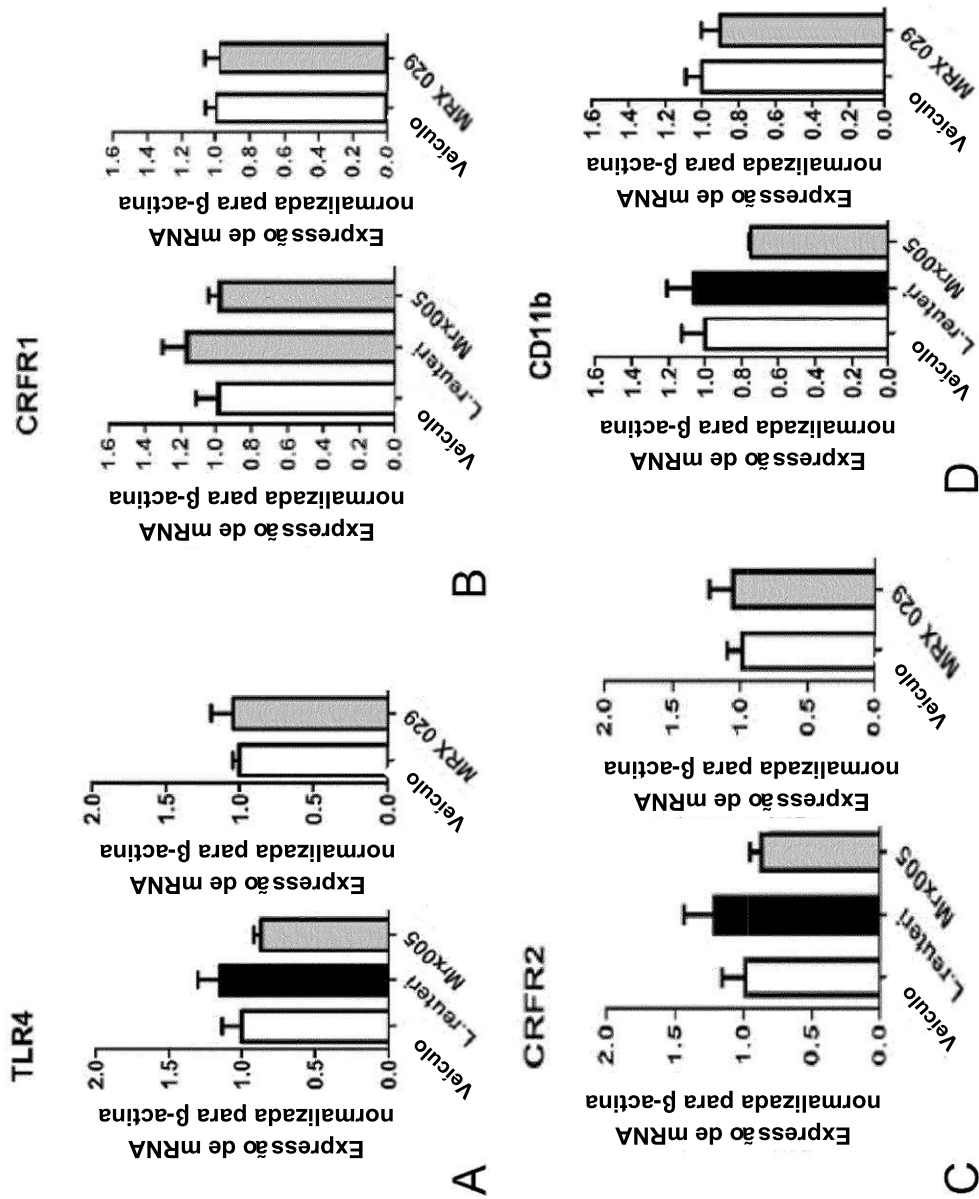
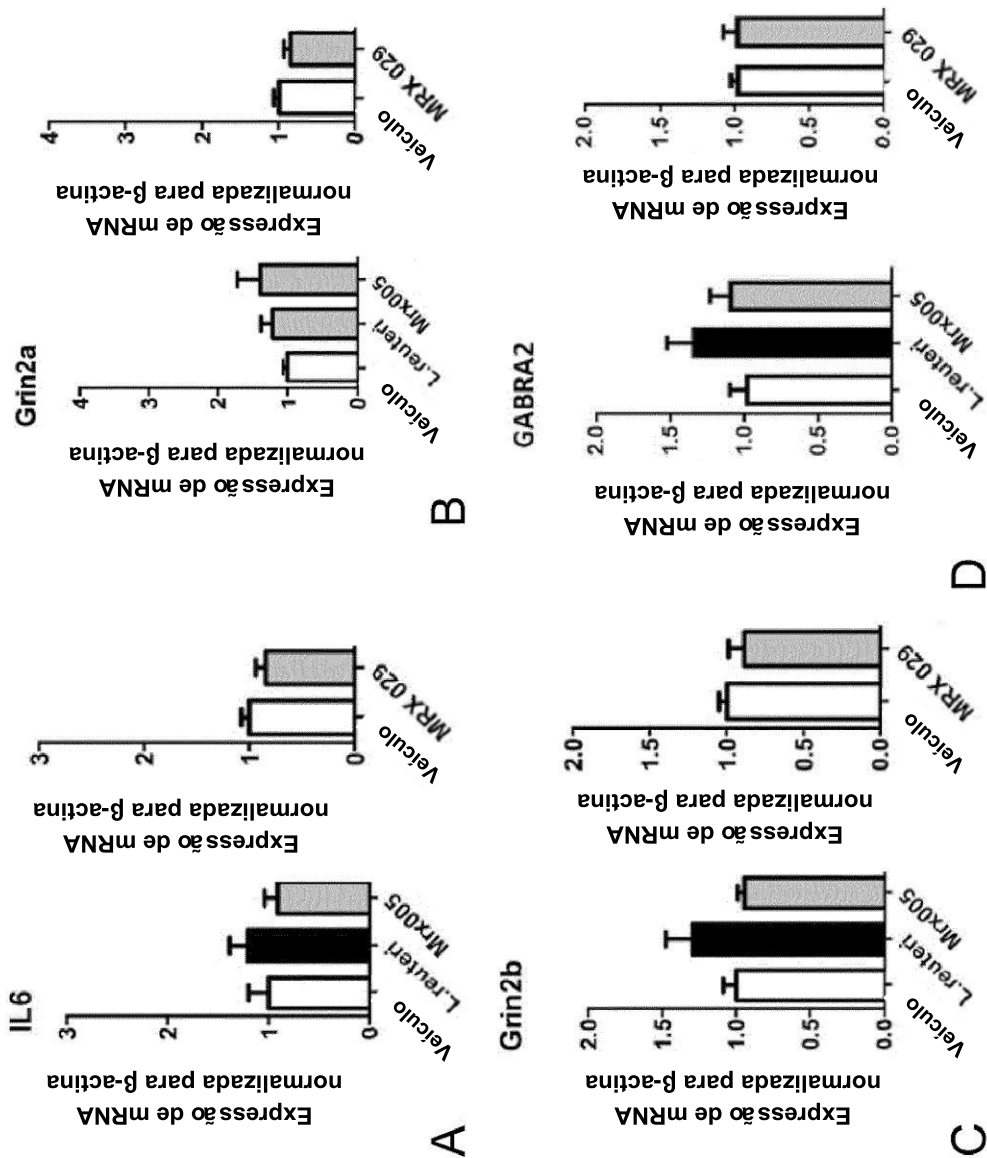


