

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 106**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2018** **PCT/EP2018/085469**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019** **WO19121666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2018** **E 18833012 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 3727410**

54 Título: **Probióticos para la salud cognitiva y mental**

30 Prioridad:

19.12.2017 EP 17208568

19.12.2017 GB 201721304

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.11.2024

73 Titular/es:

INTERNATIONAL N&H DENMARK APS (100.0%)

Parallelvej 16

2800 Kongens Lyngby, DK

72 Inventor/es:

STENMAN, LOTTA y

LEHTINEN, MARKUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 987 106 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Probióticos para la salud cognitiva y mental

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei* y/o a composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades mentales, síntomas que afectan a la salud mental y/o afecciones asociadas con el estrés crónico, en un mamífero. En particular, la presente invención se refiere a bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei* y/o composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades mentales crónicas o agudas relacionadas con el estrés, caracterizadas, por ejemplo, por síntomas psicológicos de depresión, ansiedad, estrés percibido, déficits en la función cognitiva y demencia. La presente invención también se refiere a usos de bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei* y/o composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei*, incluidos productos alimenticios, complementos dietéticos y formulaciones/composiciones farmacéuticamente aceptables.

ANTECEDENTES

La salud mental está relacionada con el bienestar emocional, psicológico, físico y social. Nuestro estado de salud mental determina cómo gestionamos el estrés. Una enfermedad mental puede definirse como una afección de la salud que cambia el pensamiento, las sensaciones o el comportamiento de una persona (o los tres) y que causa en la persona estrés y problemas de funcionamiento en actividades sociales, laborales o familiares. La enfermedad mental abarca un amplio abanico de trastornos relacionados con la ansiedad, el estado de ánimo, la psicosis, el comportamiento alimentario, el control de los impulsos y la adicción, la personalidad, la sociabilidad, la disociación, el estrés obsesivo-compulsivo y postraumático. Cada enfermedad altera los pensamientos, las sensaciones y/o los comportamientos de una persona de distintas maneras. Los trastornos tales como la enfermedad de Parkinson, la epilepsia y la esclerosis múltiple son trastornos cerebrales, pero se consideran enfermedades neurológicas en lugar de enfermedades mentales. Es interesante indicar que las líneas entre la enfermedad mental y las enfermedades neurológicas, incluidos trastornos de la memoria tales como deterioro cognitivo leve, demencia y enfermedad de Alzheimer, no están claramente definidas y actualmente cada vez más evidencias sugieren que la enfermedad mental está asociada con cambios en la estructura, la química y la función cerebral que podrían ser la base del desarrollo de trastornos neurológicos. Por ejemplo, la conexión entre déficits neurocognitivos y trastornos del estado de ánimo está bien establecida de tal manera que en la depresión grave el deterioro cognitivo puede asemejarse al observado en la demencia (Rabins et al. Br J Psychiatry 1984; 144: 488-92).

Además, el estrés crónico no tratado puede tener como consecuencias afecciones de la salud graves tales como ansiedad, dolor muscular, presión sanguínea alta y un sistema inmunitario debilitado. La investigación muestra que el estrés puede contribuir al desarrollo de enfermedades importantes, tales como enfermedad cardíaca, depresión y obesidad. Los síntomas de estrés agudo y crónico pueden manifestarse en el tubo gastrointestinal, provocando efectos a corto y largo plazo sobre las funciones del tubo gastrointestinal, respectivamente. La exposición al estrés da como resultado alteraciones dentro del eje cerebro-intestino, lo que en último término da lugar al desarrollo de una amplia serie de trastornos gastrointestinales que incluyen enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS) y otras enfermedades gastrointestinales funcionales, respuestas adversas relacionadas con antígenos alimentarios, úlceras pépticas y enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD). Los efectos principales del estrés sobre la fisiología intestinal incluyen: 1) alteraciones en la motilidad gastrointestinal; 2) aumento en la percepción visceral; 3) cambios en la secreción gastrointestinal; 4) aumento en la permeabilidad intestinal; 5) efectos negativos sobre la capacidad regenerativa de la mucosa gastrointestinal y el flujo sanguíneo de la mucosa; y 6) alteración en la composición microbiana intestinal (Konturek et al. J. Physiol Pharmacol. 2011; 62(6):591-9).

Con respecto a la enfermedad mental y el deterioro neurocognitivo y los trastornos neurológicos asociados, se ha puesto actualmente un claro énfasis en estrategias para lograr una salud mental y cognitiva positiva para una vida completa y sana. Existe un aumento en la demanda de terapias nutricionales para lograr una salud mental positiva, sin efectos secundarios. La medicación actual para tratar los síntomas de las enfermedades mentales que afectan a la salud mental tiene muchos efectos secundarios negativos tales como náuseas, aumento del apetito y ganancia de peso, fatiga y síntomas gastrointestinales. Los complementos dietéticos pueden representar un medio atractivo para lograr una salud mental positiva y prevenir el desarrollo de síntomas de enfermedad mental y afecciones relacionadas.

El eje intestino-cerebro describe la comunicación bidireccional que existe entre el cerebro y el intestino y el eje microbiota-intestino-cerebro apoya el papel del microbioma intestinal en este sistema de comunicación. Tal como se ha indicado anteriormente, la enfermedad mental y los síntomas que afectan a la salud mental son comórbidos con trastornos gastrointestinales, por lo que el estrés emocional y rutinario de la vida diaria puede alterar la función digestiva y viceversa. Cada vez más evidencias indican que la microbiota intestinal ejerce una profunda influencia sobre la fisiología cerebral, las respuestas psicológicas y, en último término, el comportamiento (2015; 63: 1-9).

Están surgiendo evidencias que sugieren que los probióticos pueden influir en la función del sistema nervioso central y regular el estado de ánimo, síntomas psicológicos tales como ansiedad y depresión y cambios relacionados con el estrés en la fisiología, el comportamiento y la función cerebral.

El documento US2017/0312232 divulga composiciones probióticas para tratar y prevenir depresión, ansiedad y trastornos depresivos y relacionados con la ansiedad que comprenden diversas cepas de *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus paracasei*. Además, Meng-Chun Cheng et al. divulga que la demencia vascular inducida por hipertensión podría prevenirse mediante productos fermentados de un *L. paracasei* distinto (PHARMACEUTICAL BIOLOGY, vol. 55, N° 1, 9 de diciembre de 2016 (09/12/2016), páginas 487-496).

Objeto de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar medios para prevenir y/o tratar una enfermedad mental, un síntoma que afecta a la salud mental y/o tratar una afección asociada con estrés crónico. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar medios mediante los cuales se pueda promover, mantener y/o restaurar la salud mental de un individuo.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en estudios descritos en el presente documento que demuestran sorprendentemente que el *Lactobacillus paracasei* puede contrarrestar significativamente los efectos del estrés sobre resultados conductuales (ansiedad, depresión y función cognitiva), bioquímicos y funcionales.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mental, un síntoma que afecta a la salud mental y/o una afección asociada con el estrés crónico, según la reivindicación 1, en un mamífero.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mental, un síntoma que afecta a la salud mental y/o una afección asociada con el estrés crónico, según la reivindicación 2, en un mamífero.

En otro aspecto más, la invención proporciona una combinación de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum*, para su uso por separado, secuencial o simultáneo en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mental, un síntoma que afecta a la salud mental y/o afección asociada con el estrés crónico, según la reivindicación 10, en un mamífero.

El *Lactobacillus paracasei* que se usa en aspectos de la invención es la cepa Lpc-37, registrada en la DSMZ con el número de depósito DSM 32661.

Además, opcionalmente, cuando se usa en aspectos de la invención, el *Lactobacillus plantarum* es la cepa LP12418 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ como DSM32655, y/o la cepa LP12407 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ como DSM32655.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Efecto de 3 semanas de estrés crónico sobre el peso corporal en ratones, en grupos tratados con vehículo solo o una cepa bacteriana seleccionada. N=12 para todos los grupos excepto para el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA bidireccional; Peso (tiempo): $F_{(10,594)}=60,99$, $p < 0,0001$; Peso (tratamiento): $F_{(4,594)}=29,30$, $p < 0,0001$

Figura 2. Efecto de 3 semanas de estrés crónico sobre la relación peso suprarrenal/peso corporal en ratones, en grupos tratados con vehículo solo o una cepa bacteriana seleccionada. N=12 para todos los grupos excepto para el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Peso suprarrenal: $F_{(4,58)}=5,820$, $p = 0,0006$; Comparaciones por pares: * $p < 0,05$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ## $p < 0,01$ frente al grupo de estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett)

Figura 3. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la ansiedad inducida por estrés crónico en ratones. N=12 para todos los grupos excepto para el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Tiempo en brazos abiertos: $F_{(4,58)}=23,72$, $p < 0,0001$; Actividad locomotora: $F_{(4,58)}=0,1612$, $p > 0,05$; Entradas en brazos abiertos: $F_{(4,58)}=0,8161$, $p < 0,05$; Comparaciones por pares: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ## $p < 0,01$ frente al grupo de estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett)

Figura 4. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la ansiedad inducida por estrés crónico en ratones en el procedimiento de campo abierto. Se midieron tres parámetros; actividad locomotora (A), locomoción en el centro de la zona (B) y comportamiento de exploración en postura

erguida/atusamiento rostral (estereotipias C). Para las estereotipias, los datos se representaron como unidades arbitrarias (U.A.) correspondientes al número de exploraciones en postura erguida más el número de atusamientos rostrales durante 10 minutos de procedimiento de campo abierto. N=12 para todos los grupos excepto el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Actividad locomotora: $F_{(4,58)} = 3,433$, $p = 0,0143$; Locomoción en el centro: $F_{(4,58)} = 37,28$, $p < 0,0001$; Estereotipias: $F_{(4,58)} = 2,227$, $p < 0,05$; Comparaciones por pares: *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ## $p < 0,001$ frente al grupo con estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Figura 5. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre déficits de memoria de reconocimiento inducidos por estrés crónico en ratones. Los parámetros medidos incluían frecuencia de interacción con objeto (A, C) y tiempo de interacción con objeto (B, D), para reconocimiento del mismo objeto (A, B) y reconocimiento de objeto novedoso (C, D). N=12 para todos los grupos excepto el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Día 2 Frecuencia para el mismo objeto: $F_{(4,58)} = 1,460$, $p > 0,05$; Día 2 Tiempo para el mismo objeto: $F_{(4,58)} = 1,327$, $p > 0,05$; Día 3 Frecuencia para el objeto novedoso: $F_{(4,58)} = 10,48$, $p < 0,001$; Día 3 Tiempo para el objeto novedoso: $F_{(4,58)} = 8,881$, $p < 0,001$; Comparaciones por pares: *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ frente al grupo de estrés/vehículo crónico (prueba de Dunnett).

Figura 6. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la desesperanza conductual inducida por estrés crónico en ratones medido en la prueba de nado forzado. Se midieron tres parámetros; tiempo de inmovilidad (A), tiempo de lucha (B) y tiempo de nado (C). N=12 para todos los grupos excepto el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Tiempo de inmovilidad: $F_{(4,58)} = 18,14$, $p < 0,0001$; Tiempo de lucha: $F_{(4,58)} = 0,4328$, $p > 0,05$; Tiempo de nado: $F_{(4,58)} = 8,931$, $p < 0,0001$; Comparaciones por pares: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ frente al grupo de estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Figura 7. Efecto del estrés crónico y tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre las concentraciones de corticosterona en plasma. N=12 para todos los grupos excepto el grupo tratado con Lpc-37, en el que N=11. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Concentración de corticosterona: $F_{(4,58)} = 0,8513$, $p > 0,05$.

Figura 8. Efecto de 3 semanas de estrés crónico sobre el peso corporal en ratones, en grupos tratados con vehículo solo o una cepa bacteriana seleccionada. N=12-18 para todos los grupos. Análisis estadísticos: ANOVA bidireccional; Peso (tiempo): $F_{(9,643)} = 17,46$, $p < 0,0001$; Peso (tratamiento): $F_{(4,643)} = 74,39$, $p < 0,0001$.

Figura 9. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la ansiedad inducida por estrés crónico en ratones. N=10-18 para todos los grupos. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Tiempo en brazos abiertos: $F_{(4,67)} = 78,92$, $p < 0,0001$; Actividad locomotora $F_{(4,67)} = 0,3718$, $p > 0,05$; Entradas en brazos abiertos: $F_{(4,67)} = 1,19$, $p > 0,05$; Tiempo en brazos cerrados: $F_{(4,67)} = 10,85$, $p < 0,0001$; Entradas en brazos cerrados: $F_{(4,67)} = 1,19$, $p > 0,05$; Comparaciones por pares: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, # $p < 0,05$, ## $p < 0,0001$ frente al grupo con estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Figura 10. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la ansiedad inducida por estrés crónico en ratones en el procedimiento de campo abierto. Se midieron cinco parámetros; actividad locomotora (A), locomoción en el centro de la zona (B), comportamiento de exploración en postura erguida/atusamiento rostral (estereotipias C), tiempo empleado en zona(s) interna(s) (D) y tiempo empleado en zona(s) externa(s) (E). Para estereotipias, los datos se representaron como unidades arbitrarias (U.A.) correspondientes al número de exploraciones en postura erguida más el número de atusamientos rostrales durante 10 minutos de procedimiento de campo abierto. N=10-18 para todos los grupos. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Actividad locomotora: $F_{(4,67)} = 0,4977$, $p > 0,05$; Locomoción en el centro: $F_{(4,67)} = 21,5$, $p < 0,0001$; Estereotipias: $F_{(4,67)} = 0,2328$, $p > 0,05$; Tiempo transcurrido en la zona interna: $F_{(4,67)} = 16,42$, $p < 0,0001$; Tiempo transcurrido en la zona externa: $F_{(4,67)} = 16,42$, $p < 0,0001$; Comparaciones por pares: *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ### $p < 0,001$ frente al grupo con estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Figura 11. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre déficits de memoria de reconocimiento inducidos por estrés crónico en ratones. Los parámetros medidos incluían frecuencia de interacción con objeto (A, B) y tiempo de interacción con objeto (D, E), para reconocimiento del mismo objeto (A, D) y reconocimiento de objeto novedoso (B, E). El índice de discriminación para el objeto novedoso (DI) es la diferencia de frecuencia de interacción (C) y tiempo de interacción (F) que los ratones pasaron investigando entre el objeto novedoso y el familiar dividido por la frecuencia total y el tiempo de exploración de ambos objetos. [Índice de discriminación, DI = (frecuencia/tiempo de exploración de objeto novedoso - frecuencia/tiempo de exploración de objeto familiar)/(frecuencia/tiempo de exploración de objeto novedoso + frecuencia/tiempo de exploración de objeto familiar)]. N=10-18 para todos los grupos.

Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Día 2 Frecuencia para el mismo objeto: $F_{(4,59)} = 1,54$, $p > 0,05$; Día 2 Tiempo para el mismo objeto: $F_{(4,59)} = 0,5006$, $p > 0,05$; Día 3 Frecuencia para el objeto novedoso: $F_{(4,59)} = 14,18$, $p < 0,001$; Día 3 Tiempo para el objeto novedoso: $F_{(4,59)} = 15,02$, $p < 0,001$; Índice de discriminación para frecuencia: $F_{(4,59)} = 14,18$, $p < 0,0001$; Índice de discriminación para tiempo: $F_{(4,59)} = 15,02$, $p < 0,0001$; Comparaciones por pares: *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ### $p < 0,001$ frente al grupo con estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Figura 12. Efecto del tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la desesperanza conductual inducida por estrés crónico en ratones medido en la prueba de nado forzado. Se midieron tres parámetros; tiempo de inmovilidad (A), tiempo de nado (B) y tiempo de lucha (C). $N=10-18$ para todos los grupos. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Tiempo de inmovilidad: $F_{(4,59)} = 26,82$, $p < 0,0001$; Tiempo de nado: $F_{(4,59)} = 15,97$, $p < 0,0001$; Tiempo de lucha: $F_{(4,59)} = 0,7128$, $p > 0,05$; Comparaciones por pares: *** $p < 0,0001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ### $p < 0,0001$ frente al grupo con estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Figura 13. Efecto del estrés crónico y tratamiento con cepas bacterianas seleccionadas sobre la concentración de corticosterona y hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en plasma sanguíneo y la concentración de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo. $N=10-18$ para todos los grupos. Análisis estadísticos: ANOVA unidireccional; Concentración de corticosterona: $F_{(4,67)} = 7,592$, $p < 0,001$; Concentración de ACTH: $F_{(4,67)} = 5,75$, $p < 0,001$; Concentración de BDNF: $F_{(4,67)} = 1,23$, $p > 0,05$; Comparaciones por pares: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al grupo sin estrés/vehículo, ## $p < 0,01$ frente al grupo de estrés crónico/vehículo (prueba de Dunnett).

