

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 048 532**

51 Int. Cl.:

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2022 PCT/EP2022/086359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2023 WO23111270**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2022 E 22836184 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2025 EP 4429686**

54 Título: **Composiciones postbióticas que comprenden B. Longum CECT-7347 y L. Rhamnosus CECT-8361 y usos terapéuticos de las mismas**

30 Prioridad:

16.12.2021 EP 21383147

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

10.12.2025

73 Titular/es:

**BIOPOLIS, S.L. (100,00%)
Parc Científic Universitat de Valencia Catedrático
Augustín Escardino
46980 Paterna (Valencia), ES**

72 Inventor/es:

**CHENOLL CUADROS, MARIA EMPAR;
MARTORELL GUEROLA, PATRICIA;
TORTAJADA SERRA, MARTA;
RAMÓN VIDAL, DANIEL;
ROJAS MARTÍNEZ, ANTONIA;
BALAGUER VIDAL, FERRAN;
LLOPIS PLA, SILVIA;
MARTÍNEZ ÁVILA, ROBERTO;
ROBLES RODRÍGUEZ, VANESA y
FERNÁNDEZ RIESCO, MARTA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 3 048 532 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

Composiciones postbióticas que comprenden *B. Longum* CECT-7347 y *L. Rhamnosus* CECT-8361 y usos terapéuticos de las mismas

5 La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 12, se refiere a una composición postbiótica y su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos de ansiedad.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 Cada vez hay más pruebas de que la comunicación bidireccional entre el cerebro y el intestino, lo que se denomina "eje intestino-cerebro", desempeña un posible papel en el mantenimiento de la función cerebral y la homeostasis intestinal. Las investigaciones sugieren que distintos tipos de microorganismos, como los probióticos administrados por vía oral, pueden modificar el eje intestino-cerebro y controlar la respuesta al estrés, lo que sugiere que los probióticos pueden tener un papel terapéutico en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo, tales como la depresión o trastornos de ansiedad, regulando "el eje microbiota-intestino-cerebro".

15 Se ha informado que diversas cepas y mezclas de probióticos viables tienen efectos sobre la ansiedad y otros indicadores conductuales. Sin embargo, existen evidencias muy limitadas de resultados positivos sobre la ansiedad relacionados con el uso de formas no viables, inanimadas, inactivadas o tratadas con calor, de microorganismos, incluidas, sin limitar a, formas inanimadas de probióticos, todas ellas conocidas como postbióticos, también descritos como probióticos "fantasma" o paraprobióticos.

20 El uso de estas cepas microbianas no viables es extremadamente relevante para su aplicación industrial, permitiendo el uso del producto en ambientes complejos y en matrices o procesos agresivos que dañarían la viabilidad celular.

25 WO2019038449 A1 describe una composición farmacéutica que comprende *Bifidobacterium longum* no viable, opcionalmente en combinación con *Lactobacillus mucosae*, para su uso en la reducción de estrés, ansiedad y depresión, y para su uso en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo, insomnio, trastorno delirante, trastorno obsesivo compulsivo, migraña, trastorno cognitivo y trastorno de atención en un sujeto.

30 WO2018220429A1 describe el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* para su uso en el tratamiento o la prevención de la depresión posparto y la ansiedad posparto. WO2018002238 A1 describe una composición que comprende *Lactococcus lactis* y una combinación de los probióticos *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos de ansiedad y condiciones relacionadas, como fobias, trastorno de ansiedad social, trastorno de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo y trastorno de estrés postraumático. La composición es una composición nutricional, una fórmula infantil o una composición farmacéutica.

35 EP3222282 A1 describe composiciones probióticas que comprenden *B. longum* CECT 7347 y/o *L. rhamnosus* CECT 8361 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la psoriasis.

EP3851115 A1 describe una composición probiótica que comprende *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347 para su uso en el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo en un sujeto.

EP3272396 A1 describe una composición probiótica que comprende *Bifidobacterium longum* CECT 7347 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la dermatitis atópica.

40 Martorell Patricia et al., "Heat-Treated *Bifidobacterium longum* CECT-7347: A Whole-Cell Postbiotic with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Gut-Barrier Protection Properties", ANTIOXIDANTS, vol. 10, no. 4 (2021) describe *Bifidobacterium longum* CECT 7347 tratado térmicamente (postbiótico) con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y de protección de la barrera intestinal.

45 Salminen Seppo et al., "The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics", NATURE REVIEWS GASTROENTEROLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 18, no. 9, (2021), páginas 649-667, divulga una definición de postbiótico como una preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confiere un beneficio para la salud del huésped.

50 José Moisés Laparra et al., "*Bifidobacterium longum* CECT 7347 Modulates Immune Responses in a Gliadin-Induced Enteropathy Animal Model", PLOS ONE, vol. 7, no. 2, (2012) describe que *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modula las respuestas inmunitarias en un modelo animal de enteropatía inducida por gliadina.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar composiciones postbióticas para el tratamiento de los trastornos de ansiedad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

55 Los autores de la presente invención han descubierto que la ingestión prolongada de una mezcla de cepas no viables de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* da lugar a un resultado positivo en un modelo de conducta y ansiedad basado en *Danio rerio* (pez cebra). Sorprendentemente, los mejores resultados se obtienen con la mezcla

postbiótica tratada por calor, en lugar de con cada una de las especies sola, ya sea viable o no viable, o de la propia mezcla probiótica viable.

Además, se realizaron ensayos comparativos con diferentes combinaciones de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) y *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) tratadas con calor, en un modelo de ansiedad en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), mostrando una reducción significativamente mejorada de la conducta ansiosa asociada al tratamiento con la mezcla de la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 tratada con calor (también denominada ES1-TC o IATA-ES1-TC) y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 tratada con calor (también denominada BPL15-TC o BPL0015-TC), en comparación con la combinación de otras cepas tratadas con calor (TC) pertenecientes a las especies *B. longum* y *L. rhamnosus* (Ejemplo 3).

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una composición postbiótica ("composición postbiótica de la invención" o "composición de la invención") que comprende la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 no viable y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 no viable.

L. rhamnosus CECT 8361 (BPL15 o BPL0015) se aisló de las heces de un niño sano y con lactancia materna de menos de tres (3) meses. Esta cepa se depositó el 27 de mayo de 2013 en virtud del Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 8361.

B. longum CECT 7347 (ES1 o IATA-ES1) se aisló de heces de un niño sano con lactancia materna de menos de tres (3) meses y se depositó el 20 de diciembre de 2007 en virtud del Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 7347.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición postbiótica" se refiere a cualquier composición que comprende al menos un postbiótico, incluidas bacterias inanimadas o sus componentes. Según la definición proporcionada por la *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) (Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos, un postbiótico es una "preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confiere un beneficio para la salud del hospedador" (Sallines *et al.* 2021 *Nature Rev Gastroenterol Hepatol.* 18(9):649-667). En cambio, y según la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador".

En los últimos años, la investigación se ha centrado en microorganismos que componen la microbiota intestinal que muestran efectos promotores de la salud, tales como la protección del hospedador contra patógenos mediante exclusión competitiva o modulación del sistema inmunitario. La expresión "microbiota intestinal" se refiere a la diversa comunidad microbiana que evolucionó para adaptarse y sobrevivir en el tracto gastrointestinal humano. La microbiota intestinal interacciona con su hospedador humano de diversas formas; los microbios pueden ser comensales inoocuos, patógenos oportunistas o microorganismos promotores de la salud o probióticos. La investigación sobre las actividades de estos últimos ha aumentado sustancialmente en los últimos 20 años, y los agentes probióticos se están investigando en muchos estudios clínicos y basados en modelos animales.

En la presente invención, la composición postbiótica comprende bacterias no viables pertenecientes a *B. longum* y *L. rhamnosus*. La taxonomía de ambas especies se detalla a continuación.

Reino	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Bacteria	Firmicutes	Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i>
Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lacticaseibacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i>

Los miembros del género *Bifidobacterium* se encuentran entre los primeros microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal (TGI) humano y se cree que ejercen beneficios positivos para la salud de su hospedador. Las bifidobacterias se han explotado comercialmente como agentes probióticos debido a sus beneficios para la salud y a que generalmente se reconocen como seguras. Debido a sus potenciales propiedades promotoras de la salud, estas bacterias se han incorporado a muchos alimentos funcionales como principios activos.

Las bifidobacterias se encuentran de manera natural en una variedad de nichos ecológicos que están conectados directa o indirectamente con el TGI del animal, tal como la cavidad bucal humana, el intestino de insectos y las aguas residuales. Para poder sobrevivir en estos nichos ecológicos particulares, las bifidobacterias deben poseer adaptaciones específicas para ser competitivas.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son grampositivas, no móviles y a menudo bacterias anaerobias ramificadas. Son uno de los principales géneros de bacterias que forman la microbiota del TGI en los mamíferos y comprenden más de 30 especies diferentes. Entre ellas, *B. longum* es una bacteria con forma de bastón ramificado, catalasa negativa.

Lactobacillus (actualmente conocido como *Lacticaseibacillus*) es el género más grande de la familia *Lactobacillaceae*. Antes de su reclasificación en 23 géneros diferentes (Zheng *et al.* 2020 Int J Syst Evol Microbiol. 70(4):2782-2858), constaba de 196 especies válidamente publicadas, comúnmente aisladas no sólo de ambientes asociados a alimentos fermentados, tales como frutos, carne, masa madre, verduras y vino, sino también de los tractos gastrointestinal y vaginal de seres humanos y animales. En la actualidad, se aplican ampliamente en campos relacionados con la alimentación, piensos, productos farmacéuticos y biotecnología; por ejemplo, se utilizan como iniciadores lácteos, probióticos, vehículos de vacunas e inoculantes para ensilaje.

Los lactobacilos son bacterias grampositivas, en forma de bastoncillos, facultativamente anaerobias o microaerófilas, no formadoras de esporas, tolerantes a los ácidos y catalasa negativas, con un contenido de ADN G+C de entre 46 y 58 % mol. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* están estrechamente relacionadas filogenética y fenotípicamente, y antes se consideraban del grupo *L. casei* (Zheng *et al.* 2020 Int J Syst Evol Microbiol. 70(4):2782-2858). Las cepas probióticas que forman parte de este grupo se utilizan en todo el mundo en productos lácteos fermentados o suplementos alimenticios y como probióticos para mejorar la salud del hospedador.

La composición postbiótica de la invención comprende formas no viables de las bacterias *B. longum* y *L. rhamnosus*. Como se utiliza en el presente documento, el término "no viable", "inanimado", "inactivo" o "inactivado", se refiere a cualquier microorganismo metabólica o fisiológicamente inactivo, es decir, que no conserva su actividad metabólica y la capacidad de multiplicarse tras la administración de nutrientes. La viabilidad es independiente de la capacidad del microorganismo para formar colonias en medios sólidos, es decir, su culturabilidad.

Es habitual que en muchos casos se utilice el procesamiento térmico para inactivar microorganismos, ya que existe un amplio historial de procesamiento térmico en la industria alimentaria. Un procedimiento común para inactivar microorganismos es el tratamiento por calor. El calor es letal para los microorganismos, pero cada especie tiene su particular tolerancia al calor. Durante un proceso de destrucción térmica, tal como la pasteurización, tindalización y esterilización en autoclave, la tasa de destrucción es logarítmica, al igual que su tasa de crecimiento. Por tanto, las bacterias sometidas a calor mueren a un ritmo proporcional al número de organismos presentes. El proceso depende tanto de la temperatura de exposición como del tiempo requerido a esta temperatura para lograr la tasa de destrucción deseada.

En algunas realizaciones de la invención, las cepas no viables de *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus* están tratadas con calor. Por tanto, una realización preferida proporciona la composición de la invención, en donde la cepa CECT 7347 no viable de *B. longum* está tratada con calor y la cepa CECT 8361 no viable de *Lactobacillus rhamnosus* está tratada con calor.

La presente invención también contempla las cepas bacterianas derivadas de las cepas CECT 7347 de *B. longum* y CECT 8361 de *L. rhamnosus* ("cepas parentales") que pueden formar parte de la composición postbiótica de la invención ya que conservan la capacidad de reducir y/o mejorar los síntomas de los trastornos de ansiedad en el sujeto.

Ejemplos de cepas bacterianas derivadas de las cepas parentales comprendidas dentro de la composición de la invención incluyen organismos genéticamente modificados que muestran variaciones en su genoma en comparación con el genoma de las cepas de la invención, en donde las mutaciones no afectan a la capacidad de las cepas y/o de sus componentes para reducir y/o mejorar los síntomas de los trastornos de ansiedad en el sujeto.

Las cepas derivadas de *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361 pueden producirse de forma natural o intencionada mediante métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica, tales como, pero sin limitación a, cultivar la cepa parental en presencia de agentes mutagénicos o factores estresantes o ingeniería genética dirigida a la modificación, delección y/o inserción de genes específicos.

En algunas realizaciones, la composición de la invención contempla organismos genéticamente modificados derivados de las cepas *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361 que conservan la capacidad de prevenir, reducir y/o mejorar los síntomas de los trastornos de ansiedad en un sujeto y, por lo tanto, dicha composición es útil en el tratamiento y/o la prevención de dichos trastornos.