FIG 30

FIG 31



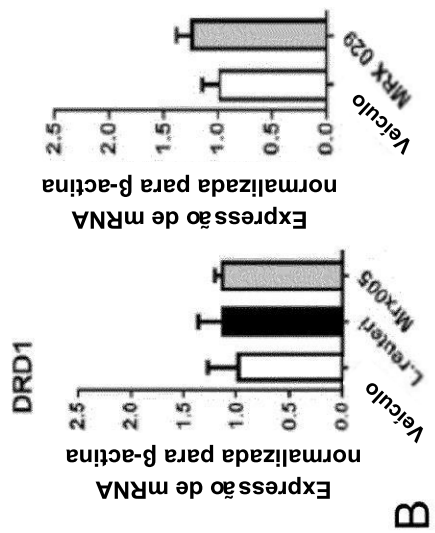
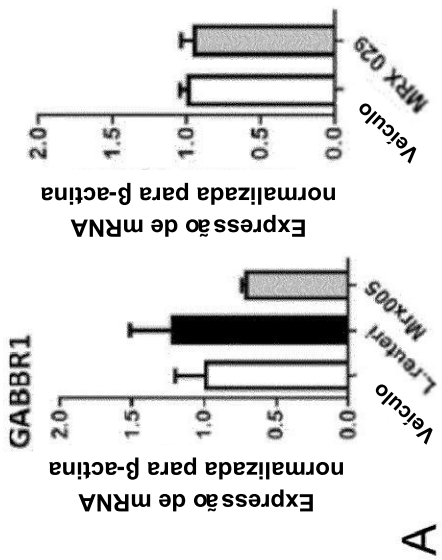


FIG 32

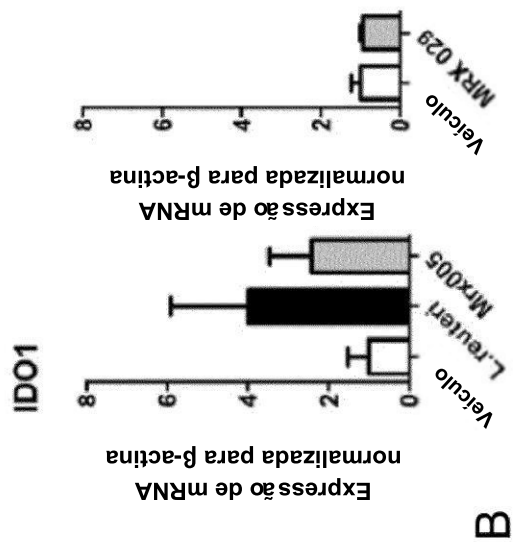
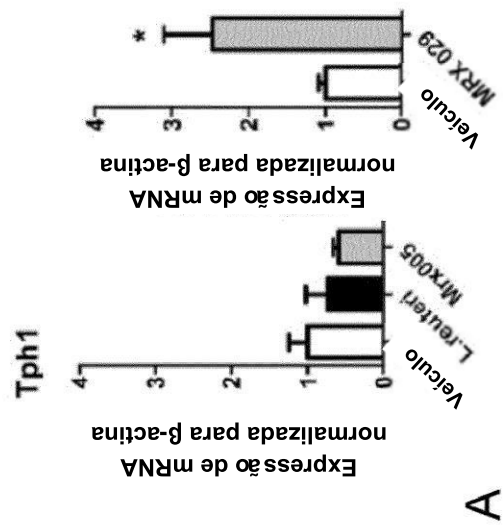
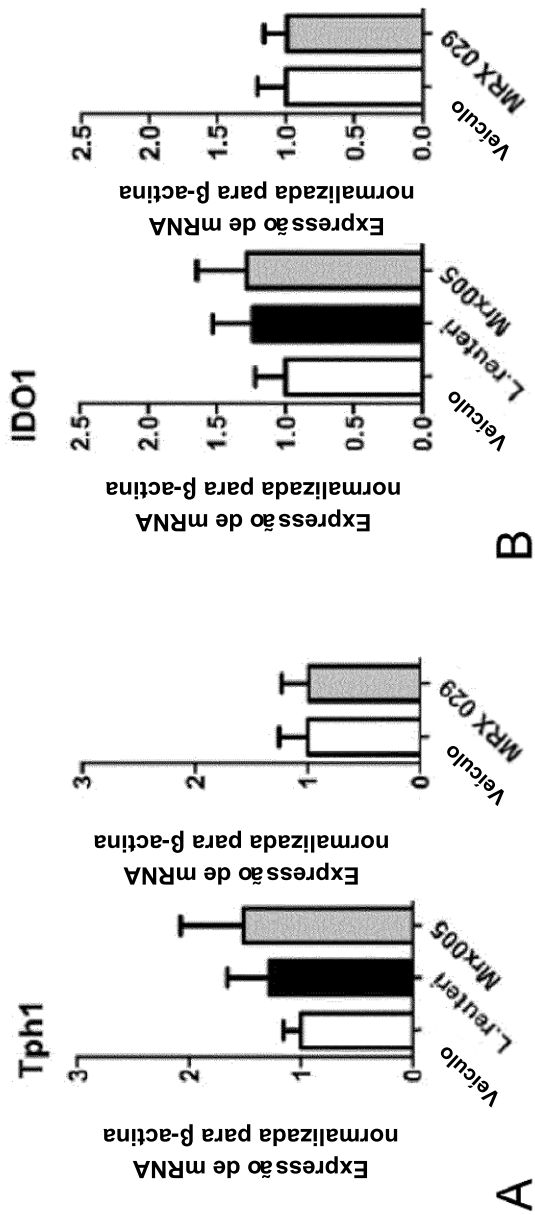
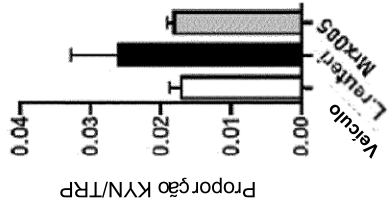