Descripción detallada de la invención

Bacterias

Las bacterias usadas en aspectos de la invención son bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei*. El *Lactobacillus paracasei* es la cepa Lpc-37, también conocida como DGCC4981 o Lbc81. La cepa Lpc-37 se registró en la ATCC con el número de depósito PTA 4798 y en la DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B D-38124) con el número de depósito DSM32661, el 5 de octubre de 2017. Se incorpora al presente documento una copia del formulario de depósito DSMZ para Lpc-37 que proporciona información relevante sobre las características de la cepa.

El *Lactobacillus paracasei* se puede usar en combinación con una o más cepas de *Lactobacillus plantarum*. Opcionalmente, la o las cepas de *Lactobacillus plantarum* se seleccionan entre las siguientes

- La cepa LP12418 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ con el número de depósito DSM 32655, el 27 de septiembre de 2017;
- La cepa LP12407 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ con el número de depósito DSM 32654, el 27 de septiembre de 2017. Se incorporan al presente documento copias de los formularios del depósito DSMZ para LP12418 y LP12407 que proporcionan información relevante sobre las características de las cepas (LP12418 se denomina DGCC12418 y LP12407 se denomina DGCC12407).
-

El *Lactobacillus paracasei* también se puede usar en combinación con una o más especies bacterianas distintas que tienen la capacidad de ejercer beneficios para la salud positivos sobre un huésped al que se administran.

El *Lactobacillus paracasei* puede usarse en cualquier forma (por ejemplo bacterias viables, durmientes, inactivadas o muertas) siempre que las bacterias sigan siendo capaces de ejercer los efectos descritos en el presente documento. Preferentemente, el *Lactobacillus paracasei* usado en aspectos de la invención es viable.

Preferentemente, el *Lactobacillus paracasei* y, cuando se usa en aspectos de la invención, el *Lactobacillus plantarum*, es adecuado para el consumo humano y/o animal. Un experto en la técnica conocerá fácilmente cepas específicas de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum* que se utilizan en las industrias alimentaria y/o agrícola y que se consideran en general adecuadas para el consumo humano y/o animal.

Opcionalmente, el *Lactobacillus paracasei* y, cuando se usa en aspectos de la invención, el *Lactobacillus plantarum*, son bacterias probióticas. El término "bacterias probióticas" se define de forma que abarque cualquier bacteria no patógena que, cuando se administra viva en cantidades adecuadas a un huésped, confiere un beneficio para la salud a ese huésped. Para la clasificación como un "probiótico", las bacterias deben sobrevivir al paso a través de la parte superior del tubo digestivo del huésped. Los probióticos son no patógenos, no tóxicos y ejercen su efecto beneficioso sobre la salud por una parte a través de interacciones ecológicas con la flora residente en el tubo digestivo, y por otra parte a través de su capacidad para influir en la fisiología y el sistema inmunitario del huésped de una manera positiva. Las bacterias probióticas, cuando se administran a un huésped en número

suficiente, tienen la capacidad de progresar a través del intestino, manteniendo la viabilidad y ejerciendo sus efectos primarios en la luz y/o la pared del tubo gastrointestinal del huésped. Después, pasan a formar parte de la flora residente y esta colonización (o colonización transitoria) permite que las bacterias probióticas ejerzan un efecto beneficioso, tal como la represión de microorganismos potencialmente patógenos presentes en la flora e interacciones con el huésped en el intestino, incluido el sistema inmunitario.

Opcionalmente, el *Lactobacillus paracasei* se usa en combinación con otras bacterias probióticas.

Composiciones

El término "composición" se usa en el sentido amplio para referirse a la forma en la que algo está compuesto, es decir, su composición general. En aspectos de la invención, las composiciones pueden consistir esencialmente en una única cepa de bacterias *Lactobacillus paracasei* (ATCC PTA 4798/DSM 32661).

Alternativamente, las composiciones pueden comprender una cepa de *Lactobacillus paracasei* junto con otros componentes, tales como otras cepas bacterianas, componentes biológicos y químicos, principios activos, metabolitos, nutrientes, fibras, prebióticos, etc.

En un ejemplo, las composiciones usadas en aspectos de la invención consisten esencialmente en una cepa de *Lactobacillus paracasei* (concretamente ATCC PTA 4798/DSM 32661) o una mezcla de una cepa de *Lactobacillus paracasei* (ATCC PTA 4798/DSM 32661) y otras cepas bacterianas.

Aunque no es un requisito que las composiciones comprendan ningún soporte, diluyente o excipiente, dicho soporte, diluyente o excipiente puede añadirse y usarse de una forma que sea familiar para los expertos en la técnica. Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, celulosa microcristalina, maltodextrina de arroz, dióxido de silicio y estearato de magnesio. Las composiciones de la invención también pueden comprender componentes crioprotectores (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, ascorbato de sodio y/u otros crioprotectores adecuados).

Los términos "composición" y "formulación" se pueden usar indistintamente.

Las composiciones usadas en aspectos de la invención pueden adoptar la forma de preparaciones sólidas, en solución o en suspensión. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen, pero sin limitación: comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos y polvos que pueden ser humectables, secados por pulverización o secados por congelación/liofilizados. Las composiciones pueden contener agentes aromatizantes o colorantes. Las composiciones pueden formularse para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, mantenida, pulsada o controlada.

A modo de ejemplo, si las composiciones de la presente invención se usan en forma de comprimidos, los comprimidos también pueden contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina; disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa de sodio y determinados silicatos complejos; aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga; pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Los ejemplos de otros vehículos aceptables para su uso en la preparación de composiciones incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Para suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

A continuación se exponen con fines ilustrativos ejemplos no limitantes específicos de composiciones que pueden usarse en aspectos de la invención. Estos incluyen, pero sin limitación, productos alimenticios, alimentos funcionales, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas y medicamentos.

Complementos dietéticos

Las composiciones de la invención pueden tomar la forma de complementos dietéticos o pueden usarse en combinación con complementos dietéticos, también denominados en el presente documento complementos alimenticios.

El término "complemento dietético", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un producto destinado a la ingestión que contiene un "ingrediente dietético" destinado a añadir valor nutricional o beneficios para la salud a (complementar) la dieta. Un "ingrediente dietético" puede incluir (pero sin limitación) una, o cualquier combinación, de las siguientes sustancias: bacterias, un probiótico (por ejemplo, bacterias probióticas), una vitamina, un mineral, una hierba u otro producto botánico, un aminoácido, una sustancia dietética para su uso por personas para complementar la dieta aumentando la ingesta dietética total, un concentrado, metabolito, constituyente o extracto. Los complementos dietéticos pueden encontrarse en muchas formas tales como comprimidos, cápsulas, geles blandos, cápsulas de gel, líquidos o polvos. Algunos complementos dietéticos pueden ayudar a garantizar una ingesta dietética adecuada de nutrientes esenciales; otros pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedad.

Productos alimenticios

Las composiciones de la invención pueden adoptar la forma de un producto alimenticio. En este caso, el término "alimenticio" se usa en un sentido amplio y abarca comida y bebida para seres humanos, así como comida y bebida para animales (es decir, un pienso). Preferentemente, el producto alimenticio es adecuado, y está diseñado, para el consumo humano.

El alimento puede encontrarse en forma líquida, sólida o de suspensión, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Cuando se encuentra en forma de un producto alimenticio, la composición puede comprender o usarse junto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un principio nutricionalmente activo.

A modo de ejemplo, las composiciones de la invención pueden presentarse en forma de uno de las siguientes: un zumo de frutas; una bebida que comprende proteína de suero: un té saludable o de hierbas, una bebida de cacao, una bebida láctea, una bebida con bacterias acidolácticas, un yogur y/o un yogur para beber, un queso, un helado, un granizado, un postre, un dulce, una galleta, un pastel, una mezcla para pasteles o un relleno para pasteles, un aperitivo, un relleno de frutas, un glaseado para pasteles o donuts, una crema de relleno de panadería instantánea, un relleno para galletas, un relleno de panadería listo para su uso, un relleno bajo en calorías, una bebida nutricional para adultos, una bebida de soja/zumo acidificada, una barrita nutricional o saludable, una bebida en polvo, una leche de soja enriquecida con calcio o una bebida de café enriquecida con calcio.

Opcionalmente, cuando el producto es un producto alimenticio, el *Lactobacillus paracasei* deberá seguir siendo eficaz hasta la fecha normal de "venta" o "caducidad", periodo en el que el producto alimenticio es ofrecido a la venta por el minorista. Preferentemente, el tiempo eficaz deberá extenderse pasadas dichas fechas hasta el final del periodo de frescura normal, cuando el deterioro de los alimentos se vuelve evidente. La duración y la vida útil normal deseadas variarán de un producto alimenticio a otro y los expertos en la técnica reconocerán que los tiempos de vida útil variarán en función del tipo de producto alimenticio, el tamaño del producto alimenticio, las temperaturas de almacenamiento, las condiciones de procesamiento, el material de envasado y el equipo de envasado.

Ingredientes alimentarios

Las composiciones de la presente invención pueden tomar la forma de un ingrediente alimentario y/o ingrediente de pienso.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ingrediente alimentario" o "ingrediente de pienso" incluye una composición que se añade o puede añadirse a alimentos funcionales o productos alimenticios como complemento nutricional y/o de salud para seres humanos y animales.

El ingrediente alimentario puede encontrarse en forma de líquido, suspensión o sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Alimentos funcionales

Las composiciones de la invención pueden adoptar la forma de alimentos funcionales.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alimento funcional" se refiere a un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional, sino que también es capaz de proporcionar un efecto beneficioso adicional al consumidor.

En consecuencia, los alimentos funcionales son alimentos ordinarios en los que se han incorporado componentes o ingredientes (tales como los descritos en el presente documento) que imparten al alimento una función específica, por ejemplo un beneficio médico o fisiológico, diferente de un efecto puramente nutricional.

Aunque no existe una definición legal de alimento funcional, la mayor parte de los interesados en este sector concuerdan que son alimentos comercializados por tener efectos específicos de salud que exceden los efectos nutricionales básicos.

Algunos alimentos funcionales son nutracéuticos. En este caso, el término "nutracéutico" se refiere a un alimento que no solo es capaz de proporcionar un efecto nutricional y/o de satisfacción del sabor, sino que también es capaz de suministrar un efecto terapéutico (u otro efecto beneficioso) al consumidor. Los nutracéuticos cruzan las líneas divisorias tradicionales entre los alimentos y las medicinas.

Alimentos médicos

Las composiciones de la presente invención pueden adoptar la forma de alimentos médicos.

Por "alimento médico" se entiende un alimento que se formula para su consumo o administración con o sin la supervisión de un médico y que está destinado a la gestión o condición dietética específica para la que se establecen requisitos nutricionales distintivos, basados en principios científicos reconocidos, mediante evaluación médica.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención pueden usarse como productos farmacéuticos o en la preparación de los mismos. En este caso, el término "farmacéutico" se usa en un sentido amplio, y abarca productos farmacéuticos para seres humanos así como productos farmacéuticos para animales (es decir, aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferido, el producto farmacéutico es para uso humano.

El producto farmacéutico puede ser para fines terapéuticos, que pueden ser de naturaleza curativa o paliativa o preventiva.

Un producto farmacéutico puede encontrarse en forma de un comprimido prensado, un comprimido, una cápsula, una pomada, un supositorio o una solución bebible.

Cuando se usan como producto farmacéutico o en la preparación del mismo, las composiciones de la presente invención pueden usarse junto con uno o más de: un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, un principio farmacéuticamente activo.

El producto farmacéutico puede encontrarse en forma líquida o en forma sólida, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

El uso de *Lactobacillus paracasei* en la presente invención puede constituir en sí mismo un principio farmacéuticamente activo. En una forma de realización, el *Lactobacillus paracasei* constituye el único componente activo. Alternativamente, el *Lactobacillus paracasei* puede ser al menos uno de una serie (es decir, 2 o más) de componentes farmacéuticamente activos.

Medicamentos

Las composiciones de la invención pueden adoptar la forma de medicamentos.

El término medicamento, tal como se utiliza en el presente documento, abarca medicamentos para uso humano y animal en medicina humana y veterinaria. Además, el término medicamento, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que proporciona un efecto terapéutico, preventivo y/o beneficioso. El término "medicamento", tal como se utiliza en el presente documento, no se limita necesariamente a sustancias que necesitan aprobación de comercialización, sino que puede incluir sustancias que pueden usarse en cosméticos, nutracéuticos, alimentos (incluyendo comidas y bebidas, por ejemplo), cultivos probióticos y remedios naturales. Además, el término "medicamento", tal como se utiliza en el presente documento, abarca un producto diseñado para su incorporación en pienso para animales, por ejemplo pienso para ganado y/o pienso para mascotas.

Dosificación

Las composiciones de la presente invención pueden comprender de 10^6 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias *Lactobacillus paracasei* por dosis o por gramo de composición, y más particularmente de 10^8 a 10^{12} UFC de bacterias *Lactobacillus paracasei* por dosis o por gramo de composición. Opcionalmente, las composiciones comprenden aproximadamente 10^{10} UFC de *Lactobacillus paracasei* por dosis o por gramo de composición.

El *Lactobacillus paracasei* puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias por dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias por dosis. Por el término "por dosis" se entiende que esta cantidad de bacterias se proporciona a un sujeto por día o por ingesta, preferentemente por día. Por ejemplo, si las bacterias se van a administrar en un producto alimenticio, por ejemplo en un yogur, entonces el yogur puede contener de aproximadamente 10^6 a 10^{12} UFC de *Lactobacillus paracasei*. Alternativamente, sin embargo, esta cantidad de bacterias puede dividirse en múltiples administraciones, cada una de las cuales consiste en una cantidad inferior de carga microbiana, siempre que la cantidad total de *Lactobacillus paracasei* recibida por el sujeto en cualquier periodo de tiempo específico, por ejemplo cada periodo de 24 horas, sea de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias, opcionalmente de 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias.

De acuerdo con la presente invención, una cantidad eficaz de al menos una cepa de un *Lactobacillus paracasei* puede ser de al menos 10^6 UFC de bacterias/dosis, opcionalmente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias/dosis, por ejemplo, de aproximadamente 10^{10} UFC de bacterias/dosis.

En una forma de realización, el *Lactobacillus paracasei* (ATCC PTA-4798/DSM 32661), se puede administrar a una dosis de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias/día, opcionalmente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias/día. Por lo tanto, la cantidad eficaz en esta forma de realización puede ser de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias/día, opcionalmente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de bacterias/día.

Efectos/sujetos/indicaciones médicas

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para la administración a un mamífero, incluidos, por ejemplo, ganado (incluido el ganado vacuno, caballos, cerdos y ovejas), y seres humanos. En algunas formas de realización de la presente invención, el mamífero es un animal de compañía (incluidas mascotas), tal como un perro o un gato, por ejemplo. En formas de realización preferidas, las composiciones son para su uso en un ser humano.

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mental, un síntoma que afecta a la salud mental y/o una afección asociada con el estrés crónico, tal como por ejemplo, trastornos neurológicos, tal como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 10.

El término "enfermedad mental" puede definirse como una afección de la salud que cambia el pensamiento, las sensaciones o el comportamiento de una persona (o los tres) y que causa estrés y problemas de funcionamiento en la persona en actividades sociales, laborales o familiares. La enfermedad mental abarca un amplio abanico de trastornos relacionados con la ansiedad, el estado de ánimo, la psicosis, el comportamiento alimentario, el control de los impulsos y la adicción, la personalidad, la sociabilidad, la disociación, el estrés obsesivo-compulsivo y postraumático. Cada enfermedad altera los pensamientos, las sensaciones y/o los comportamientos de una persona de distintas maneras. Tal como se utiliza en el presente documento, la enfermedad mental también incluye trastornos neurológicos y afecciones relacionadas con la enfermedad mental que pueden ser una causa o un síntoma de una enfermedad mental o pueden ser una afección que puede aumentar la probabilidad de desarrollar una.