En algunas realizaciones específicas, la presente invención también contempla moléculas, metabolitos y componentes bacterianos, secretados por las cepas *B. longum* CECT 7347 y/o *L. rhamnosus* CECT 8361 y/o composiciones que comprenden dichos componentes, así como su uso para el tratamiento y/o la prevención de trastornos de la ansiedad.

Los componentes bacterianos incluyen, sin limitación, componentes de la pared celular (como ejemplo no limitativo, peptidoglucano); ácidos nucleicos; componentes de la membrana; y proteínas, lípidos, hidratos de carbono, y combinaciones de los mismos (tales como lipoproteínas, glucolípidos o glucoproteínas). Los metabolitos pueden incluir cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como resultado de su actividad metabólica durante el crecimiento, su uso en procesos tecnológicos o durante su almacenamiento. Ejemplos de estos metabolitos incluyen, pero sin limitar a, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glucolípidos, glucoproteínas, vitaminas, sales, minerales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula secretada o liberada al exterior por la bacteria durante el crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, procesamiento de alimentos o fármacos) o durante su almacenamiento. Como ejemplos de estas moléculas se incluyen, pero sin limitación, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos,

aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glucolípidos, glucoproteínas, vitaminas, sales, minerales o ácidos nucleicos.

5 La composición de la invención puede formularse para administración farmacéutica, es decir, formando parte de productos farmacéuticos para administrar al sujeto por cualquier medio de administración; y/o para la administración de alimentos, es decir, formando parte de los alimentos o suplementos nutricionales consumidos en la dieta del sujeto. Por tanto, en algunas realizaciones, la composición de la invención es una composición farmacéutica ("composición farmacéutica de la invención") y/o una composición nutricional ("composición nutricional de la invención").

La composición de la invención comprende las cepas *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361 no viables (y/o cepas y/o componentes celulares derivados de las mismas) en cualquier concentración adecuada.

10 Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender (i) uno o más componentes o compuestos que tengan cualquier actividad biológica, farmacológica y/o veterinaria útil, tal como una actividad útil en la prevención y/o el tratamiento de los trastornos de ansiedad en un sujeto; y/o (ii) uno o más componentes que, tras la administración a un sujeto, pueden aumentar, potenciar y/o promover la actividad de los postbióticos incluidos en la composición de la invención. Como entienden los expertos en la materia, los componentes o compuestos adicionales deben ser
15 compatibles con el efecto ejercido por las cepas no viables de la composición de la invención.

La expresión "composición farmacéutica" también abarca composiciones veterinarias.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 El término "excipiente" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquier componente o compuesto de la composición de la invención, en concreto, de cepas de la invención, o que estabiliza los componentes o compuestos y/o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o sabores para hacerla más agradable. Por tanto, los excipientes pueden tener la función, como ejemplo, aunque sin limitarse a ello, de unir los componentes (por ejemplo, almidones, azúcares o celulosa), edulcorar, dar color, proteger el principio activo (por ejemplo, para aislarlo del aire y/o de la humedad), rellenar una pastilla, cápsula o cualquier otra presentación o tener
25 una función de disgregación para facilitar la disolución de los componentes, sin excluir otros excipientes no enumerados en este párrafo. Por lo tanto, el término "excipiente" se define como aquel material que, incluido en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para permitir su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físicas y químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de
30 componentes o compuestos de la composición farmacéutica, es decir, ser compatible con el efecto ejercido por las cepas de la invención.

La "forma galénica" o "forma farmacéutica" es la configuración a la que se adaptan los principios activos y excipientes para proporcionar una composición farmacéutica o un fármaco. Se define por la combinación de la forma en la que el fabricante presenta la composición farmacéutica y la forma en la que se administra.

35 El "vehículo" o "transportador" es preferiblemente una sustancia inerte. Las funciones transportadoras son facilitar la incorporación de otros componentes o compuestos, permitir una mejor dosificación y administración y/o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por lo tanto, el vehículo es una sustancia utilizada en el fármaco para diluir cualquiera de los componentes o compuestos de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o que incluso sin diluir estos componentes o compuestos, es capaz de permitir
40 una mejor dosificación y administración y/o dar consistencia y forma al fármaco. Cuando la presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente. El vehículo puede ser natural o no natural. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitarse a ellos, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, almidón, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos
45 petroetales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, el excipiente y el vehículo están permitidos y evaluados para no causar daño al sujeto a quien se administra.

50 En cada caso, la presentación de la composición se adaptará al tipo de administración utilizada. Por tanto, la composición puede presentarse en forma de soluciones o en cualquier otra forma de administración clínicamente admisible y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La composición de la invención puede formularse en preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, tal como en comprimidos, cápsulas, polvos, granulados, soluciones, supositorios, geles o microsferas. En una realización particular, la composición de la invención está formulada en forma líquida o en forma sólida.

55 En otra realización particular, la formulación sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, pastillas para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobres, polvos, geles, granulados, partículas recubiertas o comprimidos recubiertos, comprimido, pastillas, trociscos, comprimidos y cápsulas gastroresistentes y tiras y películas dispersables.

En otra realización particular, la formulación líquida se selecciona del grupo que consiste en soluciones orales, suspensiones, gotas, emulsiones y jarabes.

- Asimismo, se conocen varios sistemas que pueden utilizarse para la administración de liberación sostenida de la composición de la invención, incluyendo, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, microburbujas, micropartículas o microcápsulas y similares. Las formas de liberación sostenida adecuadas, así como los materiales y métodos para su preparación, se conocen bien en el estado de la técnica. Por tanto, la forma administrable por vía oral de la composición de la invención está en una forma de liberación sostenida que comprende además al menos un recubrimiento o una matriz. El recubrimiento o la matriz de liberación sostenida incluye, sin limitación, polímeros naturales semisintéticos o sintéticos, ceras insolubles en agua o modificadas, grasas, alcoholes grasos, ácidos grasos, plastificantes naturales, semisintéticos o sintéticos o una combinación de dos o más de los mismos. Los recubrimientos entéricos pueden aplicarse usando procesos convencionales conocidos por los expertos en la materia.
- Además de lo descrito anteriormente, la presente invención también abarca la posibilidad de que la composición de la invención pueda administrarse a un sujeto junto con otros componentes o compuestos, aunque estos no formen parte de la composición de la invención. En los párrafos anteriores se detallan ejemplos de dichos componentes o compuestos.
- En algunas realizaciones de la presente invención, la composición de la invención es una composición nutricional. La composición nutricional de la invención también comprende bacterias no viables de *B. longum* CECT 7347 y de *L. rhamnosus* CECT 8361 (y/o cepas y/o componentes celulares derivados de las mismas) a cualquier concentración adecuada.
- En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende *L. rhamnosus* CECT 8361 y *B. longum* CECT 7347 (y/o cepas y/o componentes celulares derivados de las mismas) a cualquier concentración adecuada.
- En el caso de que la composición de la invención se formule como una composición nutricional, dicha composición nutricional puede ser un alimento o puede estar incorporada a un alimento o producto alimenticio destinado al consumo humano y/o animal.
- Por tanto, en algunas realizaciones, la composición nutricional de la invención es un alimento o un suplemento nutricional.
- En algunas realizaciones específicas de la invención, la composición nutricional de la invención es un alimento con fines nutricionales y/o funcionales específicos, biológicos y/o fisiológicos. En algunas realizaciones específicas de la invención, la composición nutricional de la invención es un alimento medicinal.
- En algunas realizaciones, la composición nutricional de la invención es un suplemento nutricional o dietético.
- En la presente invención, la expresión "composición nutricional" se refiere a cualquier alimento que, independientemente de proporcionar nutrientes al sujeto que lo consume, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo, para aprovechar y/o proporcionar una mejor salud y bienestar. En la presente invención, dicha composición nutricional está destinada a aliviar, reducir, tratar y/o prevenir los trastornos de ansiedad.
- El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de las expresiones "suplemento dietético", "suplemento nutricional", "suplemento alimenticio" o "suplemento alimentario" o "complemento alimentario", se refiere a productos o preparados cuya finalidad es suplementar la dieta normal de un sujeto, que consiste en fuentes de nutrientes concentrados u otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico. En la presente invención, las cepas *B. longum* CECT 7347, *L. rhamnosus* CECT 8361 y/o cualquiera de las cepas y/o componentes celulares derivados de ellas, son las "sustancias" con un efecto nutricional y/o fisiológico en el sujeto.
- El suplemento nutricional puede presentarse en forma única o combinada y comercializarse en forma farmacéutica, es decir, en cápsulas, pastillas, comprimidos y otras formas similares, sobres de polvo, ampollas de líquidos y frascos dispensadores de gotas y otras formas similares de líquidos y polvos diseñados para tomarse en una cantidad individual.
- Existe una amplia gama de nutrientes y otros elementos que pueden estar presentes en los complementos alimenticios, incluidos, entre otros, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibra, enzimas, plantas y extractos vegetales. Dado que su papel es complementar el aporte de nutrientes de una dieta, no deben utilizarse como sustituto de una dieta equilibrada y la ingesta no debe superar la dosis diaria recomendada expresamente por el médico o el especialista en nutrición. La composición de la invención también puede formar parte de los denominados "alimentos para colectivos especiales", es decir, alimentos que satisfacen necesidades nutricionales específicas.
- Ejemplos de alimentos que puede comprender la composición de la invención incluyen, pero sin limitar a, piensos, productos lácteos, productos vegetales, productos cárnicos, *snacks*, chocolates, bebidas, alimentos para bebés, cereales, comida frita, productos de panadería industrial y galletas. Los ejemplos de productos lácteos incluyen, pero sin limitación, productos procedentes de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitación, yogur o queso) o de leche no fermentada (por ejemplo, pero sin limitación, helado, mantequilla, margarina o suero de leche). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitación, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado (por ejemplo, yogur de soja, yogur de avena, etc.) o sin fermentar, y un *snack*. Las bebidas incluyen, pero sin limitación, leche no fermentada.

En algunas realizaciones, el producto alimenticio o alimento se selecciona del grupo que consiste en zumos de fruta o verdura, helado, fórmula infantil, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de panadería, productos lácteos (tales como batidos de leche o batidos de frutas), productos cárnicos y bebidas.

5 En algunas realizaciones, la composición de la invención puede comprender otros microorganismos además de *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361.

Como comprenderá el experto en la materia, las cepas de *B. longum* y *L. rhamnosus* deben estar presentes, conjuntamente o por separado, en la composición de la invención, en una cantidad terapéuticamente eficaz para ejercer su efecto, tal como el efecto de aliviar, reducir, tratar y/o prevenir los trastornos de ansiedad.

10 Dentro del contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad del componente o compuesto de la composición nutricional o farmacéutica, que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para producir el efecto deseado. Dicho componente o compuesto de la composición nutricional o farmacéutica se refiere a las cepas bacterianas *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo, por ejemplo, de la edad, del peso corporal, del estado de salud general, del sexo y de la dieta del sujeto, así como del modo y tiempo de administración, de la tasa de excreción o de cualquier posible tratamiento conjunto con otros fármacos. Para disipar cualquier duda, dichos fármacos pueden prescribirse para la prevención y el tratamiento de trastornos de ansiedad o para cualquier otra afección.

15 En algunas realizaciones de la composición de la invención, la concentración total de microorganismos de *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361, es de entre 10^3 y 10^{12} ufc o células, preferiblemente 10^9 ufc o células.

20 En algunas realizaciones específicas de la composición de la invención, la cantidad de microorganismos de *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361, es de entre 10^3 y 10^{12} ufc o células, preferiblemente 10^9 ufc o células. En algunas realizaciones específicas, la composición nutricional de la invención es un alimento o un suplemento nutricional para seres humanos.

En algunas realizaciones específicas, la composición nutricional de la invención es un alimento o un suplemento nutricional para animales de granja y/o mascotas.

25 En algunas realizaciones específicas, la composición nutricional de la invención es un alimento o un suplemento nutricional para la prevención de los trastornos de ansiedad en seres humanos sanos.

En algunas realizaciones específicas, la composición nutricional de la invención es un alimento o un suplemento nutricional para la prevención de los trastornos de ansiedad en mascotas y/o animales de granja sanos.

30 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende además un microorganismo o sus componentes seleccionados del grupo que consiste en *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. y combinaciones de los mismos.

35 Como se ha indicado anteriormente, está bien establecido el uso de probióticos para diferentes condiciones o para mejorar la salud general; sin embargo, no ocurre lo mismo con el uso de postbióticos. En particular, aunque se ha informado que diversas cepas y mezclas de probióticos tienen efectos sobre la ansiedad y otros indicadores conductuales, no se ha demostrado que el uso de postbióticos tenga efectos positivos sobre la ansiedad. La presente solicitud proporciona datos que, por primera vez, demuestran la eficacia de una composición postbiótica que comprende cepas no viables de *L. rhamnosus* y *B. longum* en el tratamiento de trastornos de ansiedad.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a la composición de la invención, para su uso como un medicamento.