FIG 33

FIG 34

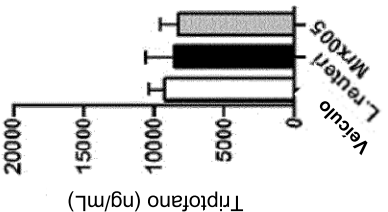


Índice de metabolismo de quinurenina/triptofano



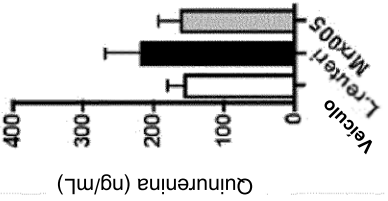
C

Circulação de triptofano



B

Circulação de quinurenina



A

FIG 35

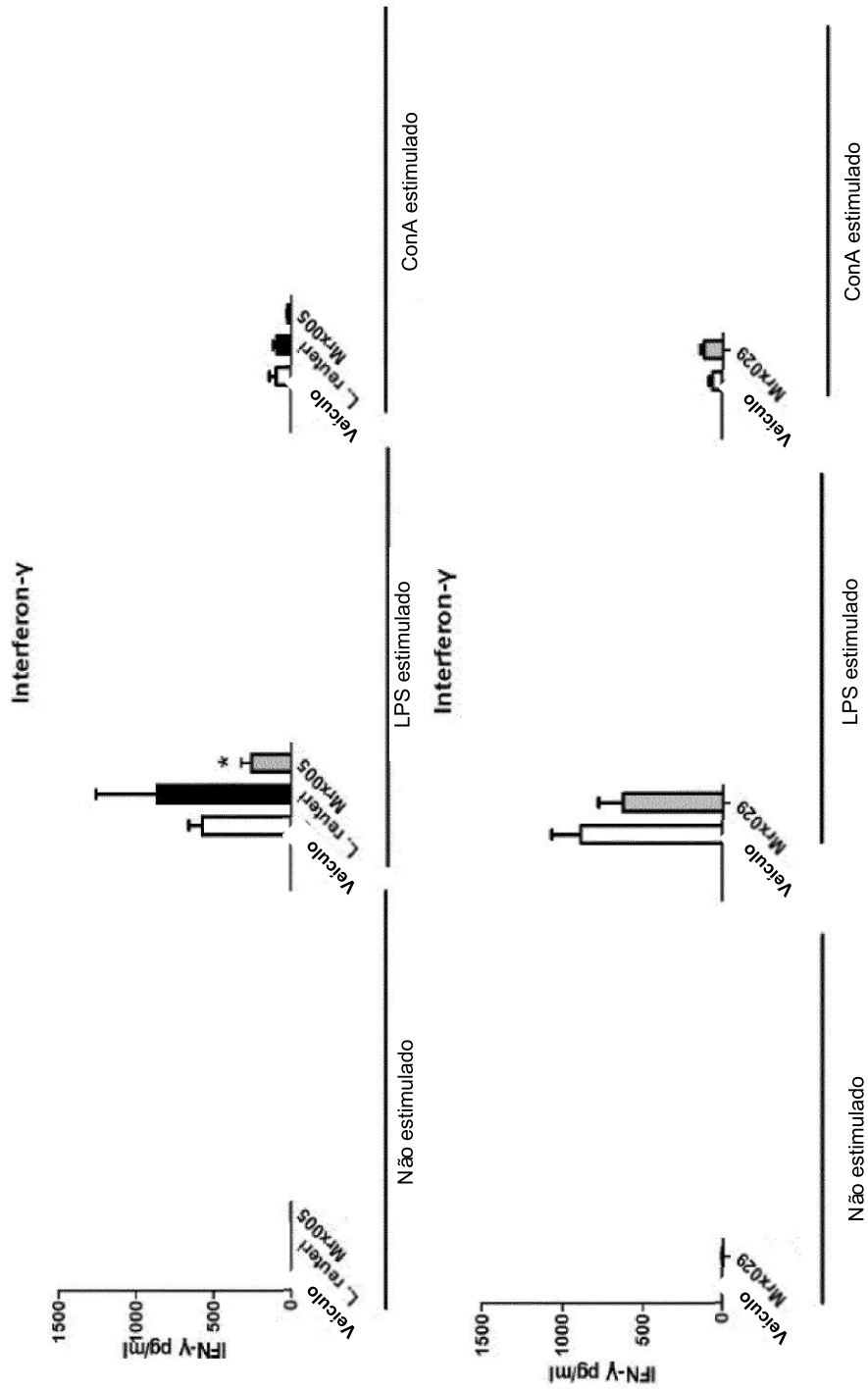


FIG 36

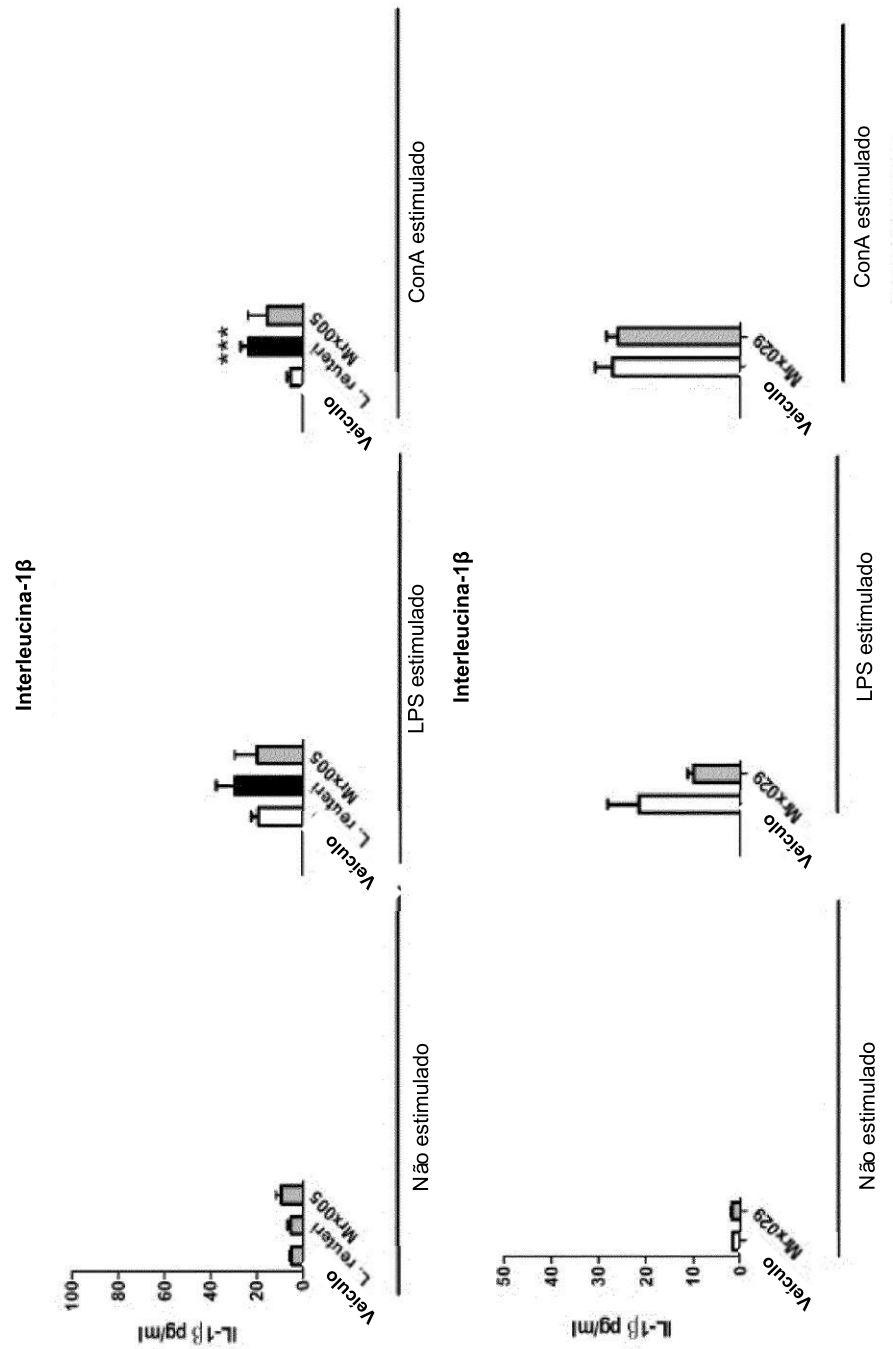