Los trastornos asociados con la ansiedad se clasifican bajo "enfermedad mental". El término "trastorno de ansiedad" se refiere a una enfermedad mental específica que implica miedo o preocupación extrema, e incluye trastorno de ansiedad generalizada (GAD), trastorno de pánico y ataques de pánico, agorafobia, trastorno de ansiedad social, mutismo selectivo, ansiedad por separación y fobias específicas. El trastorno obsesivo-compulsivo (OCD) y el trastorno de estrés postraumático (PTSD) están estrechamente relacionados con los trastornos de ansiedad, que algunos pueden experimentar al mismo tiempo que la depresión. El GAD representa más del nivel normal de experiencias individuales de ansiedad en el día a día y se caracteriza por preocupación crónica y tensión. Las composiciones de la invención pueden usarse para tratar y/o prevenir trastornos de ansiedad reconocidos así como síntomas de ansiedad más en general.

Tal como se utiliza en el presente documento, la enfermedad mental también incluye trastornos neurológicos asociados, incluidos trastornos de la memoria, deterioro cognitivo leve, demencia y enfermedad de Alzheimer. La cognición denota un nivel relativamente alto de procesamiento de información específica que incluye pensamiento, memoria, percepción, motivación, movimientos hábiles y lenguaje. Los trastornos cognitivos se definen como aquellos con "un deterioro significativo de la cognición o de la memoria que representa un deterioro notable de un nivel de función anterior" (Guerrero, Anthony (2008). Problem-Based Behavioural Science of Medicine. Nueva York: Springer. páginas 367-79). Pueden clasificarse en tres ámbitos principales: (1) Delirio, un trastorno que afecta a la conciencia situacional y al procesamiento de nueva información; (2) Demencia, un trastorno que puede borrar la totalidad o parte de la memoria de un individuo; y (3) Amnesia, un trastorno en el que el individuo afectado tiene problemas para retener memorias a largo plazo.

Las composiciones de la invención pueden usarse para promover, restaurar y/o mantener la salud mental de un individuo, tal como para prevenir enfermedades mentales o cualquier trastorno y/o síntoma asociado que afecte a la salud mental de un individuo.

Los síntomas que afectan a la salud mental incluyen: sensación de tristeza o desánimo, pensamiento confuso o capacidad reducida para concentrarse, miedos o preocupaciones excesivas, o sensaciones extremas de culpa, cambios extremos del estado de ánimo con altibajos, distanciamiento de amigos y actividades, alejamiento de la realidad, paranoia o alucinaciones, incapacidad para hacer frente a problemas o estrés diarios, comprensión de problemas y relación con situaciones y con personas, alcoholismo o drogadicción, cambios importantes en hábitos alimenticios, cambios de conducta sexual, ira excesiva, hostilidad o violencia y pensamientos suicidas.

Para los fines de la presente invención, la enfermedad mental y los síntomas que afectan a la salud mental también abarcan afecciones que afectan a la función cognitiva de un individuo. Tales afecciones pueden incluir, o superponerse con, diversos trastornos cognitivos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, agnosia, amnesia, demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, todos en relación con el estrés crónico, que se ha demostrado que afecta negativamente a la función cerebral.

El intenso estrés agudo y crónico puede afectar negativamente a la salud física y mental, aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades mentales. Por ejemplo, el estrés crónico se ha correlacionado con el desarrollo de trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad y depresión. Las composiciones de la invención pueden usarse para prevenir y/o tratar una enfermedad mental o síntomas que afectan a la salud mental resultantes de estrés crónico o agudo.

Más en general, las composiciones de la invención pueden usarse para la prevención y/o tratamiento de una o más de las enfermedades mentales, síntomas que afectan a la salud mental y/o afecciones asociadas con estrés agudo crónico o intenso tal como se han expuesto anteriormente.

En formas de realización particulares, las composiciones de la invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de ansiedad, depresión y/o función cognitiva disminuida.

Cuando las composiciones de la invención se usan para la prevención de una enfermedad mental o un síntoma que afecta a la salud mental, se pueden usar para mantener un nivel normal de salud mental en un individuo ya sano. Alternativamente, cuando las composiciones de la invención se usan para tratar una enfermedad mental o síntoma que afecta a la salud mental, se pueden usar para restaurar o restaurar parcialmente un nivel normal de salud mental en un individuo que padece la enfermedad mental o síntoma en cuestión.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente formas de realización y aspectos específicos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

EJEMPLO 1; Cribado inicial de cepas candidatas.

Se cribaron inicialmente múltiples candidatos probióticos para determinar las características probióticas, la seguridad y el rendimiento de fabricación. La mayor parte de estos candidatos se descartaron debido a un rendimiento deficiente. Se realizó un ensayo de eficacia sobre los candidatos restantes y a partir del mismo se seleccionaron 5 cepas para ensayos experimentales adicionales, tal como se indica en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 2: Materiales y procedimientos generales

Animales

Se usaron ratones Swiss macho, de 5 semanas de edad y que pesaban 30-35 g, de JANVIER (Saint Berthevin, Francia), y se realizaron experimentos en Amylgen (Dirección Régionale de l'Alimentar y de l'Agriculture et de la Fort du Languedoc-Roussillon). Los animales se alojaron en grupos de seis ratones con acceso a alimento y agua a voluntad, excepto durante los experimentos conductuales. Cada jaula contenía ratones de un único grupo de tratamiento. Se mantuvieron en una instalación para animales con temperatura y humedad controladas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (las luces se apagaban a las 07:00 de la tarde). Todos los procedimientos con animales se realizaron con estricto cumplimiento de la directiva de la Unión Europea del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE).

Formulación y administración de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se solubilizaron en NaCl al 0,9% y se administraron por vía oral mediante sonda nasogástrica (100 µl por ratón) a las 9:00 de la mañana cada día, lo que corresponde a una dosis de 10⁹ UFC/día

por ratón. Los ratones de vehículo recibieron NaCl al 0,9% sin cepas bacterianas. La duración del tratamiento fue de 33 días en total.

Procedimiento de estrés crónico

El procedimiento de estrés crónico se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente (Espallergues et al., Psychoneuroendocrinology, 2009). Los ratones se dispusieron repetidamente en tubos de restricción transparentes de plexiglás (12 cm de longitud, 3 cm de diámetro) con luz brillante durante un periodo de 180 min al día (11:00 de la mañana a 2:00 de la tarde), durante 5 días consecutivos por semana, durante tres semanas. Los animales del grupo de control (ratones sin estrés/vehículo) nunca se dispusieron en tubos de restricción y permanecieron sin perturbar durante el procedimiento de estrés en una habitación diferente de aquella en la que estaba teniendo lugar el estrés.

Aleatorización de los animales

En cada jaula (N=6), los animales recibieron el mismo tratamiento. Los tratamientos y el procedimiento de estrés se realizaron de manera aleatoria por un experimentador que no participaba en los experimentos conductuales y bioquímicos. Los procedimientos conductuales se realizaron por un segundo experimentador diferente.

Programa de procedimientos experimentales

- El día 01, los animales se asignaron aleatoriamente a un grupo experimental, se pesaron y se trataron con la cepa o el vehículo apropiados.
- Desde el día 01 hasta el día 33, los animales se trataron con la cepa o el vehículo apropiados.
- Desde el día 08 hasta el día 28, los animales se sometieron a estrés crónico, 3 horas al día, cinco días a la semana desde el lunes hasta el viernes, de acuerdo con el procedimiento de estrés crónico descrito anteriormente.
- El día 29, los animales realizaron el procedimiento de laberinto elevado en cruz.
- El día 30, los animales realizaron el procedimiento de campo abierto, que también fue la habituación a las tareas del día 31-32.
- Desde el día 30 al día 32, los animales realizaron la tarea de memoria de reconocimiento de objetos.
- El día 33, los animales realizaron la prueba de nado forzado.
- El día 36, los animales se sacrificaron. Se recogieron muestras de plasma sanguíneo de cada animal. Se recogieron y se pesaron las glándulas suprarrenales.

Durante el periodo de tratamiento, se comprobó la mortalidad aguda o retardada todos los días.

Mediciones de criterios de valoración

Laberinto elevado en cruz: El día 29, se midió el estado de ansiedad de los ratones evaluando su capacidad para explorar brazos abiertos y cerrados de un laberinto elevado en cruz. El aparato de plexiglás transparente consistió en dos brazos abiertos (23,5 x 8 cm) y dos brazos cerrados (23,5 x 8 x 20 cm de altura), que se extienden desde una plataforma central y se dispusieron 50 cm por encima del suelo. Cada ratón se colocó en el centro del laberinto en cruz mirando hacia un brazo cerrado y su comportamiento de exploración se registró por Ethovision® XT 9.0 (Noldus Information Technology) durante 10 min. Los resultados se expresaron como actividad locomotora, tiempo empleado en los brazos abiertos y número de entradas en brazos abiertos. El centro de gravedad del animal se consideró mediante el programa informático Ethovision® XT 9.0 para calcular la posición del animal en el laberinto elevado en cruz.

Campo abierto: El día 30, los ratones se dispusieron individualmente en un campo abierto cuadrado (50 cm x 50 cm x 50 cm de alto) fabricado de plexiglás blanco con un suelo equipado con diodos emisores de luz infrarroja. Los ratones se habituaron al campo abierto durante 10 minutos y su actividad locomotora se capturó a través de una cámara sensible a IR y se analizó mediante el programa informático Ethovision® XT 9.0 (Noldus Information Technology). El comportamiento se analizó como actividad locomotora (distancia recorrida, cm), actividad locomotora en la zona central de 25 x 25 cm definida por el programa informático, y número de estereotipias (suma del número de episodios de exploración en postura erguida y de atusamiento rostral) presentadas por los ratones.

Reconocimiento de objeto novedoso: El día 31, se colocaron dos objetos idénticos (viales de plástico de 50 ml con tapones) en posiciones definidas (posición #1 y posición #2, en dos bordes opuestos de la zona central) del campo de plexiglás de campo abierto. Cada ratón se colocó en el campo abierto y se registró la actividad exploratoria durante una sesión de 10 minutos de duración. La actividad se analizó usando el protocolo de rastreo de nariz, en términos del número de contactos con objetos y la duración de los contactos. Los resultados se expresan como porcentaje de interacciones con el objeto y porcentaje de la duración total de la interacción con el objeto en la posición #2.

El día 32, el objeto en la posición #2 se reemplazó por uno novedoso que difería en color, forma y textura del objeto familiar. Cada ratón se colocó de nuevo en el campo abierto y se registró la actividad exploratoria durante una sesión de 10 minutos de duración. La actividad se analizó de manera similar. El índice de exploración preferencial se calculó como la relación del número (o duración) de contactos con el objeto en la posición #2 con respecto al número y duración total de contactos con los dos objetos. Los animales que mostraron menos de 10 contactos con objetos durante las sesiones se descartaron del estudio.

Prueba de nado forzado: La desesperanza conductual, una medida de la susceptibilidad a la depresión, se evaluó usando la prueba de nado forzado. Cada ratón se colocó individualmente en un cilindro de vidrio (diámetro 12 cm, altura 24 cm) lleno de agua a una altura de 12 cm. La temperatura del agua se mantuvo a 22-23°C. El animal se forzó a nadar durante 6 minutos. La sesión se registró mediante una cámara CCD conectada a un ordenador y los movimientos se analizaron usando el programa informático Ethovision® XT 9.0 (Noldus Information Technology). Se analizaron dos niveles de cambios de píxel para discriminar entre inmovilidad, lucha y nado. Los análisis se realizaron min por min los últimos cinco minutos del procedimiento.

Recogida de muestras de cerebro: En el ejemplo 3 a continuación, se toman muestras de cerebro después de la eutanasia (véase más adelante). Los cerebros se recogieron y se diseccionaron sobre una placa fría. El hipocampo y la corteza frontal se dividieron en dos mitades, se diseccionaron y se congelaron en hielo seco, después se almacenaron a menos 80°C. Los niveles de BDNF se midieron en una mitad del hipocampo.

Mediciones de liberación de hormona de estrés: En muchas especies, incluyendo en roedores, la corticosterona es el principal glucocorticoide implicado en la regulación de las respuestas al estrés. En los seres humanos, el cortisol es el principal glucocorticoide. Los niveles de corticosterona en plasma de ratón se midieron con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de muestras de plasma. En el sacrificio, se recogió sangre completa en microtubos de EDTA 2 ml (ref. 061666100, Sarstedt), e inmediatamente se centrifugó a 3.000 g durante 15 min en una centrifugadora refrigerada a +4°C. El plasma se recogió cuidadosamente y se transfirió a tubos Eppendorf nuevos usando una pipeta Pasteur para constituir dos partes alícuotas de volumen equivalente. Las muestras se mantuvieron a 4°C en hielo durante la manipulación, después se almacenaron a -20°C hasta el análisis. La corticosterona en plasma se analizó con un kit colorimétrico (kit ELISA de corticosterona (CSCI), ab108821, Abcam, Francia) a partir de una muestra de 25 µl. Las muestras de plasma de ratón se diluyeron 1:200 en 1× diluyente M, y se analizaron directamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo son rutinariamente el 5% y el 7%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo es rutinariamente de 0,3 ng/ml para corticosterona. Las muestras se analizaron por duplicado. La ACTH en plasma se analizó con un kit colorimétrico (kit ACTH ELISA, ENZ-KIT 138, Enzo Life Science, Francia) en una muestra de 25 µl. Las muestras de plasma de ratón se diluyeron 1X en diluyente M 1:1, y se analizaron directamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La medición del contenido de BDNF se realizó en muestras de hipocampo. Después de descongelarlo, el tejido del hipocampo se homogeneizó en tampón Tris 50 mM-NaCl 150 mM, pH 7,5, y se sonicó durante 20 segundos. Después de la centrifugación, (16.100 g durante 15 minutos a 4°C), los sobrenadantes se usaron en un ELISA de BDNF de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, #7610). La absorbancia se leyó a 450 nm y la concentración de la muestra se calculó usando la curva patrón. Tanto ACTH como BDNF se analizaron en singletes debido al bajo volumen de muestra y, por lo tanto, los datos se analizaron para determinar los valores atípicos con el procedimiento ROUT. Se identificaron tres valores atípicos para cada resultado y se retiraron del análisis.

Peso corporal y peso suprarrenal: Para evaluar la liberación de hormona del estrés a largo plazo, las glándulas suprarrenales se diseccionaron en el momento del sacrificio y se pesaron. Los resultados se expresaron como la relación peso suprarrenal/corporal.

Análisis estadísticos: Los valores se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron usando Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.) en las diferentes condiciones dependiendo de los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk:

- Con un ANOVA unidireccional (valor F), seguido por la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunnett para comparar grupos individuales entre sí, si los datos seguían una distribución gaussiana.
-
- Con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis (H valor), seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunn si los datos no seguían una distribución gaussiana.

•
 $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 3: Estudio AM306.2 Caracterización del efecto de tres cepas seleccionadas (Lpc-37, Cepa L y Cepa B) sobre el estrés repetido en ratones

Protocolo del estudio

Se usaron sesenta ratones Swiss (30 a 35 g) en este estudio. Se constituyeron cinco grupos de animales de la forma siguiente, según la tabla 1 siguiente.

TABLA 1. Grupos de en el estudio AM306.2

	n
1. Ratones macho sin estrés/vehículo	12
2. Ratones macho estresados crónicamente/vehículo	12
3. Ratones macho estresados crónicamente/ <i>Lactobacillus paracasei</i> , Lpc-37, 10^9 UFC/día	12
4. Ratones macho estresados crónicamente/ <i>Cepa de Lactobacillus (denominada en el presente documento cepa L)</i> , 10^9 UFC/día	12
5. Ratones macho de estrés crónico/ <i>Cepa de Bifidobacterium (denominada en el presente documento cepa B)</i> , 10^9 UFC/día	12
Ratones totales	60

Los animales se asignaron aleatoriamente a un grupo experimental, se pesaron y se trataron con la cepa/vehículo apropiado de acuerdo con los procedimientos expuestos en el ejemplo 2 anterior. Desde el día 01 hasta el día 33, los animales se trataron de acuerdo con el programa de tratamiento descrito en el ejemplo 2 anterior.

Resultados y comentarios

Peso de los animales; La figura 1 muestra los efectos del estrés crónico sobre el peso corporal en ratones. El estrés crónico indujo una diferencia no significativa de peso corporal desde el día 18 al día 32 del estudio en comparación con el grupo sin estrés/tratado con vehículo. Los tratamientos individuales con las cepas bacterianas seleccionadas (Lpc-37, Cepa L o Cepa B) no mostraron ningún efecto sobre este parámetro.

Peso suprarrenal; La figura 2 muestra el efecto del estrés crónico sobre la relación peso suprarrenal/peso corporal en ratones. El estrés crónico no mostró ningún efecto significativo sobre la relación peso suprarrenal/peso corporal. El tratamiento de ratones con la cepa B aumentó significativamente la relación peso suprarrenal/peso corporal en comparación con el grupo sin estrés/vehículo. Por el contrario, el tratamiento con la cepa L redujo significativamente la relación peso suprarrenal/peso corporal en comparación con el grupo sin estrés/vehículo.