40 El término "medicamento", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier composición/sustancia utilizada para la prevención, el diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de una enfermedad en un sujeto o que puede administrarse a un sujeto con el fin de restablecer, corregir o modificar funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la composición de la invención, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de los trastornos de ansiedad en un sujeto.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" comprende: inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo; aliviar la enfermedad o condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o condición patológica; y/o estabilizar la enfermedad o condición patológica en un sujeto. En la presente invención, la enfermedad o condición patológica es al menos un trastorno de ansiedad.

50 Como se utiliza en el presente documento, el término "prevención" significa evitar la aparición de la enfermedad o condición patológica en un sujeto, particularmente cuando el sujeto tiene predisposición a la condición patológica, pero aún no ha sido diagnosticado. En la presente invención, la enfermedad o condición patológica es al menos un trastorno de ansiedad.

55 Dentro del contexto de la presente invención, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal de cualquier especie. Ejemplos de sujetos incluyen, pero sin limitar a: Animales de interés comercial como aves (gallinas, avestruces, pollitos, gansos, perdicés, etc.), conejos, liebres, mascotas (perros, gatos, etc.), ovejas, ganado caprino (cabras, etc.),

porcino (jabalíes, cerdos, etc.), ganado equino (caballos, ponis, etc.) y ganado bovino (toros, vacas, bueyes, etc.); animales de interés cinegético, tales como ciervo, gamo, reno, etc.; y seres humanos.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero; en algunas realizaciones preferidas, el mamífero es un ser humano de cualquier raza, sexo o edad.

- 5 En algunas otras realizaciones preferidas, el mamífero es un animal de granja, incluyendo, pero sin limitación, vacas, caballos, cabras, llamas, ovejas, cerdos, pollos, o cualquier animal criado o cruzado con fines comerciales. En algunas otras realizaciones preferidas, el mamífero es una mascota, incluyendo, pero sin limitación, perros, gatos o conejos.

En algunas realizaciones, la composición de la invención se administra a un sujeto a través de la dieta.

- 10 En algunas realizaciones de la invención, el régimen de administración de la composición de la invención es de al menos una vez al día; dos veces al día; o tres veces al día, uno con cada comida alimentaria principal (desayuno y/o almuerzo y/o cena).

- 15 El uso de postbióticos es extremadamente relevante para su aplicabilidad industrial, específicamente para su fabricación; no sólo permite el uso del producto en entornos difíciles sometidos a calor o humedad que perjudicarían la estabilidad de los probióticos tradicionales, sino también el uso de matrices o procesos agresivos (p. ej., extrusión de piensos) que dañarían la viabilidad de las células probióticas.

Además, el uso de postbióticos y probióticos puede tener diversos beneficios sobre los tratamientos tradicionales de los trastornos de ansiedad, evitando los efectos secundarios habituales de la medicación estándar, tal como la fluoxetina, e incluye, pero sin limitación, insomnio, tensión muscular, náuseas y disfunción sexual.

- 20 Como se ha explicado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a composiciones postbióticas que comprenden cepas de *B. longum* CECT 7347 y *L. rhamnosus* CECT 8361 no viables, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos de ansiedad.

- 25 La ansiedad es una emoción caracterizada por sentimientos de tensión, pensamientos de preocupación y cambios físicos como aumento de la presión arterial. Si bien la ansiedad es una reacción normal al estrés y puede ser beneficiosa en algunas situaciones, los trastornos de ansiedad difieren de los sentimientos normales de nerviosismo o ansiedad e implican miedo o ansiedad excesivos. No sólo los seres humanos pueden tener ansiedad sino también otros animales, en particular otros mamíferos no humanos.

- 30 Los trastornos de ansiedad son los trastornos mentales más comunes en seres humanos y afectan a casi al 30 % de los adultos en algún momento de sus vidas. Los trastornos de ansiedad incluyen, pero sin limitación, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, fobia específica, agorafobia, trastorno de ansiedad social (anteriormente denominado fobia social), aversión al ruido y trastorno de ansiedad por separación.

El trastorno de ansiedad generalizada implica una preocupación persistente y excesiva que interfiere con las actividades diarias. Puede ir acompañado de síntomas físicos, como inquietud, sentirse nervioso o fatigado con facilidad, dificultad para concentrarse, tensión muscular o problemas para dormir.

- 35 El trastorno de pánico suele caracterizarse por ataques de pánico recurrentes, una abrumadora combinación de malestar físico y psicológico con síntomas bastante graves. Los ataques pueden ser esperados, tal como una respuesta a un objeto temido, o inesperadas, aparentemente suceden sin ninguna razón. Pueden suceder con otros trastornos mentales como la depresión o el trastorno de estrés postraumático (PTSD, por sus siglas en inglés).

Una fobia específica es un miedo excesivo y persistente a un objeto, situación o actividad concretos que, por lo general, no son perjudiciales.

- 40 La agorafobia es el miedo a encontrarse en situaciones en las que escapar puede resultar difícil o embarazoso, o en las que no se disponga de ayuda en caso de síntomas de pánico. El miedo no guarda proporción con la situación real y generalmente dura seis meses o más y causa problemas de funcionamiento.

- 45 El trastorno de ansiedad social se caracteriza por una importante ansiedad y malestar por sentirse avergonzado, humillado, rechazado o menospreciado en las interacciones sociales. El miedo o la ansiedad causan problemas con el funcionamiento diario y duran al menos seis meses.

Actualmente se desconocen las causas de los trastornos de ansiedad, pero probablemente impliquen una combinación de factores que incluyen factores genéticos, ambientales, psicológicos y de desarrollo.

- 50 Aunque cada trastorno de ansiedad tiene características únicas, la mayoría responde bien a la psicoterapia y a medicación. Aunque la medicación no cura los trastornos de ansiedad, proporcionan un alivio significativo de los síntomas. Los medicamentos más utilizados son los ansiolíticos (generalmente recetados sólo durante un corto período de tiempo) y los antidepresivos. Los betabloqueantes, utilizados para afecciones cardíacas, a veces se utilizan para controlar los síntomas físicos de la ansiedad.

- 55 Dentro de la presente invención, la expresión "trastornos de ansiedad" no sólo incluye los trastornos de ansiedad descritos anteriormente, sino también condiciones relacionadas, que incluyen, pero sin limitar a: trastorno de estrés postraumático (PTSD, por sus siglas en inglés); trastorno por estrés agudo; trastorno obsesivo compulsivo; y trastornos de adaptación.

5 El PTSD es un trastorno psiquiátrico que puede presentarse en personas que han experimentado o presenciado un acontecimiento traumático, tal como una catástrofe natural, un accidente grave, un acto terrorista, etc. o que han sido amenazados de muerte, violencia sexual o lesiones graves. Puede presentarse en todas las personas, de cualquier etnia, nacionalidad o cultura, y a cualquier edad. Las personas con PTSD tienen pensamientos y sentimientos intensos y perturbadores relacionados con su experiencia que perduran mucho tiempo después de que haya finalizado el acontecimiento traumático. También sienten tristeza, miedo o ira, y pueden sentirse desapegados o distanciados de otras personas.

10 El trastorno por estrés agudo se produce como reacción a un acontecimiento traumático, al igual que el PTSD, y los síntomas son similares. Sin embargo, los síntomas se presentan entre tres días y un mes después del acontecimiento, provocando mucha angustia y problemas en la vida diaria del sujeto. Aproximadamente la mitad de las personas con trastorno por estrés agudo acaban teniendo PTSD. La psicoterapia y la medicación pueden ayudar a controlar los síntomas y prevenir el desarrollo del trastorno por estrés agudo en el PTSD.

15 El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es un trastorno en el que las personas tienen pensamientos, ideas o sensaciones recurrentes, no deseados, (obsesiones), que les impulsan a hacer algo de forma repetitiva (compulsiones). Estas compulsiones pueden interferir significativamente con las actividades diarias y las interacciones sociales de una persona, causar angustia significativa y perjudicar el funcionamiento laboral o social.

20 El trastorno de adaptación también se produce en respuesta a un acontecimiento (o acontecimientos) vital/es estresante/s. Los síntomas emocionales o conductuales que una persona experimenta en respuesta al factor estresante son más fuertes o más intensos de lo que razonablemente se esperaría para el tipo de acontecimiento que se produjo. Los síntomas pueden incluir tristeza, desesperación y manifestaciones físicas como temblores, palpitaciones y cefaleas. Estos síntomas provocan un malestar significativo o problemas de funcionamiento en áreas importantes de la vida del sujeto y generalmente comienzan en los tres meses siguientes al acontecimiento estresante; no duran más de seis meses después de que haya finalizado el factor estresante o sus consecuencias. El trastorno suele tratarse con psicoterapia.

25 Como se ha indicado anteriormente, los animales, en particular, mamíferos, también puede desarrollar ansiedad. Por ejemplo, la ansiedad por separación se observa comúnmente en las mascotas. La ansiedad por separación se desencadena cuando los perros o gatos son separados de sus cuidadores; los intentos de huida de los animales suelen ser extremos y pueden provocar autolesiones. Existen pruebas de que el estrés social también puede desempeñar un papel fundamental en el bienestar de las mascotas. Además, existen pruebas de que el estrés social, el transporte y el alto nivel de densidad en las granjas, también pueden desempeñar un papel fundamental en la prevención de enfermedades de los animales de granja y en el bienestar de las explotaciones y pueden ser un mediador por el cual las prácticas comunes de gestión pueden aumentar el riesgo de enfermedades. Los factores sociales, incluida la privación de contacto social ("aislamiento social"), la reducción del espacio disponible ("hacinamiento") y la alteración del orden social ("inestabilidad social"), desencadenan indicadores fisiológicos y conductuales de estrés en el ganado.

35 En otro aspecto, la presente invención abarca un método para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos de ansiedad en un sujeto ("método para su uso en el tratamiento o prevención de la invención"), que comprende administrar a un sujeto la composición de la invención.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al primer uso médico de la composición de la invención. La fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de trastornos de ansiedad en un sujeto se describe en el presente documento.

Todos los términos particulares, las definiciones y realizaciones de aspectos anteriores de la invención son aplicables al método para su uso en el tratamiento de y uso de la invención.

45 Además de los usos relacionados en el tratamiento y/o la prevención de trastornos de ansiedad, la composición descrita en el presente documento también puede utilizarse para mejorar la ansiedad no patológica. Como se indicó anteriormente en el presente documento, la ansiedad es una reacción normal al estrés y puede ser beneficiosa en algunas situaciones. Por lo tanto, se puede hacer una distinción entre sentimientos normales de nerviosismo o ansiedad y trastornos de ansiedad.

La ansiedad puede ser una reacción habitual al estrés y a situaciones nuevas para un individuo, que abarca, sin limitación, sentimientos de preocupación, inquietud o nerviosismo en un sujeto.

50 La composición descrita en el presente documento puede usarse también en la mejora del nerviosismo y/o la preocupación de un sujeto.

Además, la composición de la invención puede utilizarse como suplemento alimenticio. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención como suplemento alimenticio.

55 El término "suplemento alimenticio" se ha definido anteriormente, y su definición, así como las realizaciones particulares, se aplican igualmente aquí.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Peso del animal (media ± EEM) en cada grupo experimental al inicio del experimento, t=0.

5 **Figura 2.** Imagen de la plantilla generada con Noldus Ethovision® utilizada para el análisis del nado de los ejemplares con dos áreas superior e inferior.

Figura 3. Longitud y peso de los animales (media ± EEM) en cada grupo experimental a t= 2 mdi y t=4 mdi. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas *(p>0,050).

Figura 4. Distancia total nadada y velocidad de los peces (media ± EEM) en cada grupo experimental a t = 2 mdi y t = 4 mdi.

10 **Figura 5.** Preferencia de zona expresada como tiempo en segundos pasados en la zona superior del tanque (media ± EEM) y porcentajes normalizados durante el registro de la NTT (media ± EEM) en cada grupo experimental a t = 2 mdi y t = 4 mdi.

Figura 6. % de peces (puntos oscuros) que pasan menos de 30 seg en la zona superior durante la NTT en (A) 2 meses (2 mdi) y (B) 4 meses (4 mdi) después del inicio del experimento.

15 **Figura 7.** Latencia(s) hasta la primera entrada en la zona superior. Los asteriscos indican que los peces pasan toda la NTT en la zona superior del tanque. Las almohadillas indican que los peces pasan toda la NTT en la zona inferior del tanque.

Figura 8. Fusión de mapas de calor de todas las trayectorias de cada grupo experimental con un muestreo de 2 mdi.

Figura 9. Fusión de mapas de calor de todas las trayectorias de cada grupo experimental con un muestreo de 4 mdi.

20 **Figura 10.** Representación del tiempo de respuesta de *C. elegans* al octanol en condiciones de control (con OP50), condiciones de control de ansiedad (con privación de alimento) y nematodos ansiosos tratados con la mezcla de *L. rhamnosus* CECT8361 tratada con calor y *B. longum* CECT7347 tratada con calor (BPL15-TC+ES1-TC).

25 **Figura 11.** Análisis de dispersión cuantificando la distribución de nematodos en placas de agar. Los nematodos se sometieron a un estrés (fármaco estimulador colinérgico) y se trataron con la mezcla de *L. rhamnosus* CECT8361 tratada con calor y *B. longum* CECT7347 tratada con calor (BPL15-TC+ES1-TC). La escala de grises diferente indica la diferente posición (cm) de los nematodos desde el centro de la placa.