FIG 37

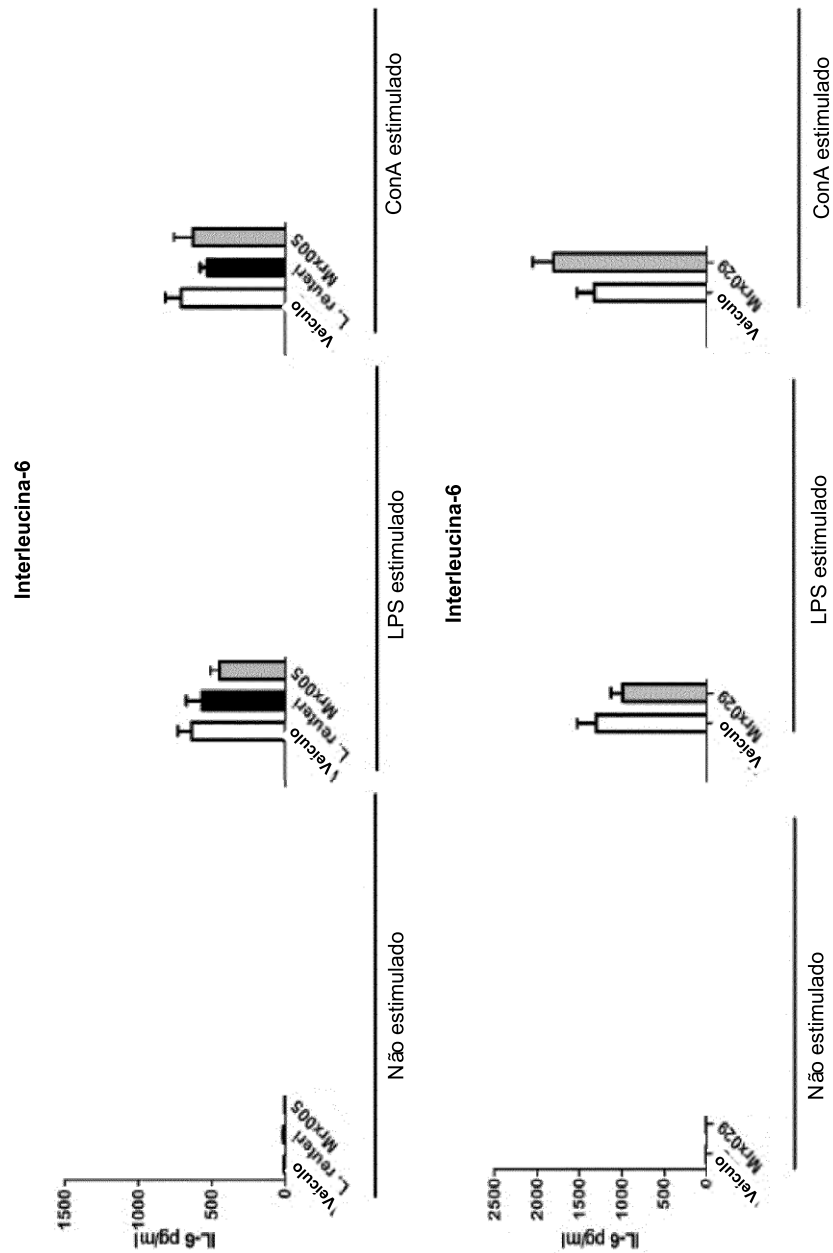


FIG 38

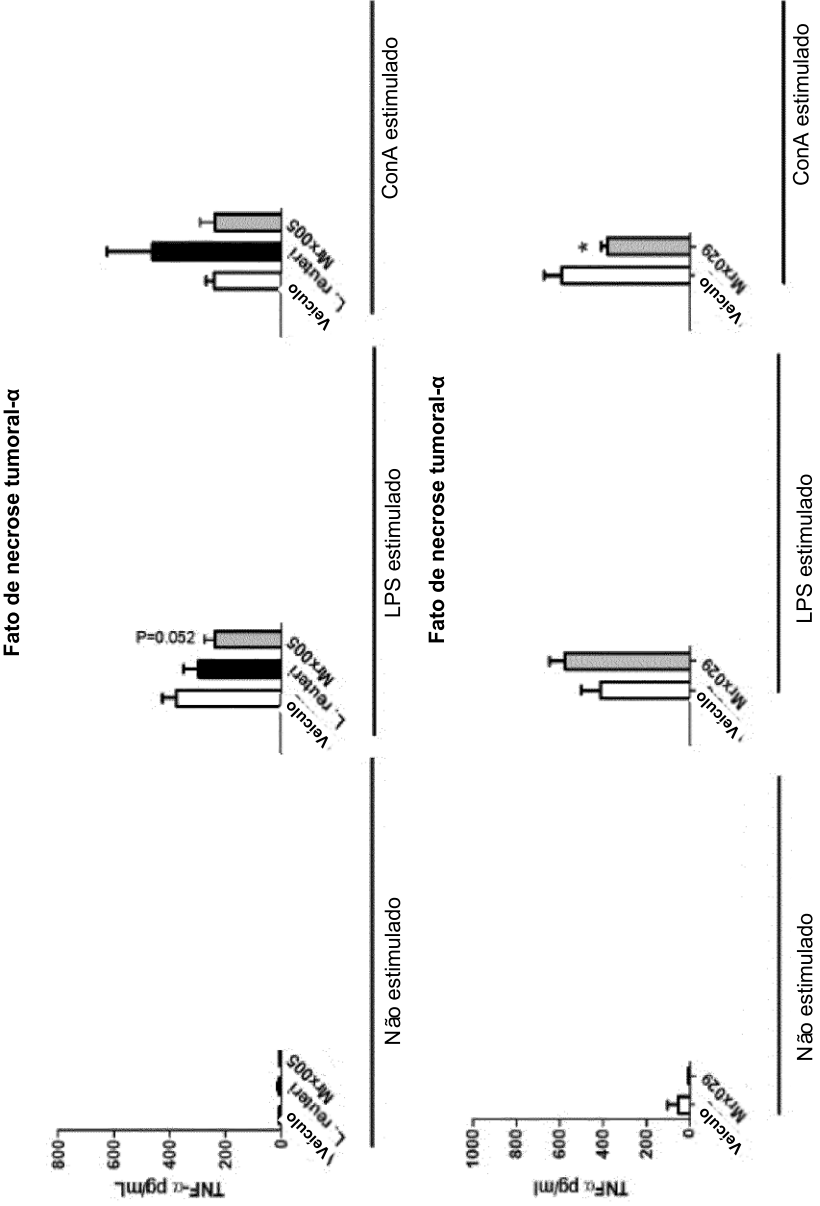
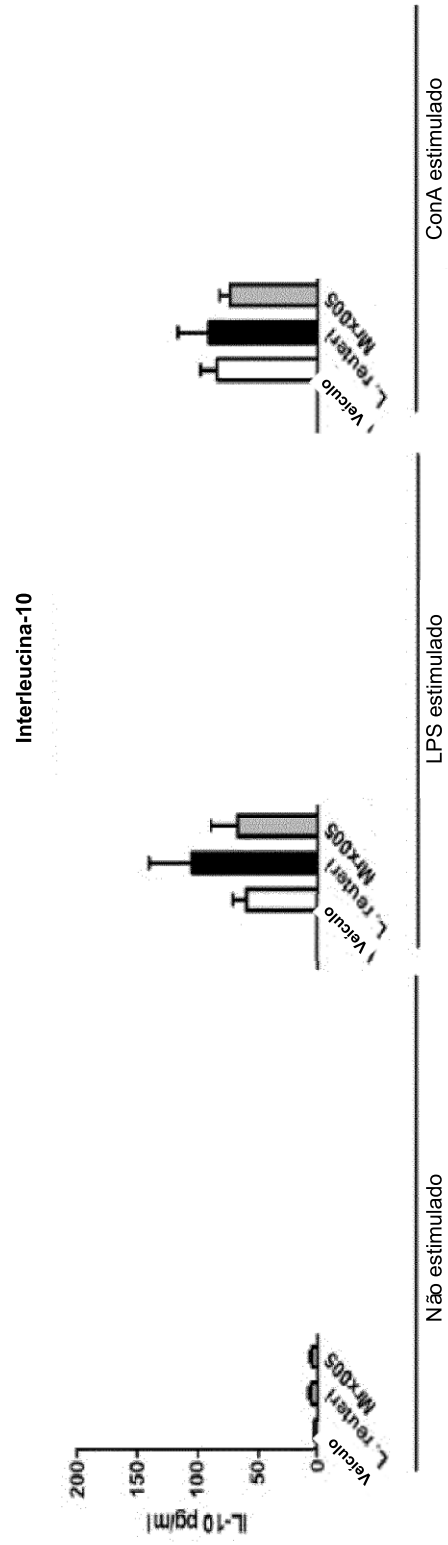