Medición de la ansiedad en el procedimiento del laberinto en cruz elevado; Los efectos del tratamiento sobre la ansiedad se ilustran en los resultados observados en el procedimiento del laberinto en cruz elevado. Tal como se observa en la figura 3, los ratones estresados mostraron un comportamiento similar a la ansiedad muy significativo, reflejado por una reducción del tiempo empleado en brazos abiertos (A). El tratamiento con Lpc-37 aliviaba muy significativamente pero parcialmente este déficit. El tratamiento de ratones con la cepa L o la cepa B fue ineficaz para aliviar este déficit. Los grupos de animales no mostraron diferencia en términos de actividad locomotora (B) o número de entradas en los brazos abiertos (C).

Ansiedad en el procedimiento de campo abierto; La figura 4 muestra los efectos de los diferentes tratamientos sobre la ansiedad inducida por estrés crónico en ratones. Tal como se muestra en la figura 4A, ni el estrés solo, ni ninguno de los tratamientos, tuvieron una influencia observable sobre la actividad locomotora. Sin embargo, el estrés crónico indujo una disminución muy significativa de la locomoción en el centro del campo; una indicación de que el estrés crónico indujo un comportamiento similar a la ansiedad (figura 4B). Además, el tratamiento con Lpc-37 aliviaba muy significativa y completamente este déficit. Otros tratamientos parecían ser ineficaces para aliviar este comportamiento similar a la ansiedad. Ni el estrés crónico solo ni ninguno de los tratamientos mostraron ninguna influencia sobre el comportamiento de exploración en postura erguida/atusamiento rostral, relacionado con la actividad estereotípica (figura 4C).

Memoria de reconocimiento en el procedimiento de reconocimiento de objeto novedoso; La figura 5 muestra los efectos de los diferentes tratamientos sobre la memoria de reconocimiento inducida por estrés crónico en ratones. Ni el estrés crónico solo, ni ninguno de los tratamientos, mostraron una influencia sobre la exploración de objetos

durante la sesión el día 2 con dos objetos idénticos, ya sea en términos de frecuencia de contacto (A) o en términos de tiempo empleado para explorar los 2 objetos (B). Sin embargo, los déficits de memoria de reconocimiento inducidos por estrés crónico durante la sesión de objeto novedoso disminuyeron la frecuencia de interacción con el objeto novedoso (C) y el tiempo de interacción con el objeto novedoso (D). El tratamiento con Lpc-37 alivió muy significativa y completamente este déficit. Otros tratamientos parecían ser ineficaces.

Prueba de nado forzado: La figura 6 muestra los efectos del estrés crónico y los diversos tratamientos sobre la desesperanza conductual inducida por estrés crónico en ratones. La prueba de nado forzado se usó para medir tres parámetros diferentes; tiempo de inmovilidad (parámetro A), tiempo de lucha (parámetro B) y tiempo de nado (parámetro C). El estrés crónico indujo un aumento de la inmovilidad en la prueba de nado forzado (figura 6A). El estrés crónico también redujo el tiempo de nado en comparación con el grupo sin estrés/vehículo (figura 6C). El tratamiento con Lpc-37 alivió muy significativamente estos efectos, dando como resultado valores de inmovilidad y tiempo de nado comparables a los del grupo sin estrés/vehículo. Otros tratamientos no parecían ser eficaces para aliviar estos efectos. En términos de tiempo de lucha, ni el estrés crónico ni ninguno de los diversos tratamientos parecían influir en este parámetro en comparación con el grupo sin estrés/vehículo (figura 6B).

Medición del contenido de corticosterona mediante ELISA: La figura 7 muestra la concentración de corticosterona en plasma sanguíneo para cada uno de los grupos de tratamiento el día 36. El estrés crónico produjo una elevación no significativa de la concentración de corticosterona en plasma en ratones después del ensayo de nado forzado, que no alcanzó significancia estadística. Los tratamientos no mostraron ningún efecto significativo sobre este parámetro en este estudio.

Conclusiones generales del estudio de AM306.2; Pueden extraerse de los resultados descritos anteriormente las siguientes conclusiones.

Déficits conductuales inducidos por estrés crónico:

- Indujeron un aumento mucho menor del peso corporal de los ratones en comparación con los ratones sin estrés, sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística
- No mostraron ningún efecto significativo sobre la relación peso suprarrenal/peso corporal en las condiciones sometidas a ensayo.
- Indujeron un estado similar a la ansiedad en ratones en la prueba de campo abierto y en la prueba del laberinto en cruz elevado.
- Mostraron un déficit de memoria de reconocimiento a largo plazo muy significativo en ratones en comparación con ratones no estresados.
- No mostraron ningún efecto significativo sobre los niveles de corticosterona en plasma sanguíneo en las condiciones sometidas a ensayo.

Tratamiento con *L. paracasei* Lpc-37:

- Muy significativamente, pero parcialmente, alivió el aumento de ansiedad inducido por el estrés crónico en la prueba del laberinto en cruz elevado.
- Muy significativa y completamente alivió el aumento de ansiedad inducido por estrés crónico en el procedimiento de campo abierto.
- Muy significativa y completamente alivió la desesperanza conductual inducida por estrés crónico en la prueba de nado forzado
- No mostró ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de corticosterona en las condiciones sometidas a ensayo.

El tratamiento con la cepa L o la cepa B no tuvo ningún efecto significativo sobre ningún parámetro de ensayo conductual o bioquímico inducido por estrés crónico.

EJEMPLO 4: Estudio AM306.5 Caracterización del efecto de tres cepas seleccionadas (Lpc-37, LP12418 y LP12407) sobre el estrés repetido en ratones

Protocolo del estudio

Se usaron setenta y dos ratones Swiss (30 a 35 g) en este estudio. Se constituyeron cinco grupos de animales de la forma siguiente, según la tabla 2 siguiente.

TABLA 2. Grupos de en el estudio AM306.5

	n	n
1. Ratones macho sin estrés/vehículo	12	6
2. Ratones macho estresados crónicamente/vehículo	12	6
3. Ratones macho estresados crónicamente/ <i>Lactobacillus paracasei</i> , Lpc-37, 10 ⁹ UFC/día	12	
4. Ratones macho estresados crónicamente/ <i>Lactobacillus plantarum</i> , LP12418, 10 ⁹ UFC/día	*	12*
5. Ratones macho estresados crónicamente/ <i>Lactobacillus plantarum</i> , LP12407, 10 ⁹ UFC/día	12	
Ratones totales	48	24
*Debido a una mortalidad inesperada en el grupo 4 causada por un comportamiento agresivo en la jaula, los 12 animales previstos se descartaron y este grupo se planificó con seis animales adicionales por grupo de control en una segunda sesión de experimentos.		

Los animales se asignaron aleatoriamente a un grupo experimental, se pesaron y se trataron con la cepa/vehículo apropiado. Desde el día 01 hasta el día 33, los animales se trataron de acuerdo con el programa de tratamiento descrito en el ejemplo 2 anterior. Además, el día 28, se tomaron muestras de sangre y se preparó plasma a partir de las muestras. Además, después de la eutanasia, se extirparon los cerebros y se diseccionaron el hipocampo y la corteza frontal y se pesaron antes de almacenarlos a -80°C (también de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 2). Se midieron los niveles de corticosterona y ACTH en el plasma el día 28. El contenido de BDNF también se midió en muestras de hipocampo después de la eutanasia de ratones.

Resultados y comentarios

Peso de los animales: La figura 8 muestra los efectos del estrés crónico sobre el peso corporal en ratones. El estrés crónico indujo un aumento significativamente inferior del peso corporal desde el día 18 hasta el día 32 del estudio en comparación con el grupo sin estrés/tratado con vehículo. Los tratamientos individuales con las cepas bacterianas seleccionadas (Lpc-37, LP12418, LP12407) no mostraron ningún efecto sobre este parámetro.

Medición de la ansiedad en el procedimiento del laberinto en cruz elevado: Los efectos del tratamiento sobre la ansiedad se ilustran en los resultados observados en el procedimiento del laberinto en cruz elevado. Tal como se observa en la figura 9, los ratones estresados mostraron un comportamiento similar a la ansiedad muy significativo, reflejado por una reducción del tiempo empleado en brazos abiertos (A). El tratamiento con las cepas Lpc-37, LP12418 o LP12407 aumentó muy significativamente pero parcialmente el tiempo empleado en brazos abiertos (aliviando parcialmente la reducción observada en ratones estresados crónicamente tratados solo con vehículo). Los grupos de animales no mostraron diferencia en términos de actividad locomotora (B) o número de entradas en los brazos abiertos (C).

Ansiedad en el procedimiento de campo abierto: La figura 10 muestra los efectos de los diferentes tratamientos sobre la ansiedad inducida por estrés crónico en ratones. Tal como se muestra en la figura 10A, ni el estrés solo, ni ninguno de los tratamientos, tuvieron una influencia observable sobre la actividad locomotora. Sin embargo, el estrés crónico indujo una disminución muy significativa de la locomoción en el centro del campo; una indicación de que el estrés crónico indujo un comportamiento similar a la ansiedad (figura 10B). Además, el tratamiento con cepas Lpc-37, LP12418 o LP12407 alivió muy significativa y completamente este déficit. El estrés crónico también indujo una disminución significativa en el tiempo empleado en la zona(s) interna(s) (D) y un tiempo significativamente reducido empleado en la zona(s) externa(s) (E). Los tratamientos con Lpc-37, LP12418 o LP12407 aliviaron estas respuestas inducidas por estrés, restableciendo los tiempos empleados en la(s) zona(s) interna(s) y externa(s) a niveles comparables al grupo sin estrés/vehículo. Ni el estrés crónico solo ni ninguno de los tratamientos mostraron ninguna influencia sobre el comportamiento de exploración en postura erguida/atusamiento rostral, relacionado con la actividad estereotípica (figura 10C).

Memoria de reconocimiento en el procedimiento de reconocimiento de objeto novedoso: La figura 11 muestra los efectos de los diferentes tratamientos sobre la memoria de reconocimiento inducida por estrés crónico en ratones. Ni el estrés crónico solo, ni ninguno de los tratamientos, mostraron una influencia en la exploración de objetos durante la sesión el día 2 con dos objetos idénticos, ya sea en términos de frecuencia de contacto (figura 11A) o en términos de tiempo empleado para explorar los 2 objetos (figura 11D). Sin embargo, los déficits de memoria de reconocimiento inducidos por estrés crónico durante la sesión de objeto novedoso disminuyendo la frecuencia de interacción con el objeto novedoso (figura 11B) y el tiempo de interacción con el objeto novedoso (figura 11E). El tratamiento con cepas Lpc-37, LP12418 o LP12407 restauraba muy significativa y completamente la frecuencia de

interacción y el tiempo de interacción, haciendo concluyente el efecto del tratamiento con estas cepas sobre el reconocimiento de objetos novedosos. Se observó el mismo perfil para el índice de discriminación (figuras 11C y 11F).

5 Prueba de nado forzado: La figura 12 muestra los efectos del estrés crónico y los diversos tratamientos sobre la desesperanza conductual inducida por estrés crónico en ratones. La prueba de nado forzado se utilizó para medir tres parámetros diferentes; tiempo de inmovilidad (parámetro A), tiempo de nado (parámetro B) y tiempo de lucha (parámetro C). El estrés crónico indujo un aumento de la inmovilidad en la prueba de nado forzado (figura 12A). El estrés crónico también redujo el tiempo de nado en comparación con el grupo sin estrés/vehículo (figura 12B). El tratamiento con cepas Lpc-37, LP12418 o LP12407 revirtió muy significativamente y completamente los efectos del estrés sobre el tiempo de inmovilidad y el tiempo de nado, dando como resultado valores de inmovilidad y tiempo de nado comparables a los del grupo sin estrés/vehículo. En términos de tiempo de lucha, ni el estrés crónico ni ninguno de los diversos tratamientos parecían influir en este parámetro en comparación con el grupo sin estrés/vehículo (figura 12C).

15 Medición bioquímica de marcadores mediante ELISA: Las figuras 13A y 13B muestran respectivamente concentraciones de corticosterona y ACTH en plasma sanguíneo para cada uno de los grupos de tratamiento. La figura 13C muestra la concentración de BDNF en el hipocampo. El estrés crónico aumentó muy significativamente la concentración de corticosterona en plasma de ratones y disminuyó significativamente la concentración de ACTH. También se observó un aumento no significativo en la concentración de BDNF en ratones estresados crónicamente. Los ratones tratados con Lpc-37 no mostraron un aumento en la concentración de corticosterona en sangre similar a la del grupo estresado crónicamente, aunque no diferían significativamente de los ratones de vehículo no estresados o de vehículo estresados crónicamente. Sin embargo, el tratamiento con Lpc-37 no parecía afectar a la concentración de ACTH. El tratamiento con LP12418 no mostró ningún efecto sobre la concentración de corticosterona, pero aumentó muy significativamente la concentración de ACTH en comparación con el grupo de estrés crónico/vehículo, restableciendo las concentraciones de ACTH a un nivel comparable con el grupo sin estrés/vehículo. El tratamiento con LP12407 no mostró diferencia en la concentración de corticosterona o ACTH en comparación con los ratones estresados crónicamente. La concentración de BDNF fue similar en ratones con vehículo no estresados y en todos los ratones estresados crónicamente tratados con probióticos. A pesar de la concentración media aparentemente más alta de BDNF en los ratones vehículo estresados crónicamente, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Conclusiones generales del estudio de AM306.5

- Conclusiones generales del estudio de AM306.2; Las siguientes conclusiones pueden extraerse de los resultados descritos anteriormente.
- Déficits conductuales inducidos por estrés crónico:
- Indujeron una disminución parcial del peso corporal en comparación con ratones no estresados
- Indujeron un estado similar a la ansiedad en ratones en la prueba de campo abierto y en la prueba del laberinto en cruz elevado.
- Mostraron un déficit de memoria de reconocimiento a largo plazo muy significativo en ratones en comparación con ratones no estresados.
- Mostraron un estado de tipo depresivo significativo observado por desesperanza conductual en el paradigma de prueba de nado forzado
- La concentración de corticosterona en plasma sanguíneo aumentó significativamente.
- Tratamiento con *L. paracasei* Lpc-37, *L. plantarum* LP12418 o *L. plantarum* LP12407:
- No tuvo efecto sobre la pérdida de peso corporal en comparación con ratones estresados crónicamente
- Muy significativa y completamente alivió el estado similar a la ansiedad en ratones en la prueba del laberinto en cruz elevado.
- Muy significativa y completamente alivió el estado similar a la ansiedad en ratones en el procedimiento de campo abierto.
- Muy significativa y completamente alivió el déficit de memoria de reconocimiento a largo plazo en ratones en comparación con ratones estresados crónicamente.

5

- Muy significativa y completamente alivió el comportamiento similar a la depresión observado por una desesperanza conductual en el paradigma de la prueba de nado forzado, en comparación con el grupo sometido a estrés crónico tratado con vehículo solo.
- Mostró un efecto diferencial sobre las concentraciones de corticosterona, ACTH y BDNF.

¡SOLO PARA FINES DE DEPÓSITO DE PATENTE!
¡No para depósito de seguridad o depósito público!



**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

DECLARACIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Según la norma 6.1

A
LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG
VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Innertienstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

A rellenar por la autoridad depositaria

Número de registro DSMZ:

Fecha de recepción del cultivo:

BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS¹

EL ABAJO FIRMANTE DEPOSITA POR LA PRESENTE SEGÚN EL TRATADO DE BUDAPEST EL MICROORGANISMO IDENTIFICADO A CONTINUACIÓN Y SE COMPROMETE A NO RETIRAR EL DEPÓSITO DURANTE EL PERÍODO ESPECIFICADO EN LA NORMA 9.1²

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO³	
Referencia identificativa ³ : DGCC4981 (Lpc-37)	El cultivo que va a depositarse es:
	(x) un cultivo puro
Designación taxonómica ⁴ : Lactobacillus paracasei ssp paracasei	() una mezcla de microorganismos (no más de dos componentes)
II. CONDICIONES PARA EL CULTIVO () ⁵	
Medio: Caldo MRS	pH antes de la esterilización: 6,40 Esterilización 15 min a 121 °C pH después de la esterilización: 6,20 Relación de oxígeno: () aerobia (x) microaerófila () anaerobia obligada Requisitos gaseosos específicos Temperatura de incubación: 37 °C Tiempo de incubación: 18 h Almacenamiento a corto plazo a: -18 °C Intervalo de transferencia: 5 años

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

² Este formulario también puede usarse si el abajo firmante convierte en un depósito según el TRATADO DE BUDAPEST el depósito de un microorganismo que él o su antecesor en el puesto ya haya depositado, fuera del Tratado de Budapest, en la misma institución depositaria o bien antes (norma 6.4(c)) o bien después de la adquisición por parte de la institución del estatus de autoridad depositaria internacional.