Figura 12. Efecto de la mezcla ES1-TC+-BPL15-TC (10⁸ células) y de otras mezclas formuladas con cepas alternativas (BPL33, BPLA3, BPL31 y BPL8) sobre conductas de evitación (ansiedad) en *C. elegans*. Se aplicó ANOVA unidireccional. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes. **p <0,01.

30 **Ejemplos**

Ejemplo 1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE SEIS SUPLEMENTOS PROBIÓTICOS/POSTBIOTICOS DIFERENTES SOBRE LA CONDUCTA DEL PEZ CEBRA ADULTO

35 **Materiales y métodos**

Evaluación del efecto de la administración oral de seis suplementos* probióticos diferentes en la conducta de *Danio rerio* (pez cebra) adulto usando el *Novel Tank Test* (NTT). Análisis del patrón de nado de los peces a nivel individualizado y generación de un informe con resultados y conclusiones.

- 40 * Formulación de Mezcla 004009
 Formulación de mezcla 004009 TC (Tratada con Calor)
 Bifidobacterium longum ES1 (CECT 7347)
 Bifidobacterium longum ES1 TC
 Lactobacillus rhamnosus BPL15 (CECT 8361)
 45 *Lactobacillus rhamnosus* BPL15 TC

Todos los procedimientos descritos en el presente informe fueron aprobados por el Comité institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de León (España). Todos los animales fueron manipulados de forma estándar de acuerdo con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE), siguiendo la normativa española (RD/2013) para el uso de animales de laboratorio.

50 Un lote de 70 hermanos de pez cebra (cepa AB) de 4 meses postfecundación (mpf) se dividió homogéneamente en 7 grupos (n=10) teniendo en cuenta el peso de los peces (Figura 1, Tabla 1).

Tabla 1.- Datos de peso (mg) al inicio del experimento.

P	Mezcla	MezclaTC	ES1	ES1TC	BPL15	BPL15TC	
175	149	113	162	180	182	208	
128	209	188	134	127	106	166	
146	104	131	146	131	120	110	
187	126	157	206	181	152	128	
107	112	130	118	113	114	156	
102	90	149	124	81	76	101	
106	79	136	76	71	99	68	
97	124	88	95	96	153	85	
135	149	79	96	108	93	132	
96	102	113	95	107	130	105	
	P	Mezcla	MezclaTC	ES1	ES1TC	BPL15	BPL15TC
Media	127,9	124,4	128,4	125,2	119,5	122,5	125,9
Desviación Est.	32,74	37,54	32,33	38,79	37,04	32,2	41,67
Error Est. de la Media	10,35	11,87	10,22	12,27	11,71	10,18	13,18

Cada pez se anestesió con 110 mg/l de metanosulfonato de tricaina (MS222) tamponado y se marcó individualmente con elastómeros de implante visibles (Northwest Marine Technology, WA, EE. UU.) para la identificación y el seguimiento individual de los animales. Los peces cebra se mantuvieron en tanques de 3 l con intercambio de agua constante procedente de un sistema de recirculación equipado con filtros mecánicos, químicos y biológicos. El agua se mantuvo a una temperatura media de 26 °C y el fotoperiodo ambiental consistió en un ciclo de luz/oscuridad de 14/10.

Los suplementos probióticos y/o postbióticos y el placebo se proporcionaron en cápsulas que contenían 10⁹ ufc o células. El contenido de la cápsula se dividió en dos y para garantizar la ingestión, cada dosis (la mitad del contenido) se suministró a los machos experimentales en el agua de cría 30 minutos antes de cada alimentación habitual (dos veces al día). Estas condiciones de alimentación se mantuvieron durante todo el experimento (4 meses). El personal técnico encargado del mantenimiento, alimentación y bienestar animal desconocía el contenido de las cápsulas. Los grupos experimentales se numeraron del 1 al 7 con ocultación.

Para probar la conducta exploratoria de los animales, se utilizó el *Novel Tank Test* (NTT). Este test permite estudiar la fuerza del instinto de buceo de escape, geotaxis, de un pez en condiciones experimentales específicas, ya que tiene un conflicto entre la conducta de buceo "segura" y la conducta de natación de "exploración". En condiciones normales de laboratorio controladas, los peces generalmente tienden a pasar más tiempo en el fondo del tanque en los primeros minutos de seguimiento, mostrando una mayor tasa de movimientos erráticos y acontecimientos de inmovilidad. Después del período de habituación, los animales exploran gradualmente las zonas superiores de la columna de agua.

El protocolo se realizó dos veces: 2 y 4 meses después del inicio de la ingestión (mdi) de la siguiente manera: cada animal se colocó individualmente en el fondo de un acuario de vidrio cuadrangular (20 × 8 × 18 cm; longitud × anchura × profundidad; volumen de natación: 3,5 l). Los peces se grabaron en vídeo (1920 × 1080 px) durante 6 min. El primer minuto se consideró como tiempo de aclimatación al nuevo entorno y el análisis conductual se consideró durante los 5 min restantes. La actividad natatoria individual se analizó utilizando el programa informático de seguimiento Noldus Ethovision®, generando una cuadrícula virtual que divide el tanque en 2 áreas (superior e inferior; Figura 2).

Para cada animal, se cuantificaron las siguientes estimaciones de conducta exploradora:

- Distancia recorrida.
- Velocidad.
- Preferencia de zona.
- Latencia hasta la primera entrada en la zona superior.

Los resultados se expresan como media ± error estándar. Los datos porcentuales se normalizaron utilizando la transformación de arcoseno de la raíz cuadrada. Las diferencias estadísticas entre los valores medios de cada variable a 2 y 4 mdi se determinaron utilizando una prueba unilateral de la *t* de Student para datos independientes (variables distribuidas normalmente) o una prueba unilateral de Mann-Whitney (variables no paramétricas). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism 9 (programa informático GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.). Los valores de *p* < 0,0500 se consideraron estadísticamente significativos. postbiótico Los experimentos se realizaron utilizando un modelo de ansiedad de *Danio rerio* (pez cebrá). El modelo se basa en la preferencia del pez cebrá por nadar cerca del fondo cuando se le coloca por primera vez en un tanque nuevo. Las diferencias en el tiempo que tardan los peces

antes de abandonar el fondo del tanque y empezar a explorar otras zonas se consideran un reflejo de la ansiedad que sufren. Se analizaron parámetros relacionados con los patrones de natación, la velocidad media de nado y la distribución en el tanque.

Biometría

- 5 Los efectos de la ingesta de probióticos y postbióticos sobre los parámetros biométricos se muestran en la Figura 3. La longitud del pez fue homogénea a 2 mdi. A 4 mdi no se registraron diferencias estadísticamente significativas, aunque los valores medios fueron superiores en todos los animales alimentados con postbióticos, excepto en *L. rhamnosus* BPL15 TC, que fueron similares a los del placebo (Tabla 2).

Tabla 2.- Datos de longitud (cm) a 2 mdi (2m) y 4 mdi (4m).

2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15 TC	
3,64	3,56	3,68	3,67	3,69	3,69	3,49	
3,51	3,64	3,49	3,60	3,41	3,75	3,01	
3,70	3,67	3,67	3,69	3,73	3,59	3,49	
3,65	3,45	3,33	3,87	3,60	3,51	3,56	
3,07	3,64	3,51	3,48	3,46	3,57	3,59	
3,20	3,37	3,57	3,45	3,56	3,86	3,27	
3,38	3,56	3,69	3,42	3,37	3,27	3,55	
3,25	3,76	3,13	3,49	3,68	3,46	3,29	
3,81	3,47	3,27	3,51	3,35	3,79	3,14	
3,47	3,40	3,51	3,42	3,42	3,42	3,30	
	2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15TC
Media	3,467	3,553	3,484	3,559	3,526	3,592	3,369
Desviación Est.	0,2406	0,1282	0,1878	0,1468	0,1432	0,1837	0,1972
Error Est. de la Media	0,07609	0,04053	0,05937	0,04641	0,04529	0,0581	0,06237

10

4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15 TC	
3,83	3,80	3,83	4,18	3,79	3,89	3,43	
3,66	3,88	4,02	3,99	4,01	3,77	3,57	
3,46	4,23	3,77	3,84	4,06	3,55	3,67	
4,09	4,15	3,90	4,12	3,62	4,06	3,79	
4,17	3,96	3,77	3,80	3,97	3,91	3,49	
3,48	4,13	3,82	3,99	4,25	4,00	3,89	
3,80	4,10	4,33	4,10	3,79	3,81	3,97	
4,10	3,74	4,02	4,09	3,92	4,12	3,92	
3,65		4,07	3,82	4,02	4,00	3,48	
			3,90	4,11	3,78	3,76	
	4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15TC
Media	3,804	3,999	3,949	3,984	3,955	3,888	3,698
Desviación Est.	0,2665	0,1785	0,1826	0,1358	0,1825	0,1671	0,1976
Error Est. de la Media	0,08885	0,06312	0,06088	0,04293	0,05772	0,05284	0,06249

El análisis estadístico mostró una promoción del aumento de peso a los 2 mdi ($p=0,0402$) y 4 mdi ($p=0,0140$) en el grupo de *B. longum* ES1 TC en comparación con el del Placebo. Similar a la longitud, el resto de los grupos

experimentales mostraron valores medios no significativos superiores en comparación con el grupo de control a 4 mdi con la exclusión de *L. rhamnosus* BPL15 TC (Tabla 3).

Tabla 3.- Datos de peso (mg) a 2 mdi (2 m) y 4 mdi (4m).

2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15 TC	
451	395	434	446	510	464	391	
365	510	386	389	361	469	249	
452	478	448	427	476	418	418	
441	327	379	667	445	378	451	
247	470	256	423	443	480	444	
255	412	426	415	411	532	334	
358	362	458	392	399	312	340	
328	486	281	371	500	335	391	
475	412	314	401	366	483	410	
369	332	408	373	548	382	377	
	2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15TC
Media	374,1	418,4	379	430,4	445,9	425,3	380,5
Desviación Est.	81,29	65,66	71,56	86,54	62,7	71,7	60,19
Error Est. de la Media	25,71	20,76	22,63	27,37	19,83	22,67	19,03

4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15 TC	
470	524	649	545	629	548	542	
563	580	544	564	412	519	388	
581	401	445	487	590	582	424	
307	607	502	747	514	396	585	
293	611	492	416	616	674	476	
413	441	524	495	511	686	373	
397	638	422	557	652	489	455	
563	392	400	413	609	440	406	
400		436	490	479	541	508	
			492	830	432	364	
	4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15TC
Media	443	524,3	490,4	520,6	584,2	530,7	452,1
Desviación Est.	108,6	100	76,78	94,94	115,3	97,57	74,9
Error Est. de la Media	36,22	35,36	25,59	30,02	36,47	30,85	23,69

5

Cinética

La cinética de los peces estudiados mostró resultados similares entre los grupos (Figura 4). Curiosamente, la distancia total nadada por los peces fue superior en el muestreo de 2 meses en comparación con el de 4 meses, con distancias de aproximadamente 1800-2100 cm (Tabla 4). Las distancias máximas corresponden a peces incluidos en los grupos complementados con la Formulación de Mezcla 004009 y la Formulación de Mezcla 004009 TC en ambos muestreos.

10

ES 3 048 532 T3

Tabla 4. Datos de distancia recorrida (cm) a 2 mdi (2 m) y 4 mdi (4 m).

2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15 TC	
2336,07	2863,3	2161,82	1727,1	1837,66	1850,31	1595,6	
1295,29	2097,92	2718,54	2025,75	2139,18	2032,85	1613,21	
2585,6	2195,38	1680,44	1741,96	1386,78	1476,73	1790,28	
1610,55	1521,24	2655,39	2428,58	2422,06	2173	1261,83	
2589,6	1527,77	2232,37	1781,35	2080,39	1589,78	1616,21	
1673,52	2102,33	2467,86	1870,74	2551,99	1812,32	1749,12	
2246,22	1594,44	1811,2	2145,8	2396,58	2084,04	1380,16	
1964,98	2761,4	2595,32	2482,42	1459,54	1911,36	1712,34	
2020,95	3152,98	2028,39	2121,79	1564,09	1898,12	2219,58	
1202,3	1518,15	1511,91	1526,72	1431,08	1918,34	2717,91	
	2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15TC
Media	1953	2133	2186	1985	1927	1875	1766
Desviación Est.	498,3	613,1	425,4	312,8	449,8	212,3	420,8
Error Est. de la Media	157,6	193,9	134,5	98,91	142,2	67,14	133,1

4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15 TC	
1000,89	2113,04	2164,42	1453,18	1450,05	1525,24	1508,39	
1456,5	1559,55	2149,9	1264,18	866,691	1436,77	1149,8	
1120,89	1452,33	1329,69	1630,14	1521,71	1440,72	1061,08	
894,37	1178,13	1109,79	1414,05	1111,02	1032,66	1747,93	
1239,88	1331,79	1024,4	916,598	1383,02	1494,09	1205,67	
1097,77	1395,21	1461,2	1377,48	1523,16	1470,91	878,877	
891,789	1478,26	1219,8	1853,43	1378,56	1062,15	1537,47	
1829,91	1083,64	1682,24	1384,04	727,87	1410,41	1051,12	
1140,4		1329,51	1870,25	1362,54	1325,47	1344,96	
			1276,46	1247,99	1084,54	1097,05	
	4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15TC
Media	1186	1449	1497	1444	1257	1328	1258
Desviación Est.	298	311,1	420,3	285,1	273,6	193,1	269,6
Error Est. de la Media	99,35	110	140,1	90,16	86,52	61,05	85,25

5 De manera similar a los datos de distancia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cuando se analizó la velocidad de los peces. De manera correlativa, los números más altos de este parámetro correspondieron a los peces de los grupos suplementados con la Formulación de Mezcla (Tabla 5).