FIG 39

**FIG 40**

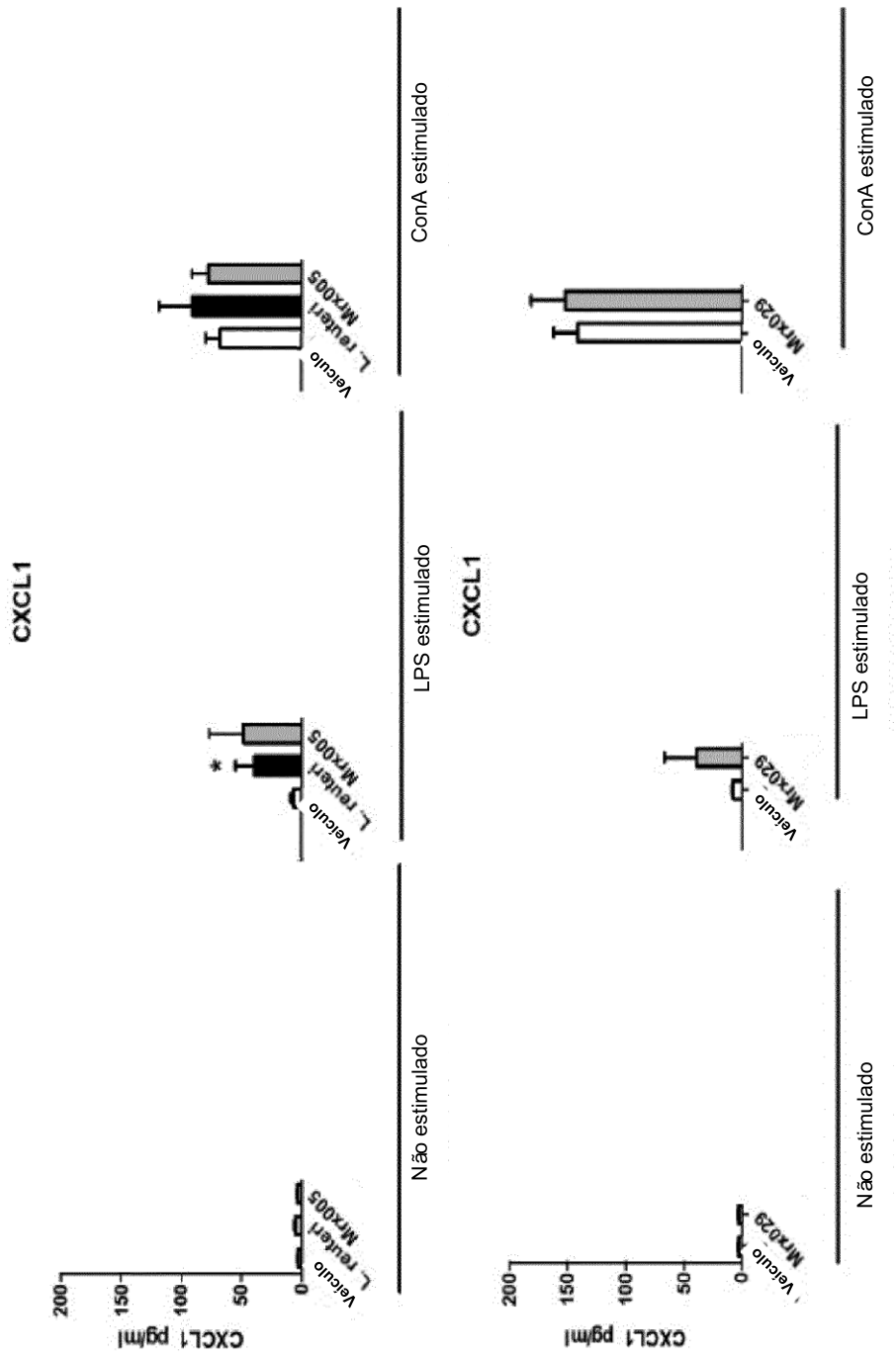


FIG 41

FIG 42