³ Números, símbolos, etc., dados al microorganismo por el depositante.

⁴ Se recomienda encarecidamente indicar la designación taxonómica y/o la descripción científica (véase en VIII.) del microorganismo.

⁵ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

III. CONDICIONES PARA ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO	() ⁶
propagar en caldo MRS de 17 a 18 h hasta crecimiento visible; diluir 1:1 con medio nuevo añadir el 10% de glicerol; congelar y almacenar a -80 °C, preferentemente en nitrógeno líquido	
IV. CONDICIONES PARA ENSAYO DE VIABILIDAD	() ⁶
determinar el número de recuento de células en MRS agar (3 días a 37 °C): > 1x10E8 ufc/ml	
V. COMPONENTES DE CULTIVOS MIXTOS (SI PROCEDE)	() ⁶
Descripción de los componentes: (no más de dos componentes)	
Procedimiento(s) para verificar la presencia de componentes:	
VI. PROPIEDADES PELIGROSAS PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE	() ⁶
GRUPO DE RIESGO de los microorganismos ¹ : ☒ grupo de riesgo 1 ☐ grupo de riesgo 2	
CLASIFICACIÓN en caso de que el microorganismo esté modificado genéticamente ¹ : ☐ Clase 1/S1 ☐ Clase 2/S2	
LA CEPA DEBE MANIPULARSE A NIVEL DE CONTENCIÓN DE LABORATORIO ¹ : ☒ L1 ☐ L2	
¿ES ESTA CEPA PELIGROSA PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE? ☐ SÍ ☒ NO	
En caso afirmativo, especifique:	
☒ el abajo firmante no tiene conocimiento de tales propiedades	

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

⁶ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

VII. SI EL MICROORGANISMO ESTÁ GENÉTICAMENTE MANIPULADO ()^s ¡Dé respuestas absolutamente completas!		
1. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO HUÉSPED denominación: grupo de riesgo ¹ : () grupo de riesgo 1 () grupo de riesgo 2 sensibilidades: resistencias: auxotrofias propiedades especiales: (por ejemplo, sistema de restricción/modificación recombinación genética general)		
2. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO DONANTE denominación: grupo de riesgo ¹ : () grupo de riesgo 1 () grupo de riesgo 2 () grupo de riesgo 3 descripción del fragmento de ADN clonado: información del clonado: tamaño del ADN clonado (en pb): () genoma completo () ADNc () subgenómico () subgénico () sintético riesgos potenciales del ADN clonado: () sin riesgos potenciales () patogénicos () tumorigénicos () toxigénicos () alérgicos		
3. DATOS CORRESPONDIENTES AL VECTOR denominación: derivado de: especificidad del huésped: resistencias: tamaño del plásmido (en kb): sin inserto: con inserto: promotores: marcos de lectura adicionales: es infeccioso: () sí () no plásmido móvil: () sí () no sistema de transferencia propio: () sí () no transferencia por virus endógenos: () sí () no		
4. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MANIPULADO propiedades especiales: (por ejemplo, producción de...; utilizado como..., vector, etc.) ADN extraño: () integrado cromosómicamente () episómico riesgos potenciales del ADN clonado: () patogénicos () tumorigénicos () toxigénicos () alérgicos () sin riesgos potenciales indicar por qué: Según las regulaciones de la <u>Ley alemana de regulación de ingeniería genética</u> , la DSMZ solo puede aceptar organismos potencialmente patógenos genéticamente manipulados para el depósito cuando se presenta adjunta al formulario de depósito una copia del permiso expedido por la autoridad competente (o por una comisión de seguridad biológica nacional equivalentemente) para trabajar en los organismos.		

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

^s Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

VIII. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA⁶		()⁵
IX. DATOS ADICIONALES⁷		()⁸
X. DESTINO DEL CULTIVO DESPUÉS DE LA DURACION DEL ALMACENAMIENTO PRESCRITA⁹		
a) El cultivo se transferirá a la colección disponible públicamente de la DSMZ	☐ sí	☐ no
b) El cultivo se devolverá al depositante previo pago	☒ sí	☐ no
c) El cultivo se destruirá por la DSMZ	☐ sí	☐ no
XI. DEPOSITANTE¹⁰		
Institución/entidad legal: DuPont Nutrition Biosciences ApS Langebrogade 1; P.O. Box 17 DK- 1001 Copenhagen K		
Nombre de la(s) persona(s) firmante(s) (mecanografiado): Richard Pitman		
La(s) persona(s) firmante(s) deposita(n): ☐ en representación de la entidad legal ☐ como depositante(s) privado(s)		
Dirección:	Richard Pitman DuPont Nutrition Biosciences ApS Langebrogade 1; P.O. Box 17 DK- 1001 Copenhagen K	
	Firma(s)	
Teléfono:	+45 32662624	
Fax:		
Correo electrónico:	richard.pitman@dupont.com	
	Fecha:	

⁵ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

⁶ Se recomienda indicar la descripción científica y/o la designación taxonómica propuesta (véase I.) del microorganismo.

⁷ Si se desea se pueden registrar en este apartado el nombre y la dirección de los inventores.

⁸ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta, tal como la fuente de los microorganismos, el nombre y la dirección de cualquier otra institución depositaria en la que se han depositado los microorganismos, o el criterio usado en la elaboración de la designación taxonómica propuesta (el suministro de esta información es opcional).

⁹ El cultivo se almacenará durante un periodo de al menos cinco años después de la petición más reciente de entrega de la muestra del organismo depositado y, en cualquier caso, durante al menos 30 años después de la fecha de depósito (norma 9.1 del TRATADO DE BUDAPEST). La regulación anterior es válida hasta que haya alguna jurisdicción vinculante.

¹⁰ Este formulario de depósito es el contrato entre el depositario y el depositante. Por lo tanto, debe firmarse por el depositante. En caso de ser una entidad legal, se recomiendan las firmas de dos representantes nominados oficialmente por dicha entidad. A menos que se acuerde lo contrario, el abajo firmante es el corresponsal de la DSMZ. La indicación de una dirección de correo electrónico ayuda a acelerar la comunicación.

¡SOLO PARA FINES DE DEPÓSITO DE PATENTE!
¡No para depósito de seguridad o depósito público!



**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

DECLARACIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Según la norma 6.1

A
LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG
VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Innertienstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

A rellenar por la autoridad depositaria

Número de registro DSMZ:

Fecha de recepción del cultivo:

BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS¹

EL ABAJO FIRMANTE DEPOSITA POR LA PRESENTE SEGÚN EL TRATADO DE BUDAPEST EL MICROORGANISMO IDENTIFICADO A CONTINUACIÓN Y SE COMPROMETE A NO RETIRAR EL DEPÓSITO DURANTE EL PERÍODO ESPECIFICADO EN LA NORMA 9.1²

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO³	
Referencia identificativa ³ : DGCC12407	El cultivo que va a depositarse es:
	(x) un cultivo puro
Designación taxonómica ⁴ : Lactobacillus plantarum	() una mezcla de microorganismos (no más de dos componentes)
II. CONDICIONES PARA EL CULTIVO () ⁵	
Medio: Caldo MRS	pH antes de la esterilización: 6,40 Esterilización 15 min a 121 °C pH después de la esterilización: 6,20 Relación de oxígeno: () aerobia (x) microaerófila () anaerobia obligada Requisitos gaseosos específicos
	Temperatura de incubación: 37 °C Tiempo de incubación: 18 Almacenamiento a corto plazo a: -20 °C Intervalo de transferencia: 5 años

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

² Este formulario también puede usarse si el abajo firmante convierte en un depósito según el TRATADO DE BUDAPEST el depósito de un microorganismo que él o su antecesor en el puesto ya haya depositado, fuera del Tratado de Budapest, en la misma institución depositaria o bien antes (norma 6.4(c)) o bien después de la adquisición por parte de la institución del estatus de autoridad depositaria internacional.

³ Números, símbolos, etc., dados al microorganismo por el depositante.

⁴ Se recomienda encarecidamente indicar la designación taxonómica y/o la descripción científica (véase en VIII.) del microorganismo.

⁵ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

III. CONDICIONES PARA ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO	() ⁶
propagar en caldo MRS de 17 a 18 h hasta crecimiento visible; diluir 1:1 con medio nuevo añadir el 10% de glicerol; congelar y almacenar a -80 °C, preferentemente en nitrógeno líquido	
IV. CONDICIONES PARA ENSAYO DE VIABILIDAD	() ⁶
determinar el número de recuento de células en MRS agar (3 días a 37 °C): > 1x10E8 ufc/ml	
V. COMPONENTES DE CULTIVOS MIXTOS (SI PROCEDE)	() ⁶
Descripción de los componentes: (no más de dos componentes)	
Procedimiento(s) para verificar la presencia de componentes:	
VI. PROPIEDADES PELIGROSAS PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE	
GRUPO DE RIESGO de los microorganismos ¹ :	
(x) grupo de riesgo 1 () grupo de riesgo 2	
CLASIFICACIÓN en caso de que el microorganismo esté modificado genéticamente ¹ :	
() Clase 1/S1 () Clase 2/S2	
LA CEPA DEBE MANIPULARSE A NIVEL DE CONTENCIÓN DE LABORATORIO ¹ :	
(x) L1 () L2	
¿ES ESTA CEPA PELIGROSA PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE?	
() SÍ (x) NO	
En caso afirmativo, especifique:	
(x) el abajo firmante no tiene conocimiento de tales propiedades	

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

⁶ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

VII. SI EL MICROORGANISMO ESTÁ GENÉTICAMENTE MANIPULADO ()*			
¡Dé respuestas absolutamente completas!			
1. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO HUÉSPED			
denominación:			
grupo de riesgo ¹ :	☐ grupo de riesgo 1	☐ grupo de riesgo 2	
sensibilidades:			
resistencias:			
auxotrofías			
propiedades especiales:			
(por ejemplo, sistema de restricción/modificación recombinación genética general)			
2. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO DONANTE			
denominación:			
grupo de riesgo ¹ :	☐ grupo de riesgo 1	☐ grupo de riesgo 2	☐ grupo de riesgo 3
descripción del fragmento de ADN clonado:			
información del clonado:			
tamaño del ADN clonado (en pb):	☐ genoma completo	☐ ADNc	
	☐ subgenómico	☐ subgénico	☐ sintético
riesgos potenciales del ADN clonado:			
☐ sin riesgos potenciales	☐ patogénicos	☐ tumorigénicos	
	☐ toxigénicos	☐ alergénicos	
3. DATOS CORRESPONDIENTES AL VECTOR			
denominación:			
derivado de:			
especificidad del huésped:			
resistencias:			
tamaño del plásmido (en kb):	sin inserto:	con inserto:	
promotores:			
marcos de lectura adicionales:			
es infeccioso:	☐ sí	☐ no	
plásmido movilizable:	☐ sí	☐ no	
sistema de transferencia propio:	☐ sí	☐ no	
transferencia por virus endógenos:	☐ sí	☐ no	
4. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MANIPULADO			
propiedades especiales:			
(por ejemplo, producción de...; utilizado como...; vector, etc.)			
ADN extraño:	☐ integrado cromosómicamente		☐ episómico
riesgos potenciales del ADN clonado:			
	☐ patogénicos	☐ tumorigénicos	
	☐ toxigénicos	☐ alergénicos	
☐ sin riesgos potenciales			
indicar por qué:			
Según las regulaciones de la Ley alemana de regulación de ingeniería genética, la DSMZ solo puede aceptar organismos potencialmente patógenos genéticamente manipulados para el depósito cuando se presenta adjunta al formulario de depósito una copia del permiso expedido por la autoridad competente (o por una comisión de seguridad biológica nacional equivalente) para trabajar en los organismos.			

* La CSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

^S Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

VIII. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA⁶		()⁵
IX. DATOS ADICIONALES⁷		()⁸
X. DESTINO DEL CULTIVO DESPUÉS DE LA DURACION DEL ALMACENAMIENTO PRESCRITA⁹		
a) El cultivo se transferirá a la colección disponible públicamente de la DSMZ	☐ sí	☐ no
b) El cultivo se devolverá al depositante previo pago	☒ sí	☐ no
c) El cultivo se destruirá por la DSMZ	☐ sí	☐ no
XI. DEPOSITANTE¹⁰		
Institución/entidad legal: DuPont Nutrition Biosciences ApS Langebrogade 1; P.O. Box 17 DK- 1001 Copenhagen K		
Nombre de la(s) persona(s) firmante(s) (mecanografiado): Richard Pitman		
La(s) persona(s) firmante(s) deposita(n): ☐ en representación de la entidad legal ☐ como depositante(s) privado(s)		
Dirección:	Richard Pitman DuPont Nutrition Biosciences ApS Langebrogade 1; P.O. Box 17 DK- 1001 Copenhagen K	
	Firma(s)	
Teléfono:	+45 32662624	
Fax:		
Correo electrónico:	richard.pitman@dupont.com	
	Fecha:	

⁵ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

⁶ Se recomienda indicar la descripción científica y/o la designación taxonómica propuesta (véase I.) del microorganismo.

⁷ Si se desea se pueden registrar en este apartado el nombre y la dirección de los inventores.

⁸ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta, tal como la fuente de los microorganismos, el nombre y la dirección de cualquier otra institución depositaria en la que se han depositado los microorganismos, o el criterio usado en la elaboración de la designación taxonómica propuesta (el suministro de esta información es opcional).

⁹ El cultivo se almacenará durante un periodo de al menos cinco años después de la petición más reciente de entrega de la muestra del organismo depositado y, en cualquier caso, durante al menos 30 años después de la fecha de depósito (norma 9.1 del TRATADO DE BUDAPEST). La regulación anterior es válida hasta que haya alguna jurisdicción vinculante.

¹⁰ Este formulario de depósito es el contrato entre el depositario y el depositante. Por lo tanto, debe firmarse por el depositante. En caso de ser una entidad legal, se recomiendan las firmas de dos representantes nominados oficialmente por dicha entidad. A menos que se acuerde lo contrario, el abajo firmante es el corresponsal de la DSMZ. La indicación de una dirección de correo electrónico ayuda a acelerar la comunicación.

¡SOLO PARA FINES DE DEPÓSITO DE PATENTE!
¡No para depósito de seguridad o depósito público!



**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

DECLARACIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Según la norma 6.1

A
LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG
VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Innertienstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

A rellenar por la autoridad depositaria

Número de registro DSMZ:

Fecha de recepción del cultivo:

BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS¹

EL ABAJO FIRMANTE DEPOSITA POR LA PRESENTE SEGÚN EL TRATADO DE BUDAPEST EL MICROORGANISMO IDENTIFICADO A CONTINUACIÓN Y SE COMPROMETE A NO RETIRAR EL DEPÓSITO DURANTE EL PERÍODO ESPECIFICADO EN LA NORMA 9.1²

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO³	
Referencia identificativa ³ : DGCC12418	El cultivo que va a depositarse es:
	(x) un cultivo puro
Designación taxonómica ⁴ : Lactobacillus plantarum	() una mezcla de microorganismos (no más de dos componentes)
II. CONDICIONES PARA EL CULTIVO () ⁵	
Medio: Caldo MRS	pH antes de la esterilización: 6,40 Esterilización 15 min a 121 °C pH después de la esterilización: 6,20 Relación de oxígeno: () aerobia (x) microaerófila () anaerobia obligada Requisitos gaseosos específicos
	Temperatura de incubación: 37 °C Tiempo de incubación: 18 Almacenamiento a corto plazo a: -20 °C Intervalo de transferencia: 5 años

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

² Este formulario también puede usarse si el abajo firmante convierte en un depósito según el TRATADO DE BUDAPEST el depósito de un microorganismo que él o su antecesor en el puesto ya haya depositado, fuera del Tratado de Budapest, en la misma institución depositaria o bien antes (norma 6.4(c)) o bien después de la adquisición por parte de la institución del estatus de autoridad depositaria internacional.

³ Números, símbolos, etc., dados al microorganismo por el depositante.

⁴ Se recomienda encarecidamente indicar la designación taxonómica y/o la descripción científica (véase en VIII.) del microorganismo.