Tabla 5. Datos de velocidad (cm/s) a 2 mdi (2 m) y 4 mdi (4 m).

2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1T C	2m_BPL 15	2m_BPL15 TC	
7,79313	9,71796	7,24761	5,80187	6,20830	6,17759	5,36515	
4,31763	6,99679	9,06906	6,76604	7,13060	6,77617	5,37880	
8,65909	7,33751	5,70183	6,00343	4,62938	4,92243	5,99961	
5,38214	5,20119	8,87616	8,38249	8,08001	7,24525	4,25604	
8,63776	5,23209	7,64616	5,97448	7,05789	5,42737	5,38738	
5,57839	7,02275	8,34864	6,28693	8,52140	6,07754	5,98850	
7,52653	5,31975	6,08195	7,34258	8,00569	6,95794	4,67090	
6,60275	9,20712	8,75143	8,28024	4,88337	6,38227	5,71772	
6,73649	10,53940	6,77756	7,07451	5,54328	6,34568	7,43628	
4,00767	5,16378	5,08649	5,12114	4,79263	6,43133	9,07301	
	2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1T C	2m_BPL15	2m_BPL15TC
Media	6,524	7,174	7,359	6,703	6,485	6,274	5,927
Desviación Est.	1,67	2,032	1,419	1,073	1,475	0,6909	1,395
Error Est. de la Media	0,528	0,6425	0,4487	0,3394	0,4665	0,2185	0,441

4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1T C	4m_BPL 15	4m_BPL15 TC	
3,34613	7,05287	7,21667	4,86272	4,8335	5,10045	5,1785	
4,86214	5,1985	7,20475	4,22237	2,88897	4,81942	3,85425	
3,73631	5,10377	4,45188	5,45417	5,07237	4,80368	3,56404	
2,98203	3,94921	3,74222	4,74576	3,75598	3,46855	5,84749	
4,18313	4,4601	3,41968	3,05614	4,64786	5,05238	4,19686	
3,6942	4,65192	5,04209	4,66437	5,09078	4,90304	3,11261	
2,98257	4,92752	4,08779	6,18386	4,60442	3,54239	5,21461	
6,13735	3,62082	5,62545	4,62209	2,42623	4,70135	3,53437	
3,81506		4,44773	6,40058	4,55211	4,50166	4,8993	
			4,55227	4,17277	3,70606	3,72285	
	4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1T C	4m_BPL15	4m_BPL15TC
Media	3,971	4,871	5,026	4,876	4,204	4,46	4,312
Desviación Est.	1,002	1,039	1,4	0,9626	0,9133	0,6375	0,9093
Error Est. de la Media	0,334	0,3673	0,4666	0,3044	0,2888	0,2016	0,2875

Preferencia de zona

5 Teniendo en cuenta los resultados comentados anteriormente sobre la similitud entre los grupos en cuanto a la velocidad y a la distancia recorrida, los siguientes datos son aún más interesantes.

La preferencia de zona en los peces ha mostrado una preferencia estadísticamente significativa en varios de los grupos experimentales estudiados (Figuras 5, 6 y 7).

10 Como se observa en los gráficos (tanto en el total de segundos pasados en la zona superior como en el porcentaje normalizado) los datos a 2 meses de muestreo son realmente prometedores. Cuatro de los grupos alimentados con probióticos o postbióticos registraron diferencias significativas en comparación con el grupo de control:

ES 3 048 532 T3

- Formulación de Mezcla 004009 | p=0,0112
- Formulación de Mezcla 004009 TC | p=0,0024
- *B. longum* ES1 | p=0,0165
- *L. rhamnosus* BPL15 | p=0,0112

5 A 2 mdi, los mejores resultados (Figura 8, Tabla 6) se encontraron en el grupo de Formulación de Mezcla 004009 TC con un valor medio de 106,2 ±14,98 seg en la zona superior, en comparación con el valor de 34,64 ±12,48 seg registrado en el grupo de placebo.

Tabla 6. Tiempo pasado en la(s) zona(s) superior(es) a 2 mdi (2m) y 4 mdi (4m).

2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1T C	2m_BPL 15	2m_BPL15 TC	
73,36	108,6	110,56	46,6	33,24	116,8	109,92	
2,28	156,04	185,76	109,24	17,64	219,36	86,4	
0	166,04	57,72	20	84,48	72,72	0,08	
37,36	62	172,92	94,12	155,24	0	59,84	
0	164,68	83,8	83,2	42,04	93,4	206,56	
89,28	79,8	71,44	71,44	48,04	7,32	40,92	
93	16,16	42	56,64	109,68	116,32	0,64	
0	0	127,84	188,84	6,12	37,84	26,76	
51,08	179,04	85,84	124,92	77,76	203,68	42,4	
0	85,6	124,28	23,04	0	180,4	44,08	
	2m_P	2m_Mezcla	2m_Mezcla TC	2m_ES1	2m_ES1T C	2m_BPL15	2m_BPL15TC
Media	34,64	101,8	106,2	81,8	57,42	104,8	61,76
Desviación Est.	39,46	64,17	47,37	51,07	49,29	78,19	61,27
Error Est. de la Media	12,48	20,29	14,98	16,15	15,59	24,73	19,37

4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1T C	4m_BPL 15	4m_BPL15 TC	
133,88	161,52	124,12	104,32	0,6	135,44	181,6	
88,88	183,4	193,96	153,6	16,76	113,12	88,56	
0	140,16	75,76	101,8	189,32	85,64	130,84	
0,48	138,44	174,08	131,28	170,56	40,56	67,44	
107,64	156,2	42,32	7,68	174,6	107,76	168,68	
185,32	33,4	294	192,92	95,04	4	122,16	
44,64	2,2	110,16	224,6	75,28	11,52	64,68	
139,24	132,88	123,2	102,88	0	15,36	35,4	
57,68		156,64	234,36	106,44	119,56	196,64	
			139,04	111,32	107,28	207,96	
	4m_P	4m_Mezcla	4m_Mezcla TC	4m_ES1	4m_ES1T C	4m_BPL15	4m_BPL15TC
Media	84,2	118,5	143,8	139,2	93,99	74,02	126,4
Desviación Est.	63,9	64,72	73,34	67,28	71,32	50,69	60,97
Error Est. de la Media	21,3	22,88	24,45	21,28	22,55	16,03	19,28

10

Los resultados a los 4 meses después de la ingestión proporcionaron exclusivamente diferencias estadísticamente significativas en el grupo de Formulación de Mezcla 004009 TC (p=0,0423) y *B. longum* ES1 (p=0,0429). Estos dos grupos experimentales incluyen en el muestreo a los peces con mayores porcentajes en la zona superior del tanque (Figura 8, Tabla 7).

ES 3 048 532 T3

2m_P	2m_Mezcla	2m_MezclaTC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15TC	
0	0	0,38346963	0,26113964	0	0	0,01632957	
0	0,23421192	0,45404537	0,28078472	0,14330915	0,15683661	0,04620139	
0	0,47189571	0,50974762	0,40508589	0,24491208	0,36305265	0,30327125	
0	0,54184542	0,55681456	0,44946358	0,33931774	0,51474033	0,37825495	
0,08728297	0,56347848	0,56436393	0,50974762	0,38366269	0,59189599	0,38538675	
0,36063629	0,64553324	0,6523164	0,55458321	0,41166958	0,67211343	0,39335964	
0,42531348	0,80546755	0,69918256	0,59448494	0,53411849	0,67375375	0,46294724	
0,51722545	0,83433626	0,71120317	0,6477511	0,55933678	0,8873563	0,56642749	
0,57697437	0,83889316	0,86202071	0,70134686	0,64927381	0,96829255	0,65010421	
0,59045569	0,88273175	0,90567171	0,9162704	0,80279968	1,0256388	0,97861312	
	2m_P	2m_Mezcla	2m_MezclaTC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15TC
Media	0,2558	0,5818	0,6299	0,5321	0,4068	0,5854	0,4181
Desviación Est.	0,2611	0,2883	0,1692	0,1983	0,2407	0,3379	0,2805
Error Est. de la Media	0,08255	0,09116	0,0535	0,06272	0,07611	0,1069	0,08871

Tabla 7. Tiempo pasado en la zona superior (% normalizado) a 2 mdi (2m) y 4 mdi (4m).

4m_P	4m_Mezcla	4m_MezclaTC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15TC	
0	0,08573419	0,38500479	0,16067989	0	0,11572065	0,35062835	
0,04000805	0,34016593	0,52648075	0,62178171	0,04473326	0,19722223	0,48283985	
0,3959882	0,72814715	0,65093423	0,62557859	0,23860308	0,22823551	0,4939406	
0,45387664	0,74676473	0,69552703	0,63062529	0,52463738	0,37650341	0,57434764	
0,57551559	0,75251246	0,69864149	0,72277658	0,59778453	0,56362684	0,69200199	
0,64220061	0,80600099	0,80746933	0,74877041	0,63802663	0,6409492	0,72129772	
0,73150085	0,8237638	0,86593496	0,7973313	0,65493999	0,64261755	0,84775166	
0,74943817	0,89758922	0,93402425	0,93040326	0,85407187	0,66113904	0,89144443	
0,9041628		1,42843216	1,04554444	0,86769119	0,68316737	0,94339337	
			1,08391513	0,91792756	0,73672734	0,98366104	
	4m_P	4m_Mezcla	4m_MezclaTC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15TC
Media	0,4992	0,6476	0,7769	0,7367	0,5338	0,4846	0,6981
Desviación Est.	0,3122	0,2819	0,2964	0,2638	0,3338	0,2324	0,2176

Error Est. de la Media	0,1041	0,09966	0,09881	0,08341	0,1055	0,07348	0,06881
------------------------	--------	---------	---------	---------	--------	---------	---------

Los datos de preferencia de zona se analizaron centrándose en el número de animales que apenas pasan tiempo en la parte superior del tanque, estableciendo un umbral de 30 seg (10 %) de la NTT total (Tabla 8).

5 **Tabla 8.** % de tiempo (datos porcentuales sin procesar) que, durante el *Novel Tank Test*, pasaron los peces en la zona superior. Los datos se han organizado de menor a mayor y se ha aplicado una condición codificada por colores para facilitar la interpretación. Código de grupo experimental: P) Placebo; Mezcla) Formulación de mezcla 0044009; MezclaTC) Formulación de mezcla 004009 TC; ES1) *B. longum* ES1; ES1TC) *B. longum* ES1 TC; BPL15) *L. rhamnosus* BPL15 TC; BPL15TC) *L. rhamnosus* BPL15

2m_P	2m_Mezcla	2m_MezclaTC	2m_ES1	2m_ES1TC	2m_BPL15	2m_BPL15TC
0,00	0,00	14,00	6,67	0,00	0,00	0,03
0,00	5,39	19,24	7,68	2,04	2,44	0,21
0,00	20,67	23,81	15,53	5,88	12,61	8,92
0,00	26,60	27,93	18,88	11,08	24,24	13,64
0,76	28,53	28,61	23,81	14,01	31,13	14,13
12,45	36,20	36,85	27,73	16,01	38,77	14,69
17,03	52,01	41,43	31,37	25,92	38,93	19,95
24,45	54,89	42,61	36,41	28,16	60,13	28,80
29,76	55,35	57,64	41,64	36,56	67,89	36,64
31,00	59,68	61,92	62,95	51,75	73,12	68,85

4m_P	4m_Mezcla	4m_MezclaTC	4m_ES1	4m_ES1TC	4m_BPL15	4m_BPL15TC
0,00	0,73	14,11	2,56	0,00	1,33	11,80
0,16	11,13	25,25	33,93	0,20	3,84	21,56
14,88	44,29	36,72	34,29	5,59	5,12	22,48
19,23	46,15	41,07	34,77	25,09	13,52	29,52
29,63	46,72	41,37	43,76	31,68	28,55	40,72
35,88	52,07	52,21	46,35	35,48	35,76	43,61
44,63	53,84	58,03	51,20	37,11	35,92	56,23
46,41	61,13	64,65	64,31	56,85	37,71	60,53
61,77		98,00	74,87	58,20	39,85	65,55
			78,12	63,11	45,15	69,32

10 Después de 2 meses de ingesta de probióticos o postbióticos, el porcentaje más bajo de animales que muestran este tipo de conducta se encuentra en los grupos de Formulación Mezcla 004009 y Formulación Mezcla 004009 TC. Al contrario, la mayor proporción de estos individuos se registró en el grupo de Placebo.