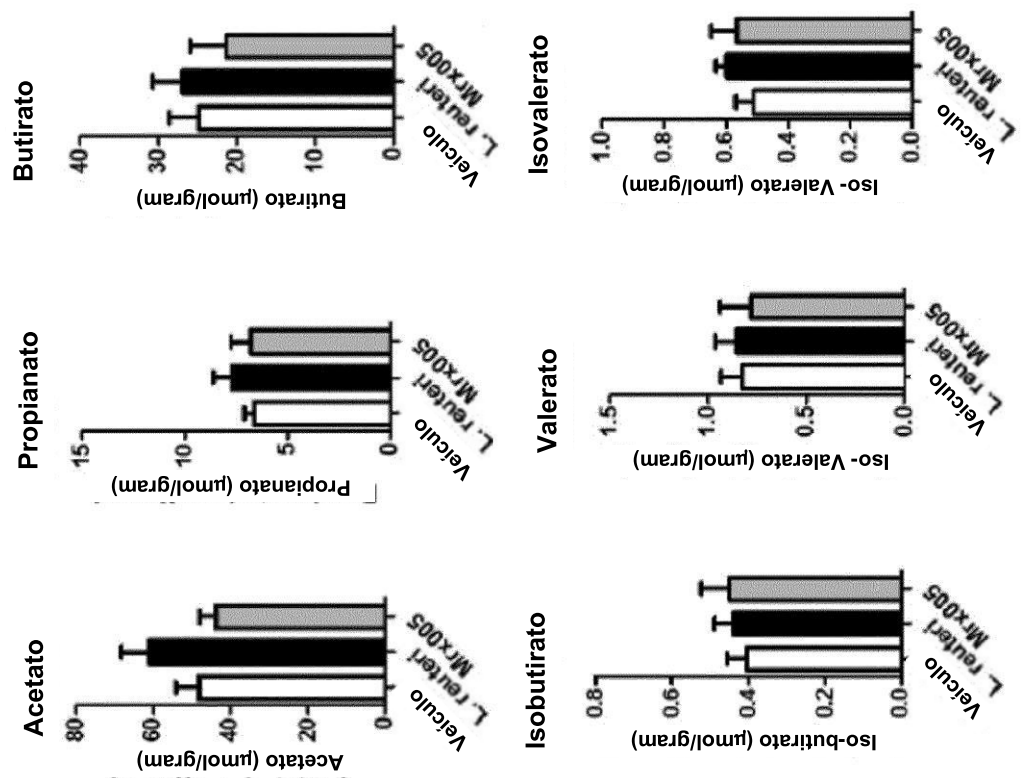
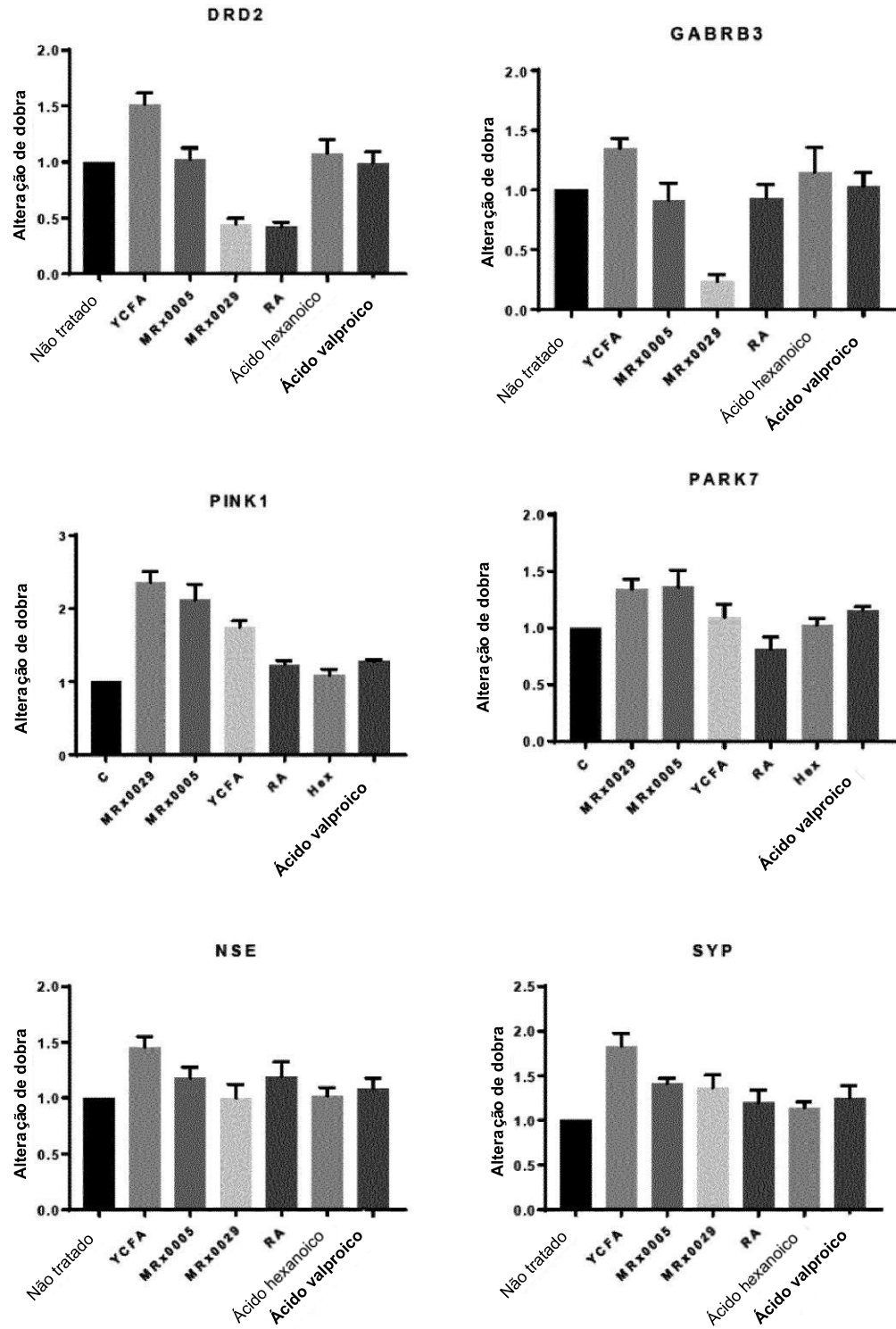