⁵ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

III. CONDICIONES PARA ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO	() ⁶
propagar en caldo MRS de 17 a 18 h hasta crecimiento visible; diluir 1:1 con medio nuevo añadir el 10% de glicerol; congelar y almacenar a -80 °C, preferentemente en nitrógeno líquido	
IV. CONDICIONES PARA ENSAYO DE VIABILIDAD	() ⁶
determinar el número de recuento de células en MRS agar (3 días a 37 °C): > 1x10E8 ufc/ml	
V. COMPONENTES DE CULTIVOS MIXTOS (SI PROCEDE)	() ⁶
Descripción de los componentes: (no más de dos componentes)	
Procedimiento(s) para verificar la presencia de componentes:	
VI. PROPIEDADES PELIGROSAS PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE	
GRUPO DE RIESGO de los microorganismos¹: (x) grupo de riesgo 1 () grupo de riesgo 2 CLASIFICACIÓN en caso de que el microorganismo esté modificado genéticamente¹: () Clase 1/S1 () Clase 2/S2 LA CEPA DEBE MANIPULARSE A NIVEL DE CONTENCIÓN DE LABORATORIO¹: (x) L1 () L2 ¿ES ESTA CEPA PELIGROSA PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE? () SÍ (x) NO En caso afirmativo, especifique: (x) el abajo firmante no tiene conocimiento de tales propiedades	

¹ La DSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

⁶ Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

VII. SI EL MICROORGANISMO ESTÁ GENÉTICAMENTE MANIPULADO ¡Dé respuestas absolutamente completas!			
1. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO HUÉSPED			
denominación:			
grupo de riesgo ¹ :	☐ grupo de riesgo 1	☐ grupo de riesgo 2	
sensibilidades:			
resistencias:			
auxotrofías			
propiedades especiales:			
(por ejemplo, sistema de restricción/modificación)			
recombinación genética general)			
2. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO DONANTE			
denominación:			
grupo de riesgo ¹ :	☐ grupo de riesgo 1	☐ grupo de riesgo 2	☐ grupo de riesgo 3
descripción del fragmento de ADN clonado:			
información del clonado:			
tamaño del ADN clonado (en pb):	☐ genoma completo	☐ ADNc	
	☐ subgenómico	☐ subgénico	☐ sintético
riesgos potenciales del ADN clonado:			
☐ sin riesgos potenciales	☐ patogénicos	☐ tumorigénicos	
	☐ toxigénicos	☐ alergénicos	
3. DATOS CORRESPONDIENTES AL VECTOR			
denominación:			
derivado de:			
especificidad del huésped:			
resistencias:			
tamaño del plásmido (en kb):	sin inserto:	con inserto:	
promotores:			
marcos de lectura adicionales:			
es infeccioso:	☐ sí	☐ no	Lorem Ipsum
plásmido movilizable:	☐ sí	☐ no	
sistema de transferencia propio:	☐ sí	☐ no	
transferencia por virus endógenos:	☐ sí	☐ no	
4. DATOS CORRESPONDIENTES AL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MANIPULADO			
propiedades especiales:			
(por ejemplo, producción de..., utilizado como..., vector, etc.)			
ADN extraño:	☐ integrado cromosómicamente ☐ episómico		
riesgos potenciales del ADN clonado:			
	☐ patogénicos	☐ tumorigénicos	
	☐ toxigénicos	☐ alergénicos	
☐ sin riesgos potenciales			
indicar por qué:			
Según las regulaciones de la Ley alemana de regulación de ingeniería genética, la DSMZ solo puede aceptar organismos potencialmente patógenos genéticamente manipulados para el depósito cuando se presenta adjunta al formulario de depósito una copia del permiso expedido por la autoridad competente (o por una comisión de seguridad biológica nacional equivalente) para trabajar en los organismos.			

La CSMZ solo acepta para su depósito microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo 1 o 2 según la Directiva del consejo de la UE 2000/54 sobre la protección de trabajadores frente a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo y pueden clasificarse como organismos S1 o S2 según la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o la clase 1 o 2 según la Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y del consejo sobre el uso confinado de microorganismos modificados genéticamente, respectivamente.

^S Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

4 Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta.

5 Se recomienda indicar la descripción científica y/o la designación taxonómica propuesta (véase i.) del microorganismo.

6 Si se desea se pueden registrar en este apartado el nombre y la dirección de los inventores.

7 Marque con una cruz si se facilita información adicional en una hoja adjunta, tal como la fuente de los microorganismos, el nombre y la dirección de cualquier otra institución depositaria en la que se han depositado los microorganismos, o el criterio usado en la elaboración de la designación taxonómica propuesta (el suministro de esta información es opcional).

8 El cultivo se almacenará durante un periodo de al menos cinco años después de la petición más reciente de entrega de la muestra del organismo depositado y, en cualquier caso, durante al menos 30 años después de la fecha de depósito (norma 9.1 del TRATADO DE BUDAPEST). La regulación anterior es válida hasta que haya alguna jurisdicción vinculante.

9 Este formulario de depósito es el contrato entre el depositario y el depositante. Por lo tanto, debe firmarse por el depositante. En caso de ser una entidad legal, se recomiendan las firmas de dos representantes nominados oficialmente por dicha entidad. A menos que se acuerde lo contrario, el abajo firmante es el correspondiente de la DSMZ. La indicación de una dirección de correo electrónico ayuda a acelerar la comunicación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, tal como cambios de estado de ánimo, un trastorno de ansiedad, depresión y/o pérdida de memoria o función cognitiva disminuida, estando cada trastorno o afección asociado con estrés crónico, en un mamífero, en el que la bacteria de la especie *Lactobacillus paracasei* es la cepa Lpc-37 registrada en la DSMZ con el número de depósito DSM 32661.
- 10 2. Una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, tal como cambios de estado de ánimo, un trastorno de ansiedad, depresión y/o pérdida de memoria o función cognitiva disminuida, estando cada trastorno o afección asociado con estrés crónico, en un mamífero, en el que el *Lactobacillus paracasei* es la cepa Lpc-37 registrada en la DSMZ con el número de depósito DSM 32661.
- 15 3. La composición para su uso según la reivindicación 2, en la que la composición consiste esencialmente en una única cepa de *Lactobacillus paracasei*.
- 20 4. La composición para su uso según la reivindicación 2, en la que la composición comprende además *Lactobacillus plantarum*.
- 5 5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la composición se encuentra en forma de un producto alimenticio, un complemento dietético o una composición farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la composición es una composición secada por pulverización o liofilizada.
7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que la composición comprende un crioprotector.
- 30 8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que el *Lactobacillus paracasei* está presente en la composición en una cantidad comprendida entre 10^6 y 10^{12} , por ejemplo entre 10^8 y 10^{12} UFC por dosis, opcionalmente 10^{10} UFC por dosis.
- 35 9. La composición para su uso según la reivindicación 4, en la que el *Lactobacillus plantarum* es la cepa LP12418 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ como DSM 32655, o la cepa LP12407 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ como DSM 32654.
- 40 10. Una combinación de la cepa Lpc-37 de *Lactobacillus paracasei*, registrada en la DSMZ con el número de depósito DSM 32661, y al menos otra cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en la cepa LP12418 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ como DSM 32655, y la cepa LP12407 de *Lactobacillus plantarum*, depositada en la DSMZ como DSM 32654, para su uso por separado, secuencial o simultáneo en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, tal como cambios de estado de ánimo, un trastorno de ansiedad, depresión y/o pérdida de memoria o función cognitiva disminuida, estando cada trastorno o afección asociado con estrés crónico.
- 45