15 Cuatro meses después del inicio del experimento, estos dos grupos mantienen esta tendencia mientras que el porcentaje se reduce en *B. longum* ES1 y *L. rhamnosus* BPL15 en comparación con el muestreo anterior (Figura 9).

Latencia hasta la primera entrada en la zona superior

Normalmente, cuando se introduce un pez en un tanque nuevo, su preferencia inicial durante el período de aclimatación al nuevo entorno suele ser el fondo del tanque.

20 Después de 1 minuto de aclimatación, se cuantificó la latencia que mostraron los animales de cada grupo experimental. Como puede observarse en la Figura 9, en el muestreo de 2 meses, en el grupo de Placebo, 4 peces no alcanzaron la zona superior y, en dos de ellos, la latencia a la subida se retrasó por encima de los 2 minutos. En otros grupos,

especialmente en el de la Formulación de Mezcla 004009, la Formulación de Mezcla 004009 TC y *B. longum* ES1, la latencia de los peces en su primera entrada fue globalmente menor.

Después de 4 meses de complementación con probióticos o postbióticos, la tendencia se suavizó en el grupo de Placebo aunque continuó mostrando valores más bajos en los grupos mencionados anteriormente, especialmente en el de la Formulación de Mezcla 004009 TC donde hasta 4 peces ya están en la zona superior al principio de la grabación después de un minuto.

Ejemplo 2. EXPERIMENTOS EN *C. ELEGANS*

C. elegans se ha convertido en un buen modelo para el estudio de la esperanza de vida, obesidad y síndrome metabólico. Además, se ha utilizado como modelo sencillo para analizar muchas conductas, que revelan deterioro cognitivo (aprendizaje y memoria, AD, PD), o aspectos modelo de diversos trastornos psiquiátricos (Dwyer DS. Crossing the Worm-Brain Barrier by Using *Caenorhabditis elegans* to Explore Fundamentals of Human Psychiatric Illness. *Mol Neuropsychiatry*. 2018, 3:170-179). En *C. elegans*, los neurotransmisores y neuropéptidos son similares a los del sistema nervioso de los mamíferos (dopamina, GABA, acetilcolina, serotonina, etc.), y el nematodo muestra una notable plasticidad conductual, similar a la del aprendizaje y la memoria en los mamíferos.

Las funciones básicas como el desarrollo, la alimentación y el movimiento, están controlados por el sistema nervioso.

En el presente documento, se evaluó una mezcla postbiótica tratada con calor compuesta por *B. longum* CECT7347 (ES1) y *L. rhamnosus* CECT8361 (BPL15) en los modelos de ansiedad y estrés de *C. elegans*. La mezcla se evaluó a una concentración final de 1×10^8 células/placa ($0,5 \times 10^8$ células/placa BPL15-TC + $0,5 \times 10^8$ células/placa ES1-TC).

Modelo de ansiedad

La percepción de estímulos estresantes o repelentes es el primer componente de la conducta ansiosa en los seres humanos, que a su vez está controlada por la amígdala, el eje HHS (hipotalámico-hipofisario-suprarrenal) y neuromoduladores (p. ej., serotonina).

La ruta de la serotonina subyace a la conducta aversiva de *C. elegans*, mediando en la evitación al odorizante repelente, octanol. Por lo tanto, se utilizó la conducta de evitación como una conducta relacionada con la ansiedad en *C. elegans*.

Los ensayos de ansiedad se realizaron mediante el ensayo de conducta de evitación. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el ensayo de "olfateo en una tira" descrito anteriormente (Chao, M. Y., *et al.* 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26;101(43):15512-7. doi: 10.1073/pnas.0403369101. Epub 2004 Oct 18. PMID: 15492222; PMCID: PMC524441). "Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15512-15517). En los ensayos de evitación de octanol, el extremo romo de un pincel Loew-Cornell (Teaneck, NJ) 9000 Kolinsky 7, pegado a una pipeta Pasteur, se sumergió en octanol al 30 % recién preparado y se colocó frente a un nematodo que avanzaba, la cantidad de tiempo que tardó el gusano en comenzar a retroceder (evitación de octanol) se midió utilizando un cronómetro de laboratorio.

Para la condición de ansiedad, los nematodos se incubaron en placas de NGM (*Nematode Growth Medium*, medio de crecimiento de nematodos) sin OP50. Esta privación de alimento provocó un aumento de la ansiedad debido a una disminución de los niveles de serotonina (Chao, M. Y., *et al.* 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26;101(43):15512-7. doi: 10.1073/pnas.0403369101. Epub 2004 Oct 18. PMID: 15492222; PMCID: PMC524441). Esta condición de ansiedad indujo un aumento del tiempo necesario para que el nematodo retrocediera el estímulo de octanol.

La Figura 10 representa el tiempo que tardan los nematodos en iniciar el movimiento de retroceso cuando huelen el octanol. Como se ha indicado anteriormente, los gusanos ansiosos de control sin comida, tardan más en evitar el octanol que los nematodos en condiciones de control con OP50. Los nematodos incubados con la mezcla de *L. rhamnosus* CECT8361 tratada con calor y de *B. longum* CECT7347 tratada con calor (BPL15-TC+ES1-TC), redujeron significativamente el tiempo de evitación (valor de $p < 0,05$) con privación de alimento. Por lo tanto, la mezcla de *L. rhamnosus* CECT8361 tratada con calor y de *B. longum* CECT7347 tratada con calor (BPL15-TC+ES1-TC), contrarrestó la conducta relacionada con la ansiedad provocada por la falta de alimento.

Modelo de estrés

La locomoción de *C. elegans* se caracteriza por ondas sinusoidales a través de la contracción muscular, que está mediada por la acetilcolina (neurotransmisor excitador).

En este experimento, se aplicó una estimulación colinérgica con el fármaco Denubil, para analizar la conducta exploradora del nematodo en condiciones de estrés y evaluar cómo la mezcla tratada con calor de *L. rhamnosus* CECT8361 tratada con calor y de *B. longum* CECT7347 tratada con calor (BPL15-TC+ES1-TC) afectaba a este patrón de conducta.

Las placas se dividieron en tres regiones concéntricas, <0,9 cm, 0,9-1,8 cm y 1,8-2,8 cm. Los nematodos se colocaron en el centro de la placa y después de 2 min se puntuó su posición en los diferentes lugares.

5 La Figura 11 muestra la distribución de gusanos en condiciones de alimentación, incluyendo las poblaciones de control (no estresadas) y estresadas. En condiciones controladas, los nematodos tienden a acumularse en el centro de las placas, mientras que cuando se estresan con el fármaco psicoestimulante, los nematodos tienden a dispersarse por los bordes de las placas. Además, los nematodos alimentados con la mezcla de *L. rhamnosus* CECT8361 tratada con calor y *B. longum* CECT7347 tratada con calor (BPL15-TC+ES1-TC) recuperan el patrón de conducta observado en el control no estresado (valor de $p < 0,001$), acumulándose de nuevo en el centro de las placas (y no dispersándose).

Ejemplo 3. ENSAYOS COMPARATIVOS ENTRE DIFERENTES MEZCLAS DE CEPAS DE *L. RHAMNOSUS* Y *B. LONGUM* TRATADAS CON CALOR

15 **Cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum***

Dos cepas pertenecientes a *Bifidobacterium longum* (BPL33 y BPL31), y dos especies de *Lactobacillus rhamnosus* (BPLA3 y BPL8) se obtuvieron de la colección del solicitante, en concreto, de la colección de Biopolis S.L. y se evaluaron en el modelo de ansiedad de *C. elegans*. Todas las cepas se evaluaron en su forma tratada con calor.

20 Se analizaron cuatro combinaciones diferentes:

- *B. longum* BPL33-TC + *L. rhamnosus* BPLA3-TC
- *B. longum* BPL33-TC + *L. rhamnosus* BPL8-TC
- 25 • *B. longum* BPL31-TC + *L. rhamnosus* BPLA3-TC
- *B. longum* BPL31-TC + *L. rhamnosus* BPL8-TC

Para el análisis comparativo, se incluyó una condición adicional con la mezcla de *B. longum* ES1-TC + *L. rhamnosus* BPL15-TC de la invención, para la ansiedad.

30 **Modelo de ansiedad en *C. elegans***

La evitación de octanol se utilizó como ensayo de conducta relacionada con la ansiedad en *C. elegans*. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el ensayo de "olfateo en una tira". En los ensayos de evitación de octanol, el extremo romo de un pelo (pincel Loew-Cornell (Teaneck, NJ) 9000 Kolinsky 7) pegado con cinta adhesiva a una pipeta Pasteur, se sumergió en octanol al 30 % recién preparado en EtOH (vol/vol) y se colocó frente a un nematodo que se avanzaba. Se midió la cantidad de tiempo que tardaban los gusanos en retroceder. Los nematodos en condición de control se mantuvieron en NGM con *E. coli* OP50. Los animales se transfirieron a placas de NGM sembradas con 100 µl de *E. coli* OP50 reciente durante la noche. Los nematodos se incubaron durante 20 min. en estas placas antes de realizar la prueba. Para la condición de ansiedad, los nematodos se incubaron durante 20 min en placas de NGM sin OP50. Esta privación de alimento induce conductas relacionadas con la ansiedad debido a una disminución de los niveles de serotonina. Para evaluar los tratamientos, los nematodos *wild-type* se sincronizaron por edad en placas de NGM complementadas con la mezcla correspondiente de dos cepas tratadas con calor a 10⁸ células (dosis final). En el estadio de adulto joven, los nematodos se transfirieron a placas de NGM con cada tratamiento pero sin alimento durante 30 min. Más tarde, los gusanos se colocaron en placas de NGM sin OP50 y con cada tratamiento y se analizaron 20 min. después. Se representa el porcentaje de tiempo de reducción de respuesta al octanol en comparación con ansioso control.

50 **Resultados**

La conducta de evitación en respuesta al octanol en *C. elegans* como una conducta relacionada con la ansiedad, se utilizó para evaluar las diferentes mezclas con cepas alternativas de *B. longum* y *L. rhamnosus*.

55 En este ensayo, los gusanos control ansiosos tardan más en evitar el octanol que los nematodos en condiciones de control (NGM, control sin ansiedad). Los resultados representan los porcentajes relativos de cada tratamiento frente a la población de control ansiosa (Figura 12).

Los resultados indican que la mezcla de cepas tratadas con calor con ES1 y BPL15 (la composición de la invención) proporcionó una reducción del 34 % del tiempo de respuesta cuando se presentó el octanol a los gusanos, mostrando un elevado efecto positivo en la reducción de la conducta ansiosa, mientras que las otras cuatro mezclas sólo mostraron una reducción de entre un 8 y un 14 % (Figura 12 y Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de reducción del tiempo a la conducta de evitación (modelo de ansiedad) en *C. elegans* obtenido con las diferentes mezclas incluidas en este estudio. Mezclas de ES1-TC + BPL15-TC sobre la conducta de evitación.

65

Combinación de cepas	% de reducción del tiempo de respuesta al octanol (seg) frente a ansioso control
ES1-TC + BPL15-TC (1x10 ⁸ células)	34,15
BPL33-TC + BPLA3-TC (1x10 ⁸ células)	8,40
BPL33-TC + BPLA8-TC (1x10 ⁸ células)	13,91
BPL31-TC + BPLA3-TC (1x10 ⁸ células)	13,40
PL31-TC + BPL8-TC (1x10 ⁸ células)	13,76

Por lo tanto, estos resultados indican que la mezcla de cepas de la presente invención tiene un efecto sorprendentemente mejor que el de otras mezclas de cepas de estas especies.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Composición postbiótica que comprende la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 no viable y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 no viable.
2. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cepas no viables de *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus* están tratadas con calor.
- 10
3. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la composición postbiótica es una composición farmacéutica o una composición nutricional.
4. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15
5. La composición postbiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde la composición está formulada en forma líquida o en forma sólida.
- 20
6. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la formulación sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, pastillas para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicle, cápsulas, sobres, polvos, geles, granulados, partículas recubiertas o comprimidos recubiertos, comprimidos y comprimidos y cápsulas gastrorresistentes y tiras y películas dispersables.
- 25
7. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la formulación líquida se selecciona del grupo que consiste en soluciones orales, suspensiones, gotas, emulsiones y jarabes.
- 30
8. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición nutricional es un alimento o un suplemento nutricional.
- 35
9. Composición postbiótica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el alimento se selecciona del grupo que consiste en zumos de fruta o verdura, helado, fórmula infantil, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de panadería, productos lácteos, productos cárnicos y bebidas.
- 40
10. Composición postbiótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la concentración total de *B. longum* y *L. rhamnosus* en la composición es de entre 10^3 y 10^{12} células.
11. Composición postbiótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso como un medicamento.
12. Composición postbiótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos de ansiedad.