FIG 43



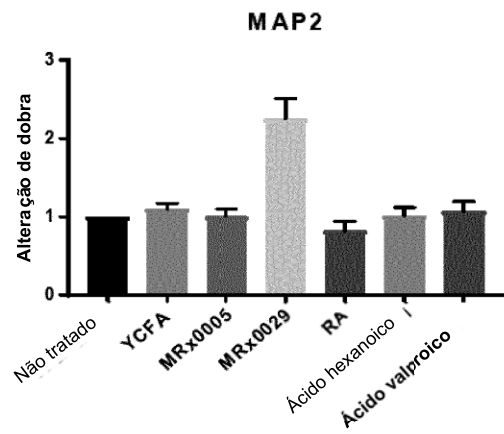
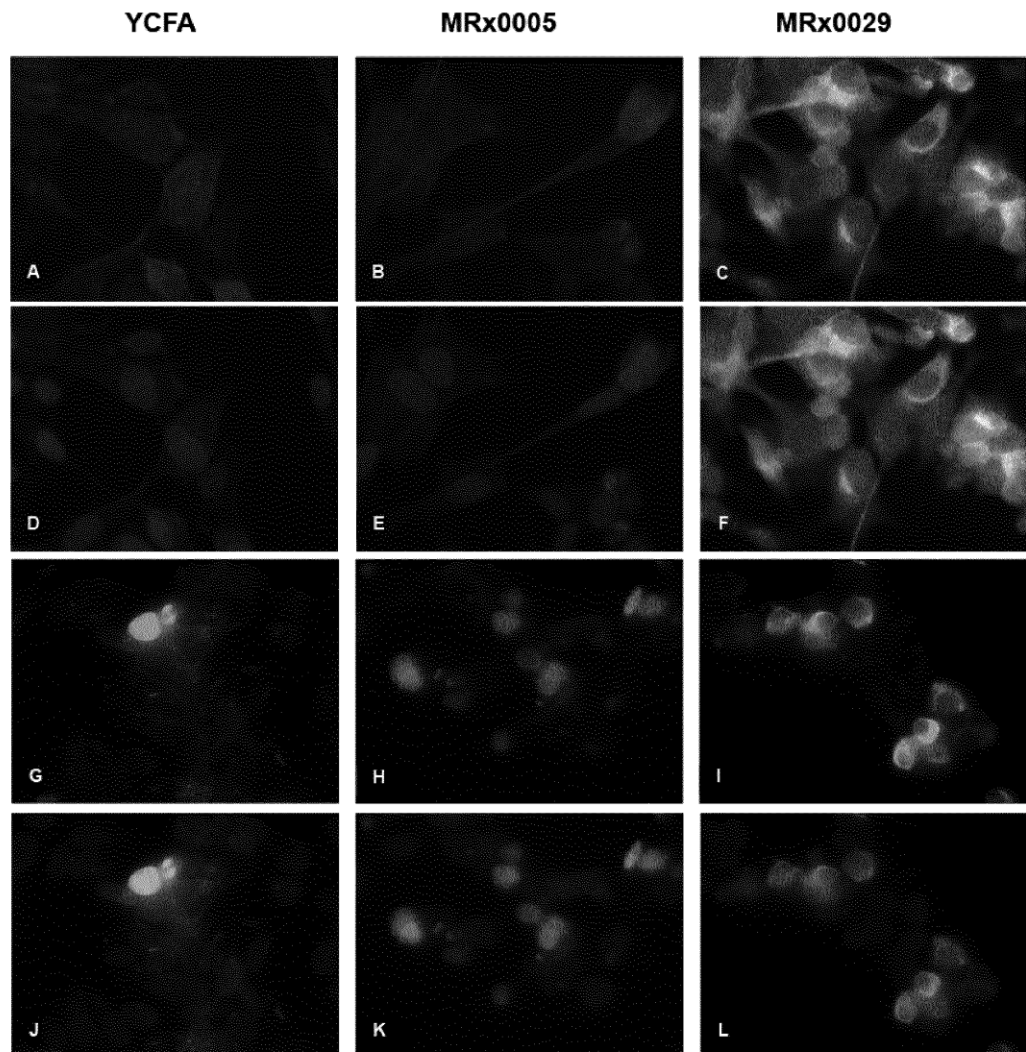
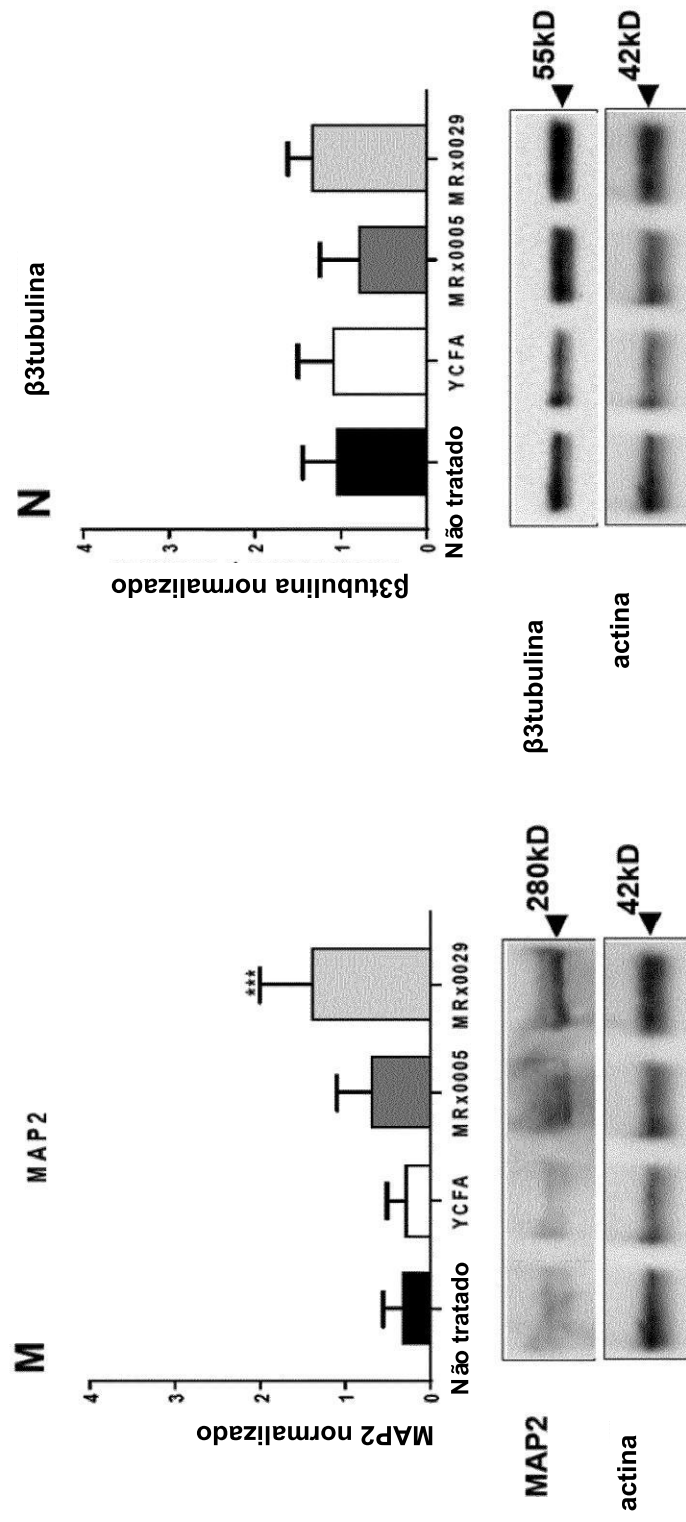
**FIG 43** continuação**FIG 44**

FIG 44 continuação



RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CEPAS BACTERIANAS**".

A presente invenção refere-se a composições compreendendo cepas bacterianas para tratamento e prevenção de um distúrbio neurodegenerativo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P244234.TXT
- Data de Geração do Código: 12/12/2019
- Hora de Geração do Código: 17:05:17
- Código de Controle:
 - Campo 1: 06644C4BF43C546E
 - Campo 2: 94DCE7A103C46D3C