Figura 1

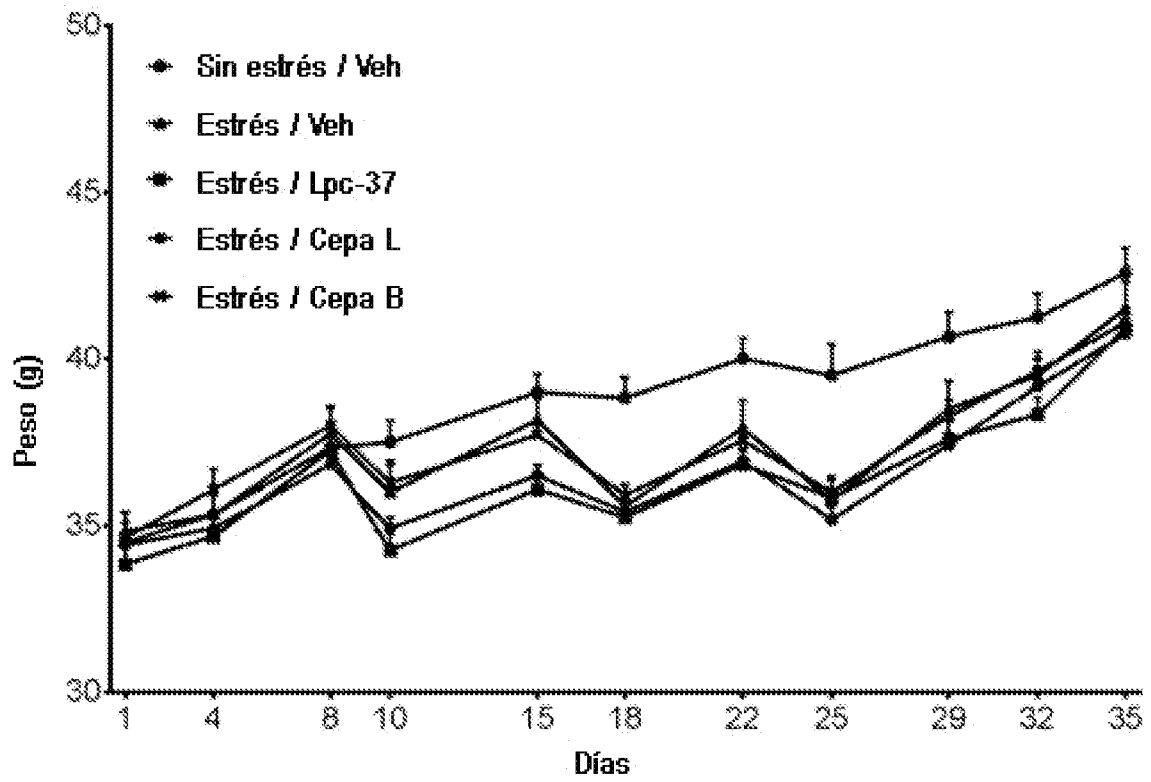


Figura 2

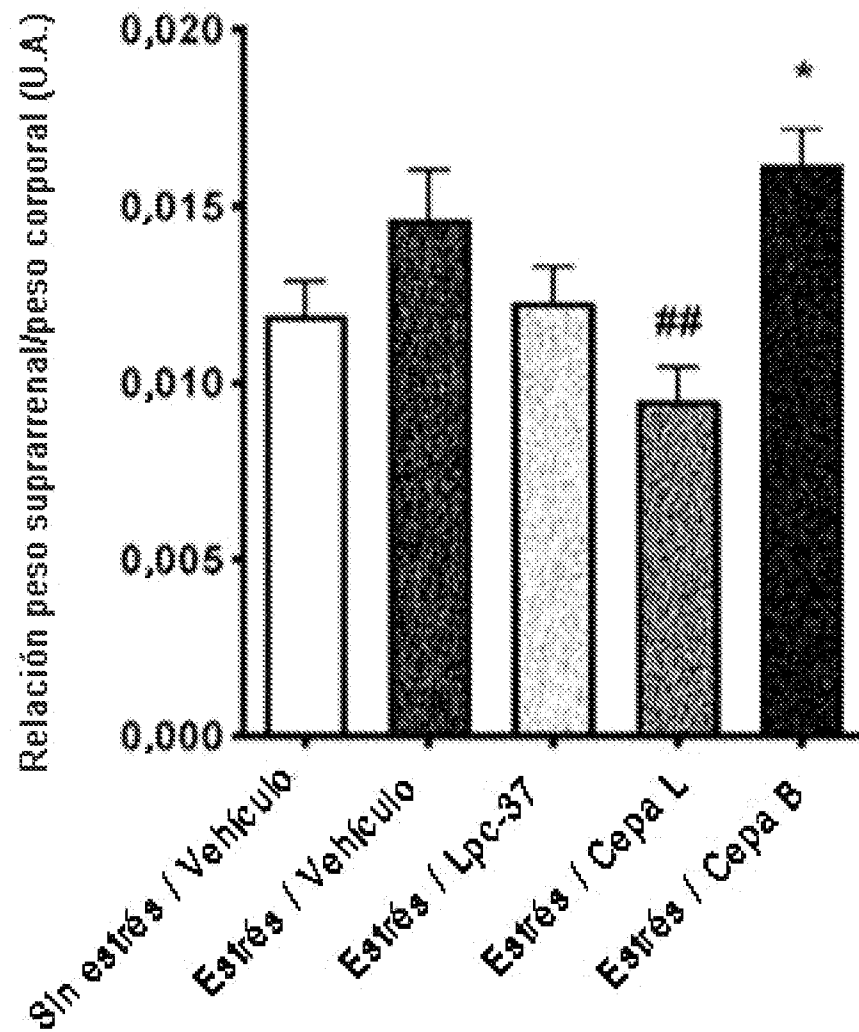


Figura 3

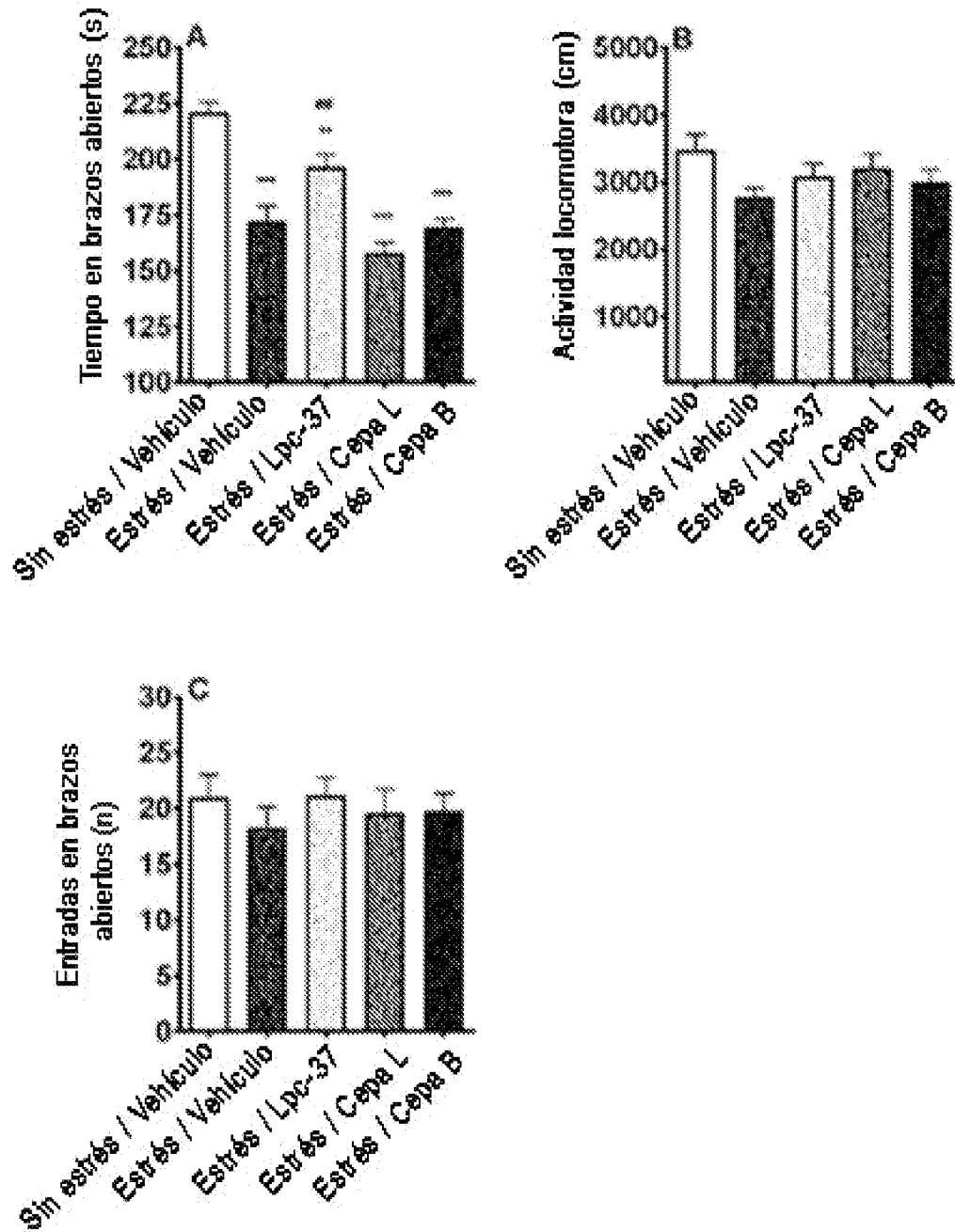


Figura 4

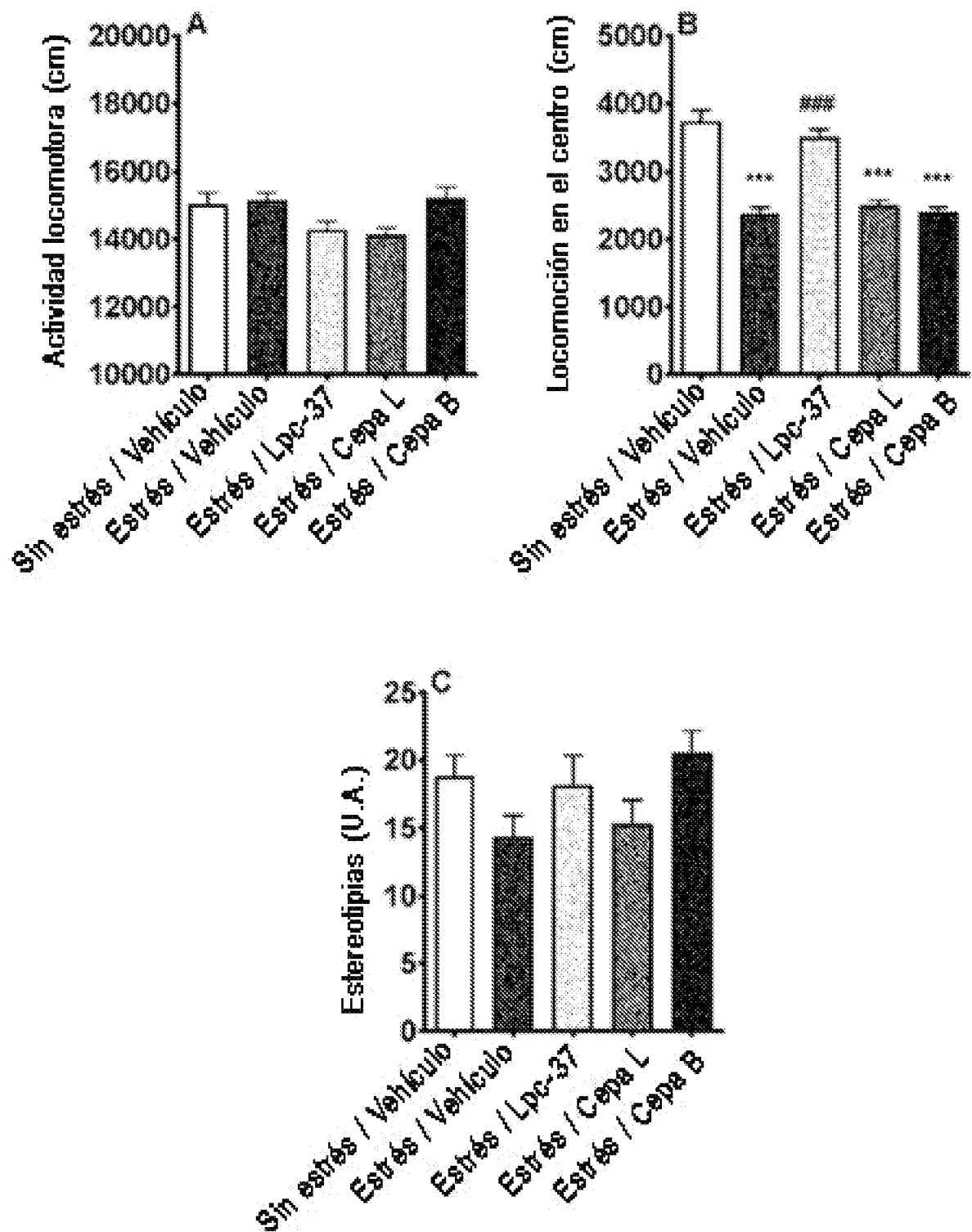


Figura 5

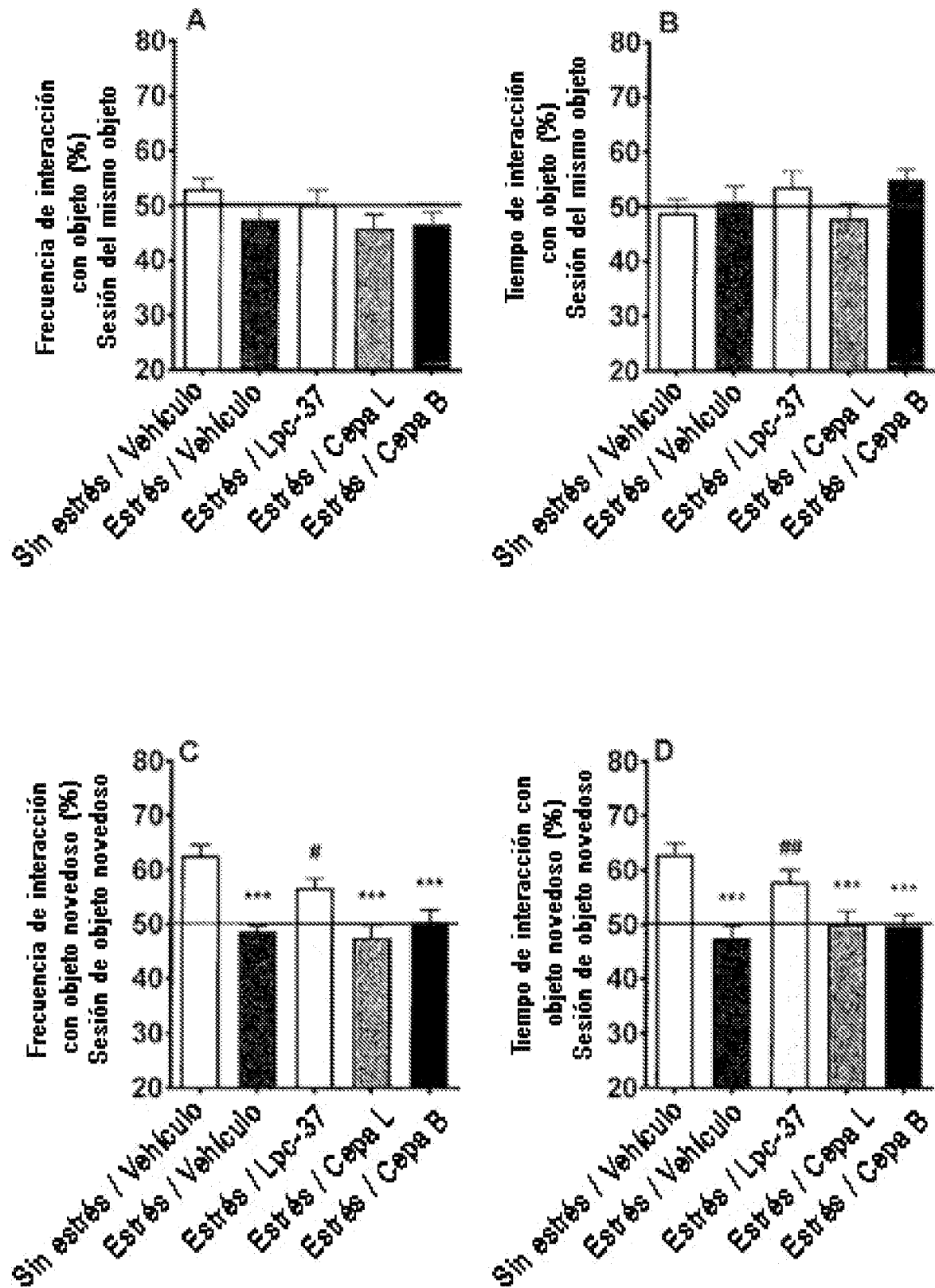


Figura 6

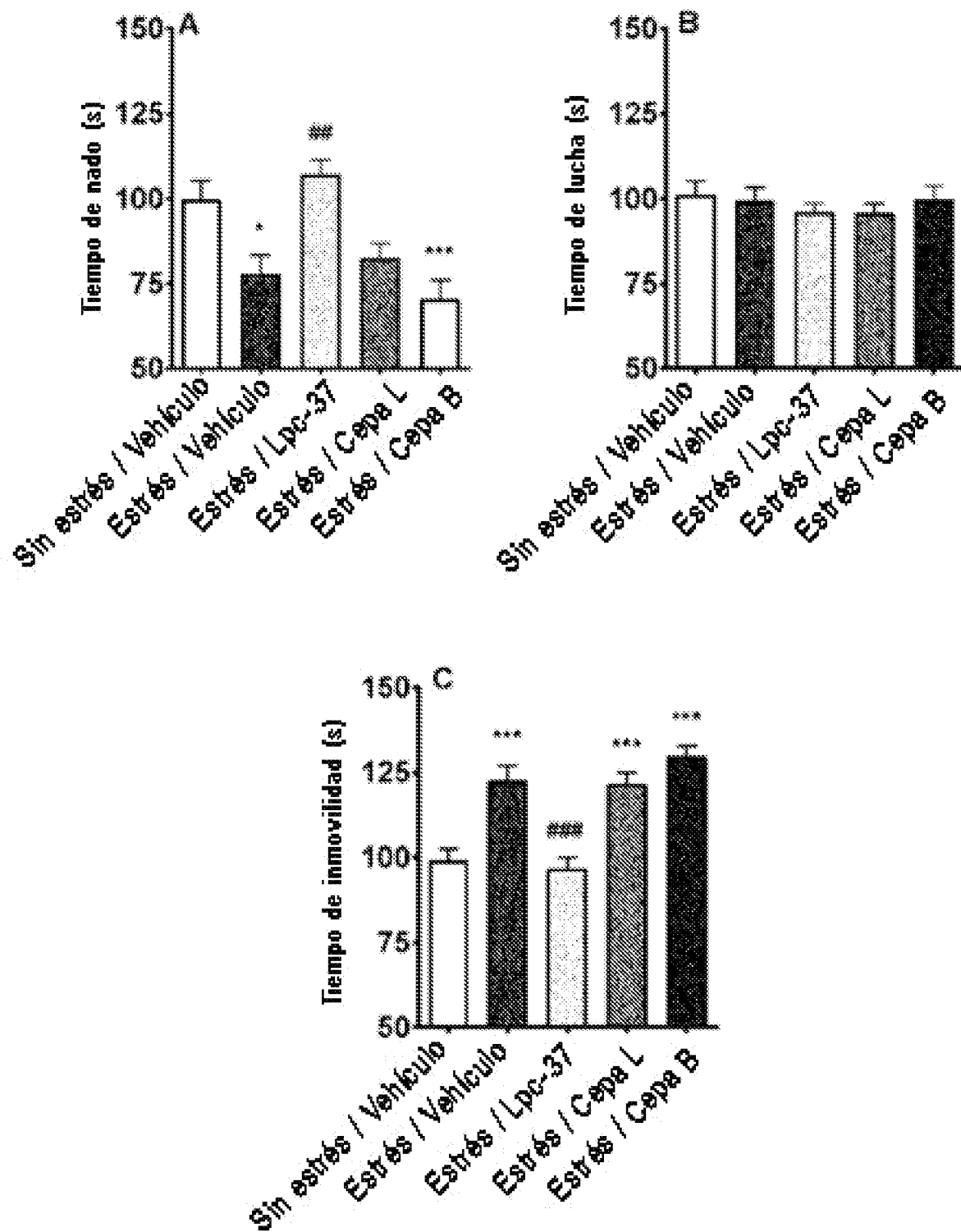


Figura 7