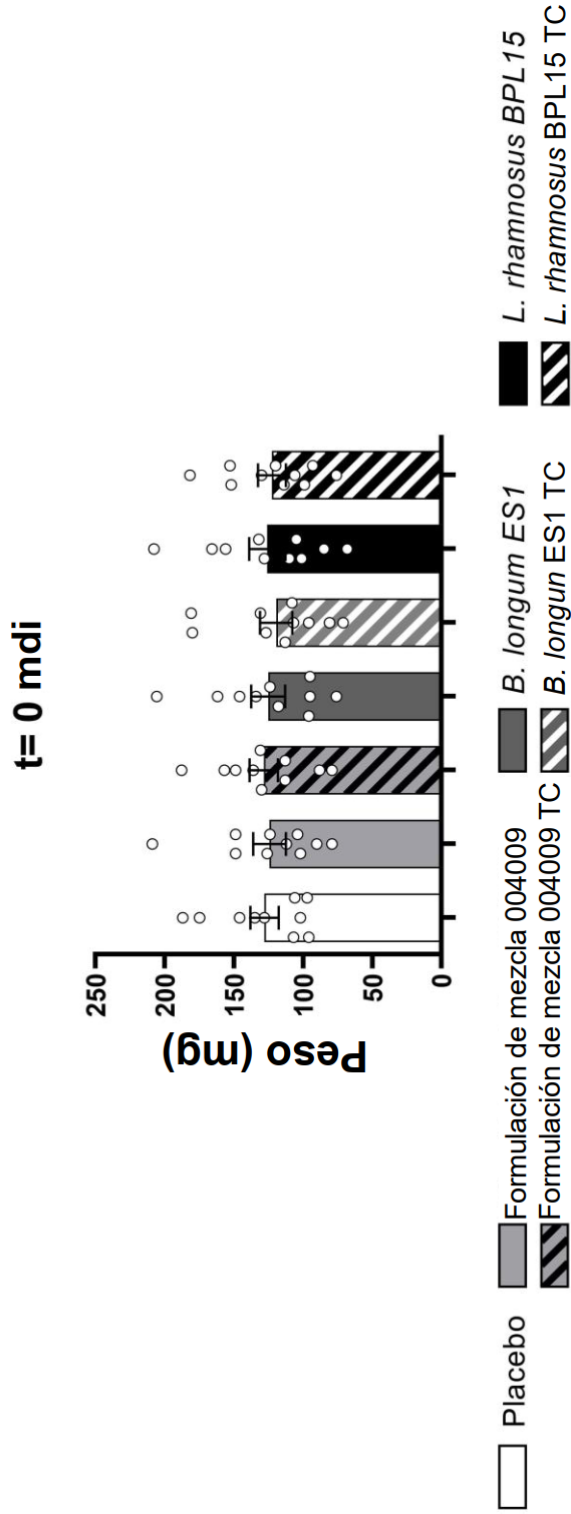


FIG. 1

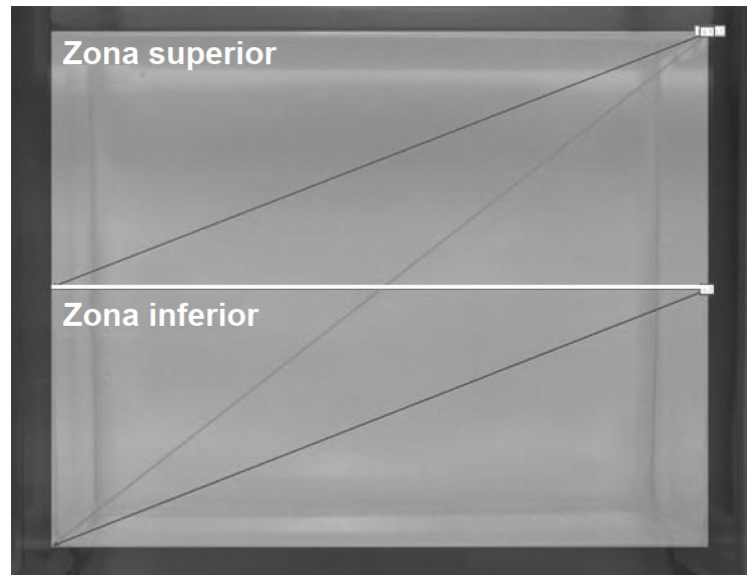


FIG. 2

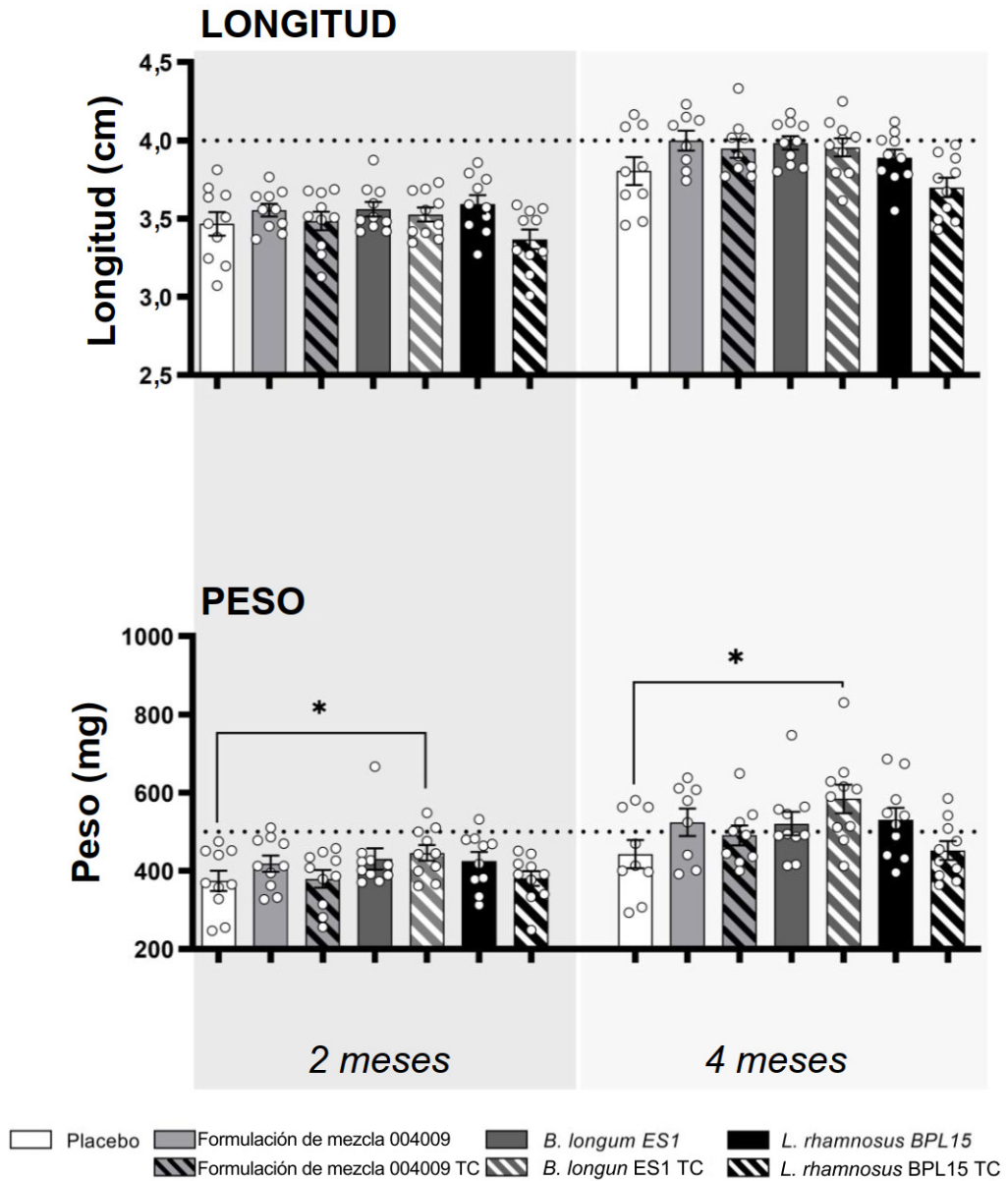


FIG. 3

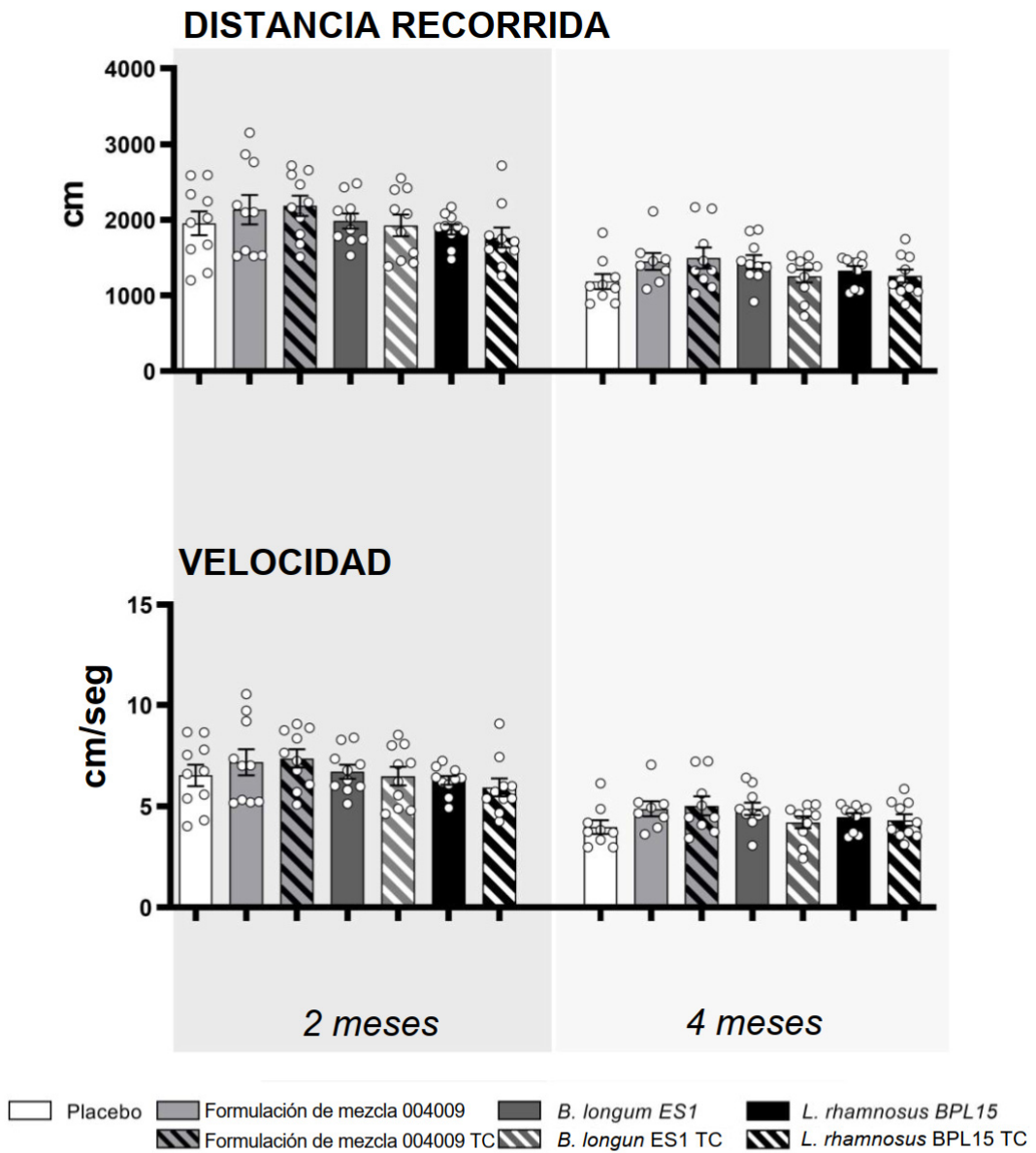


FIG. 4