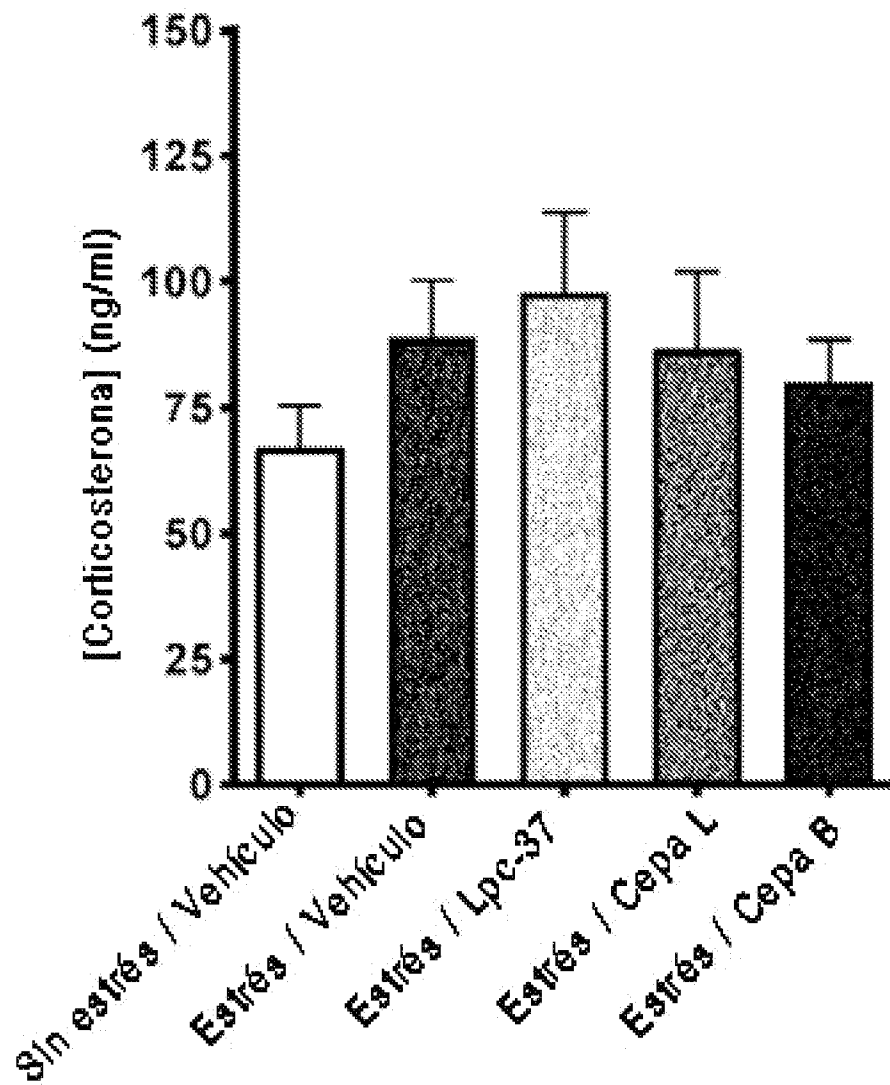


Figura 8

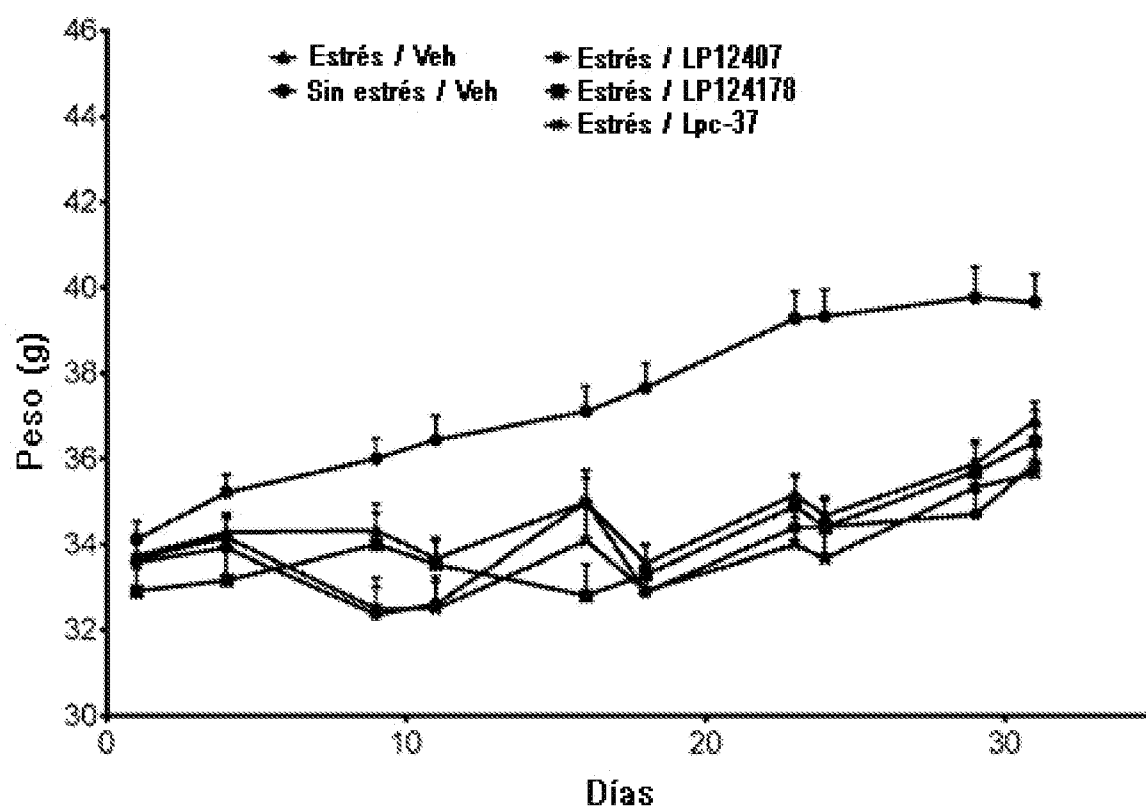


Figura 9

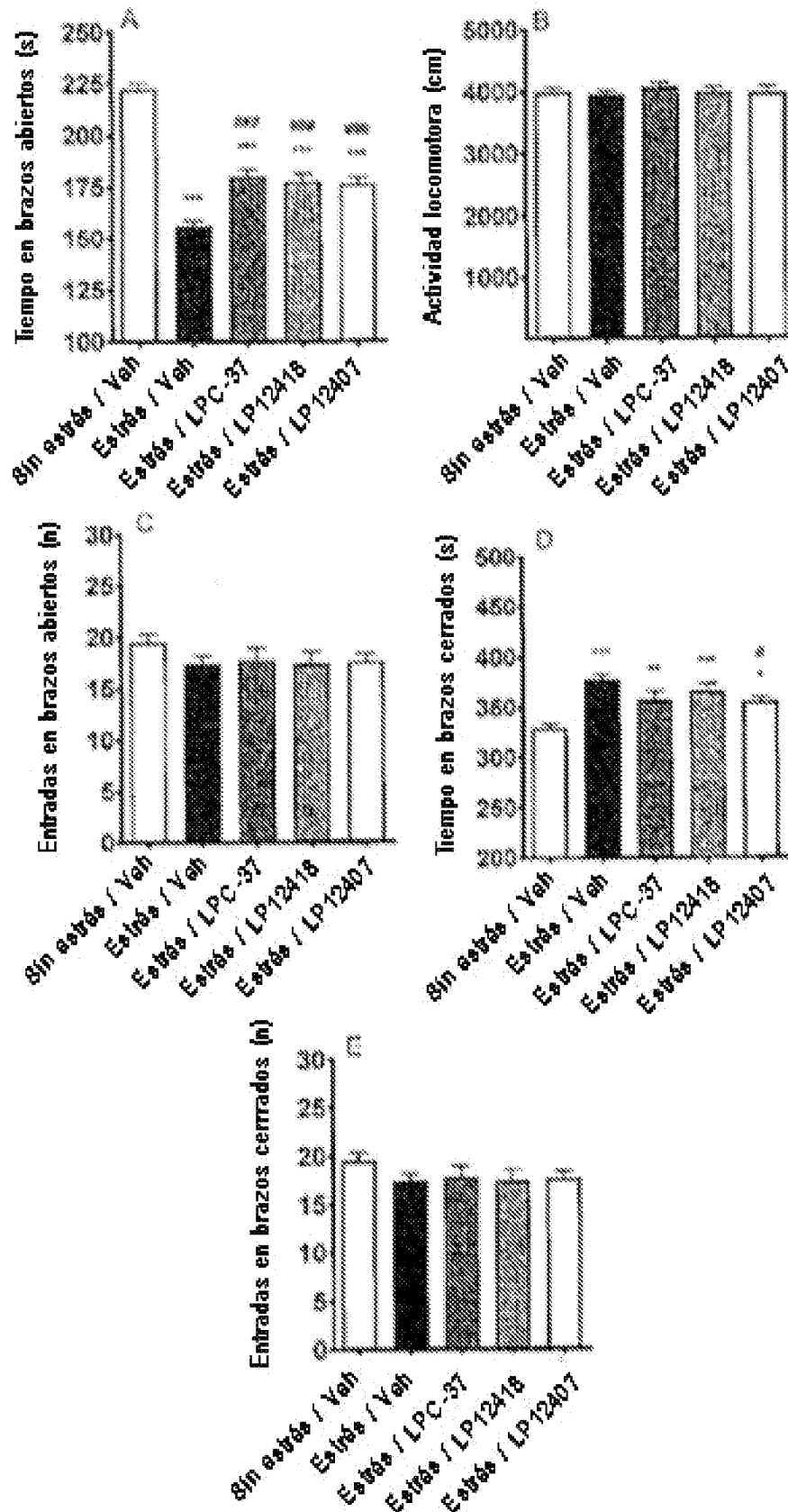


Figura 10

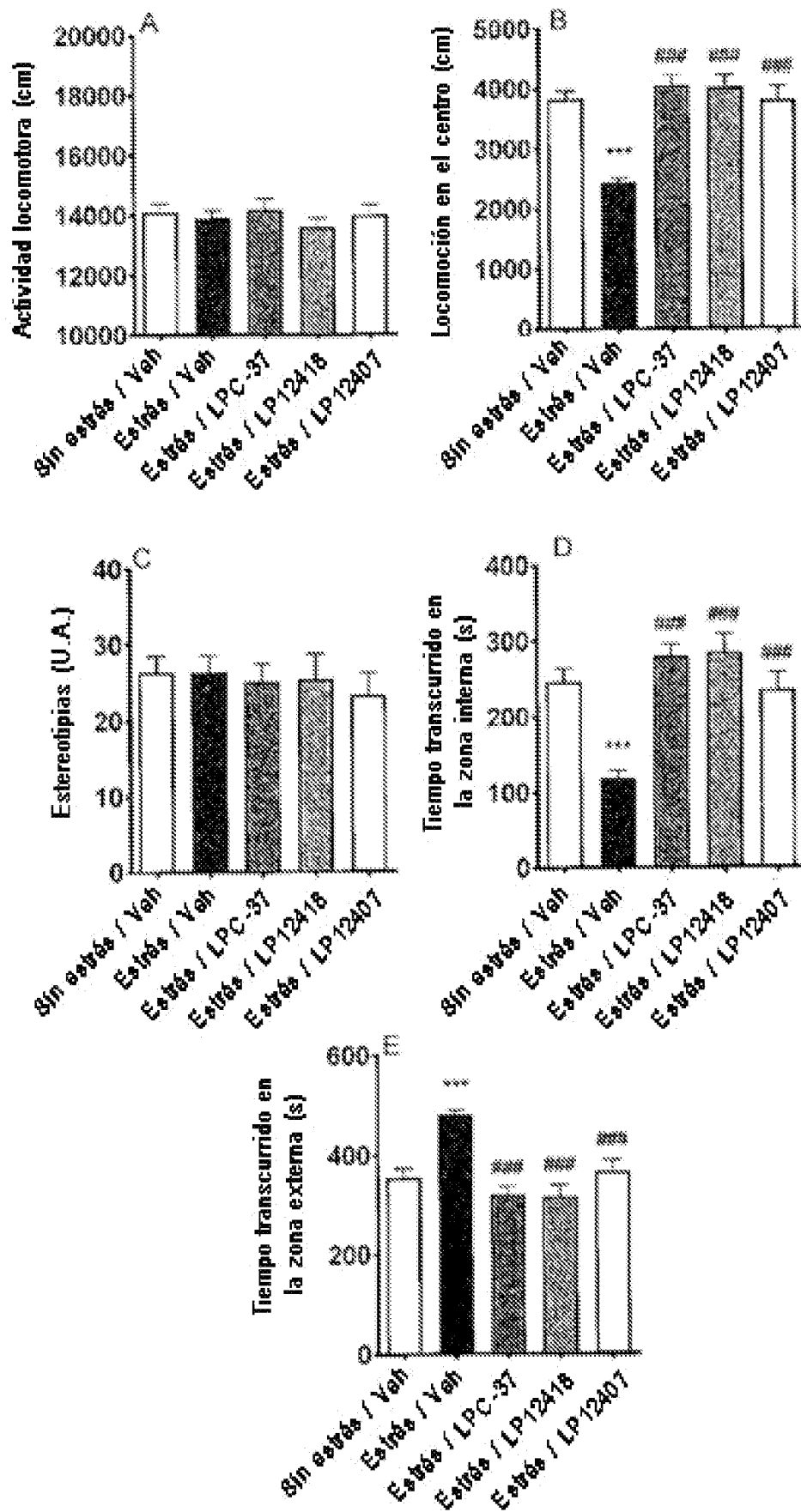


Figura 11

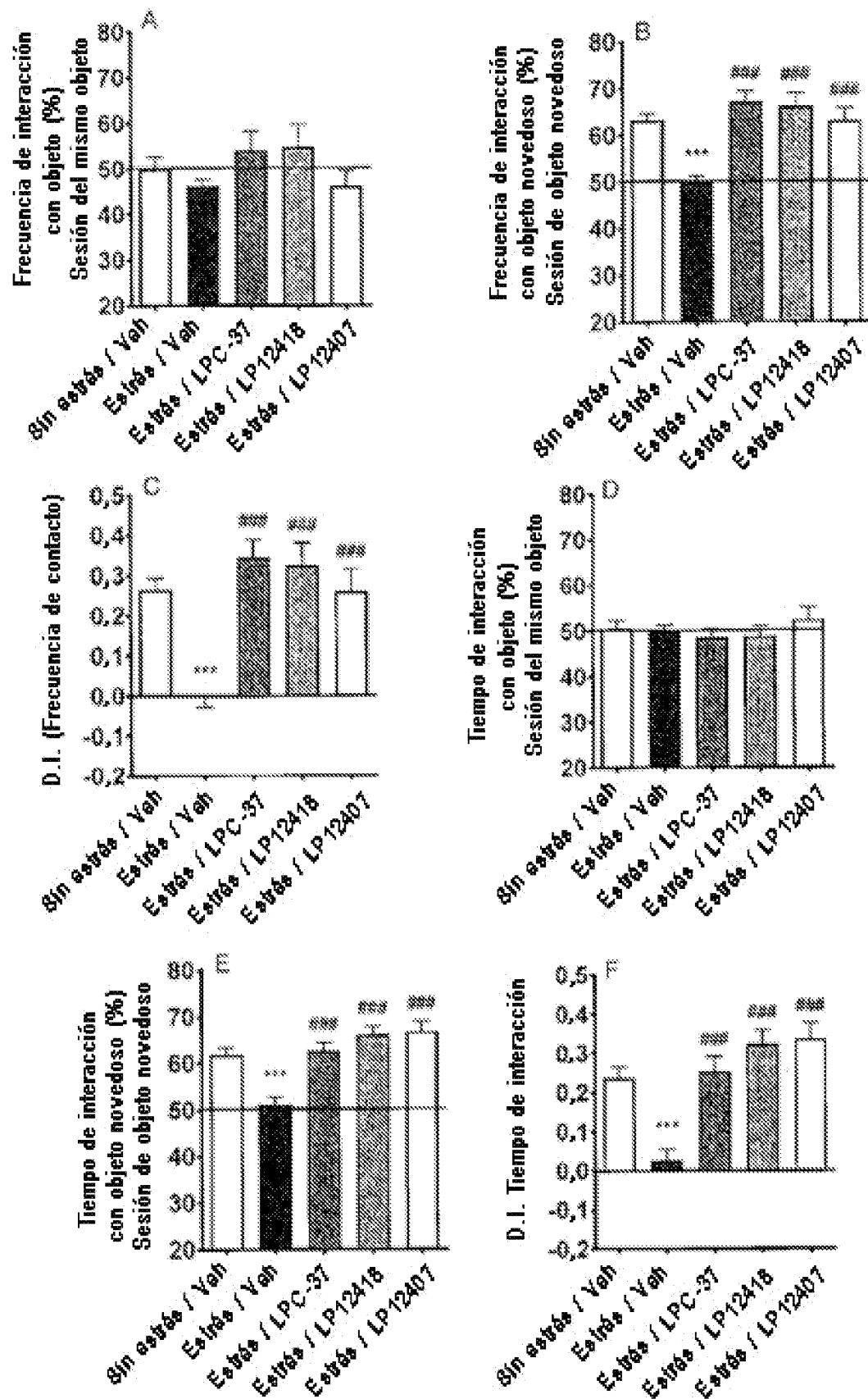


Figura 12

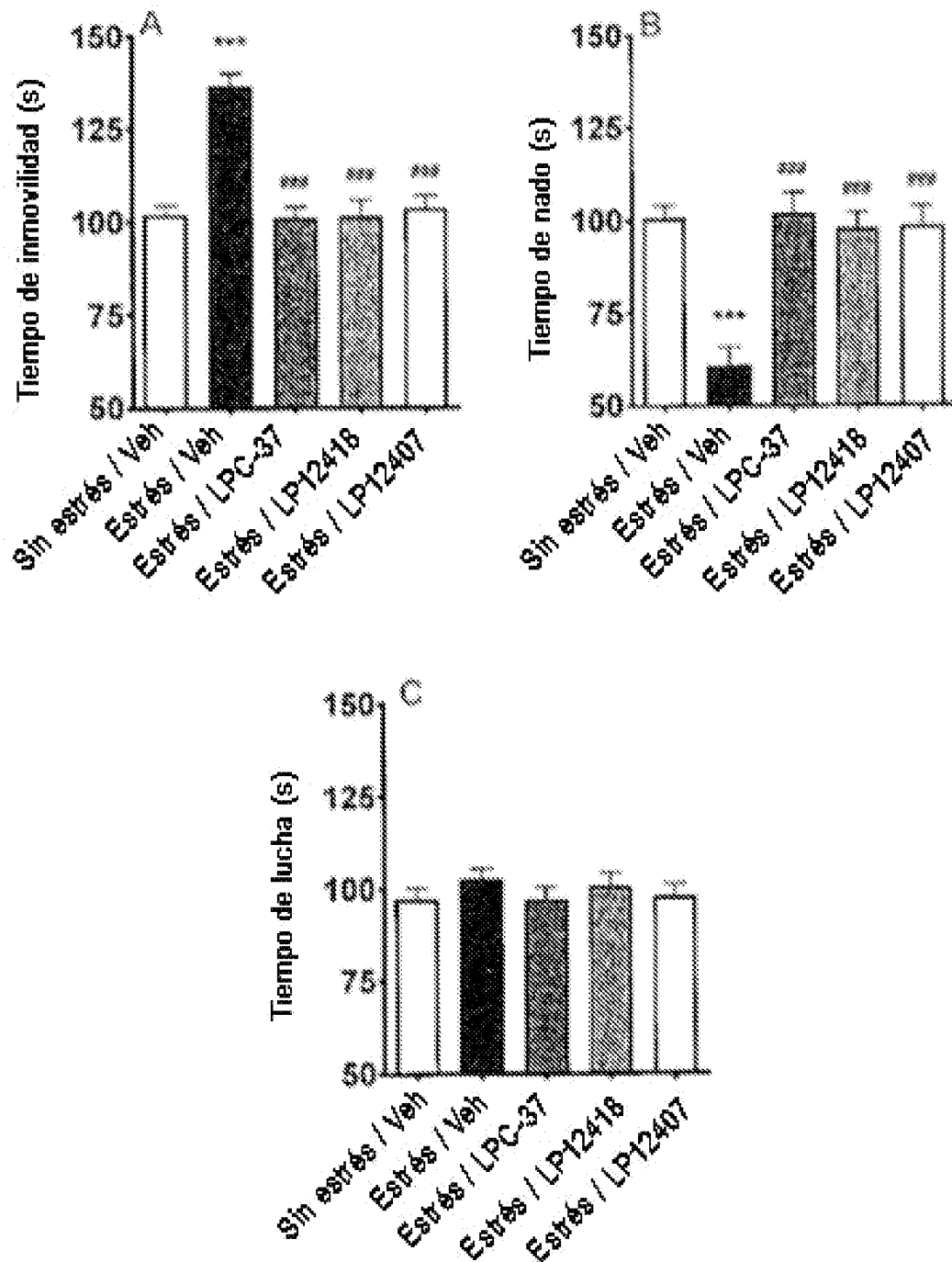


Figura 13