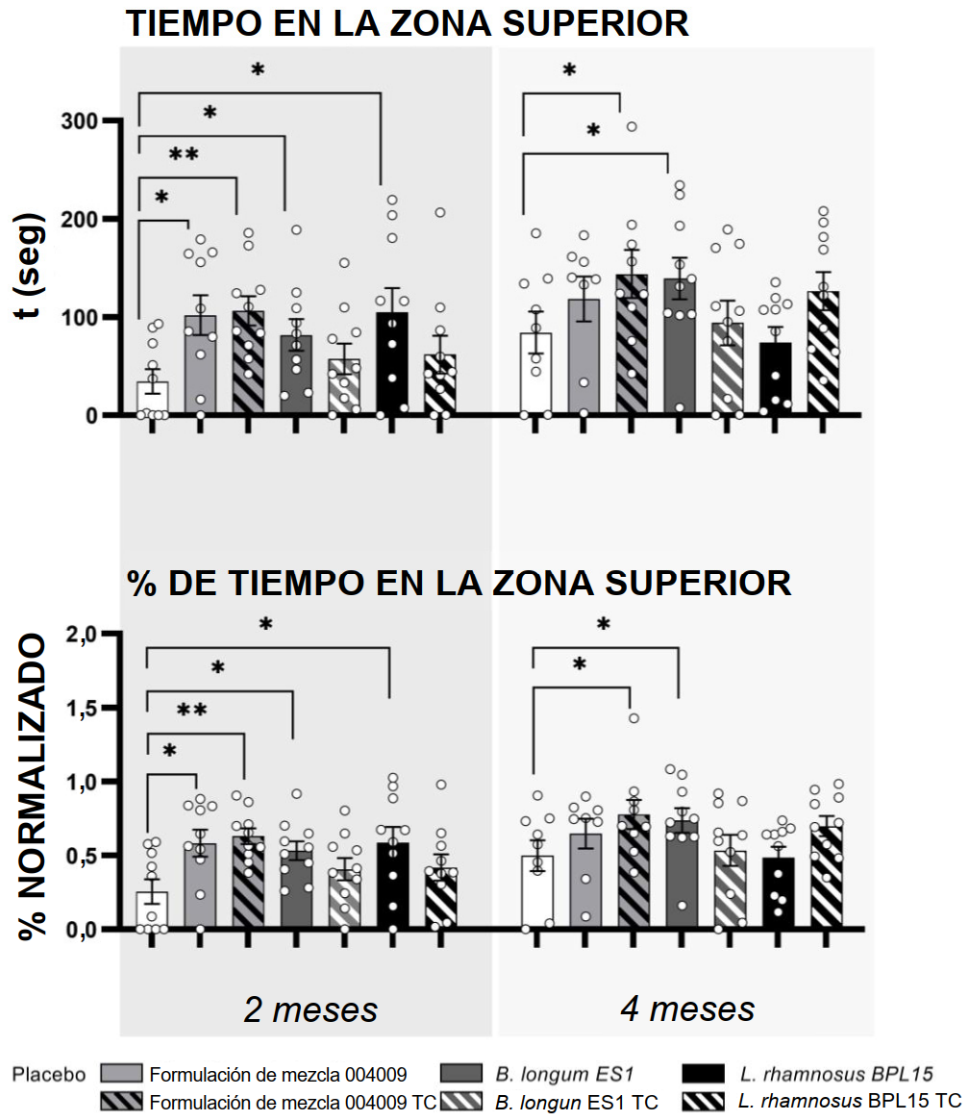
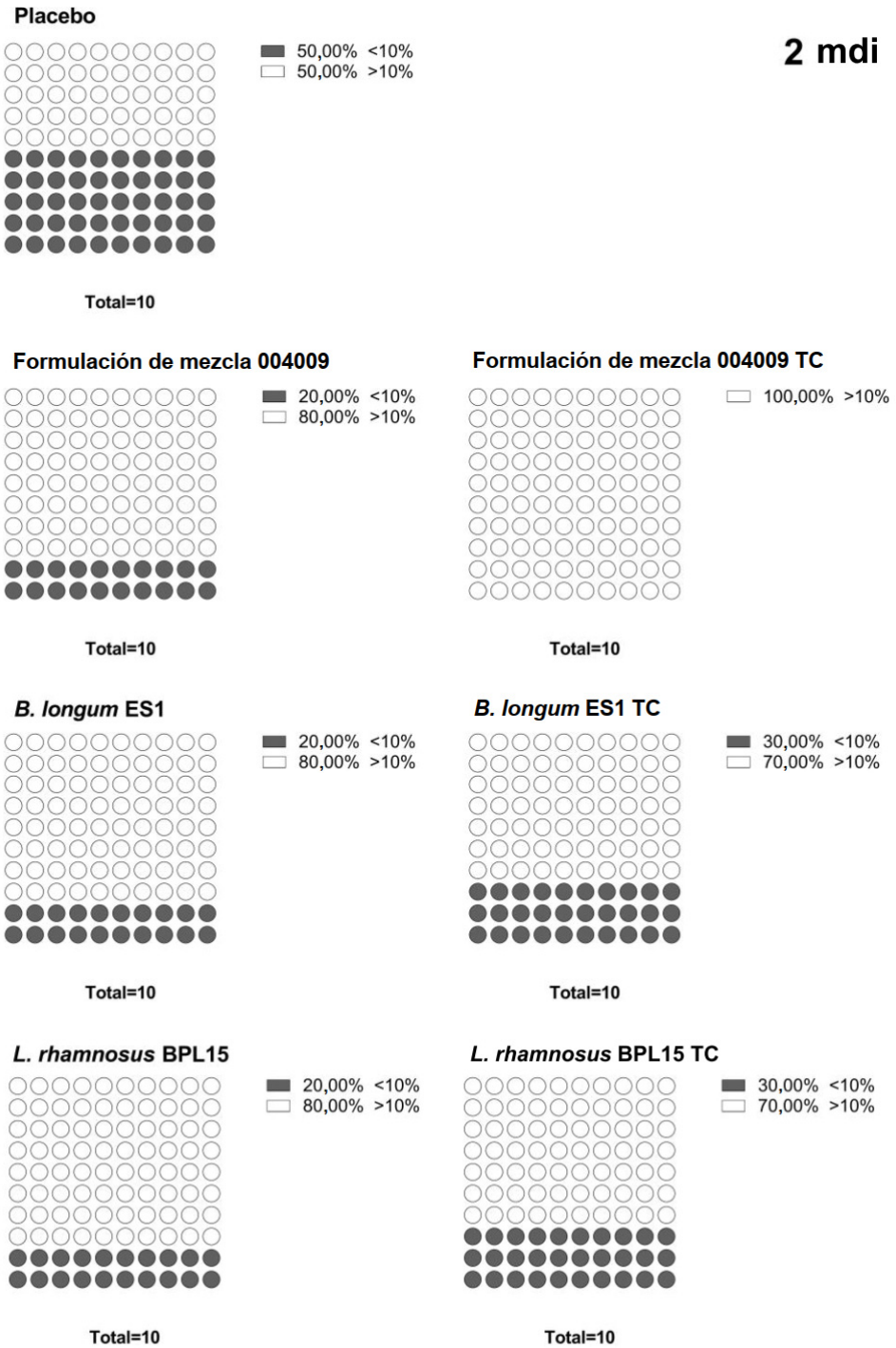
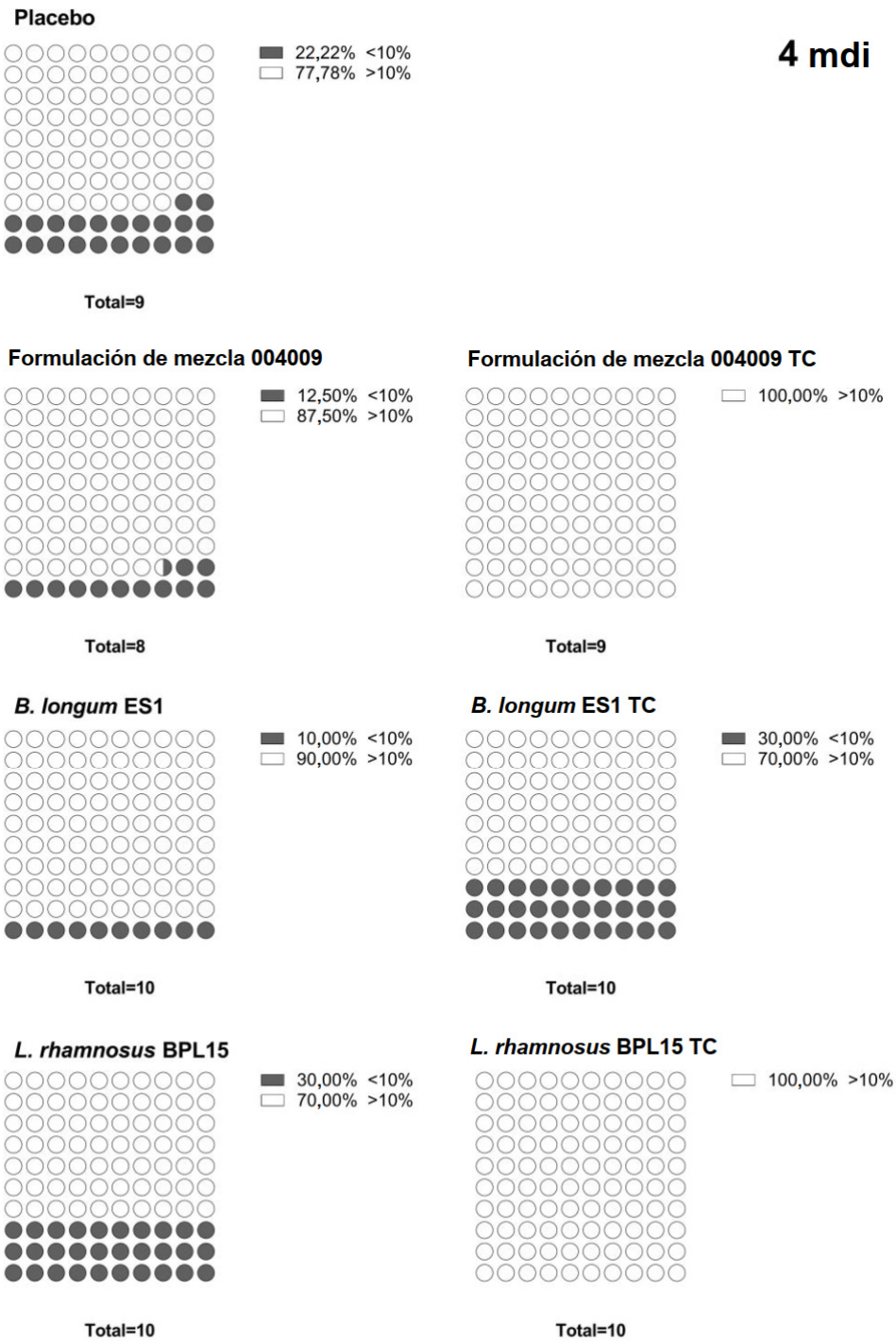


FIG. 5



A

FIG. 6



B

FIG. 6 continuación

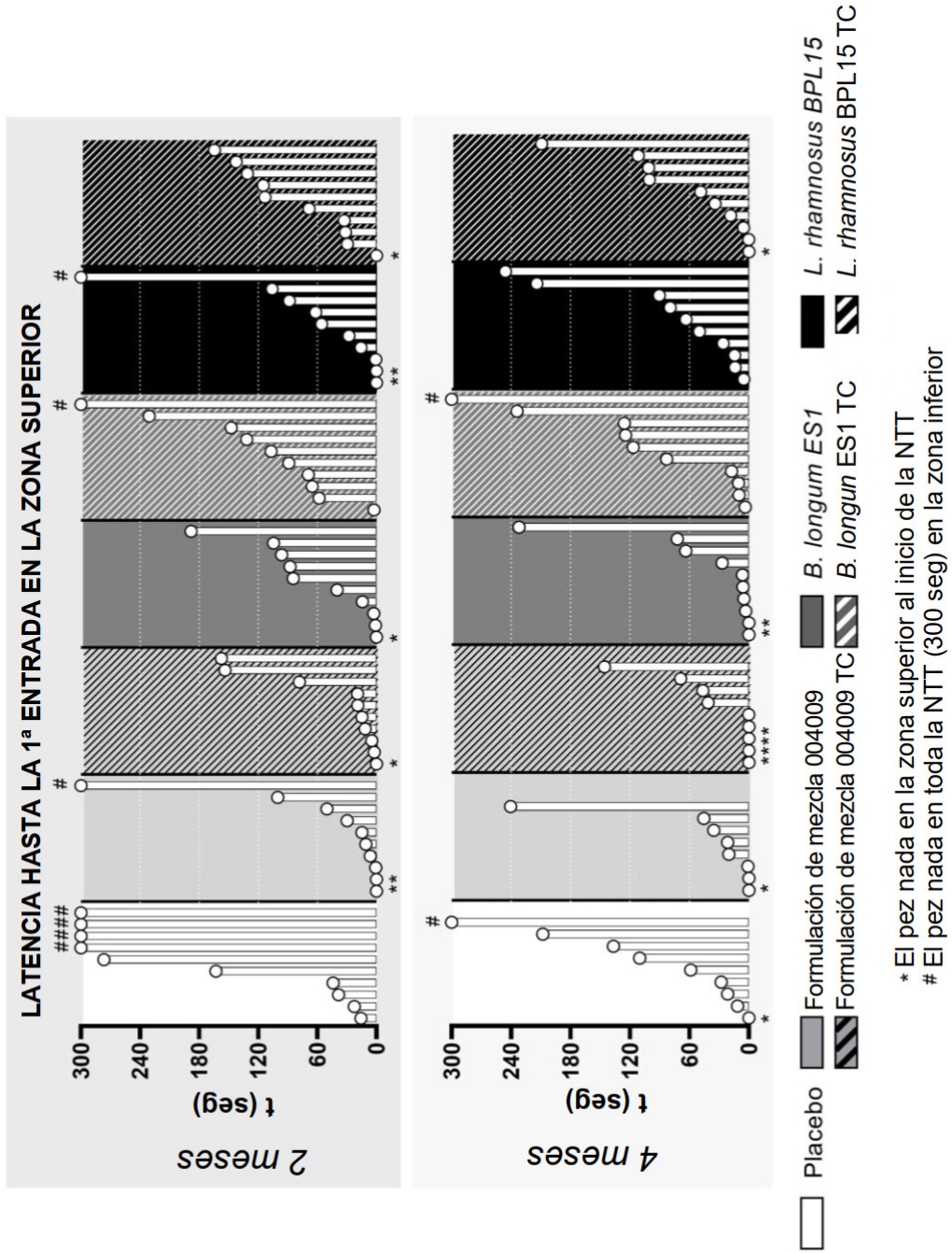


FIG. 7

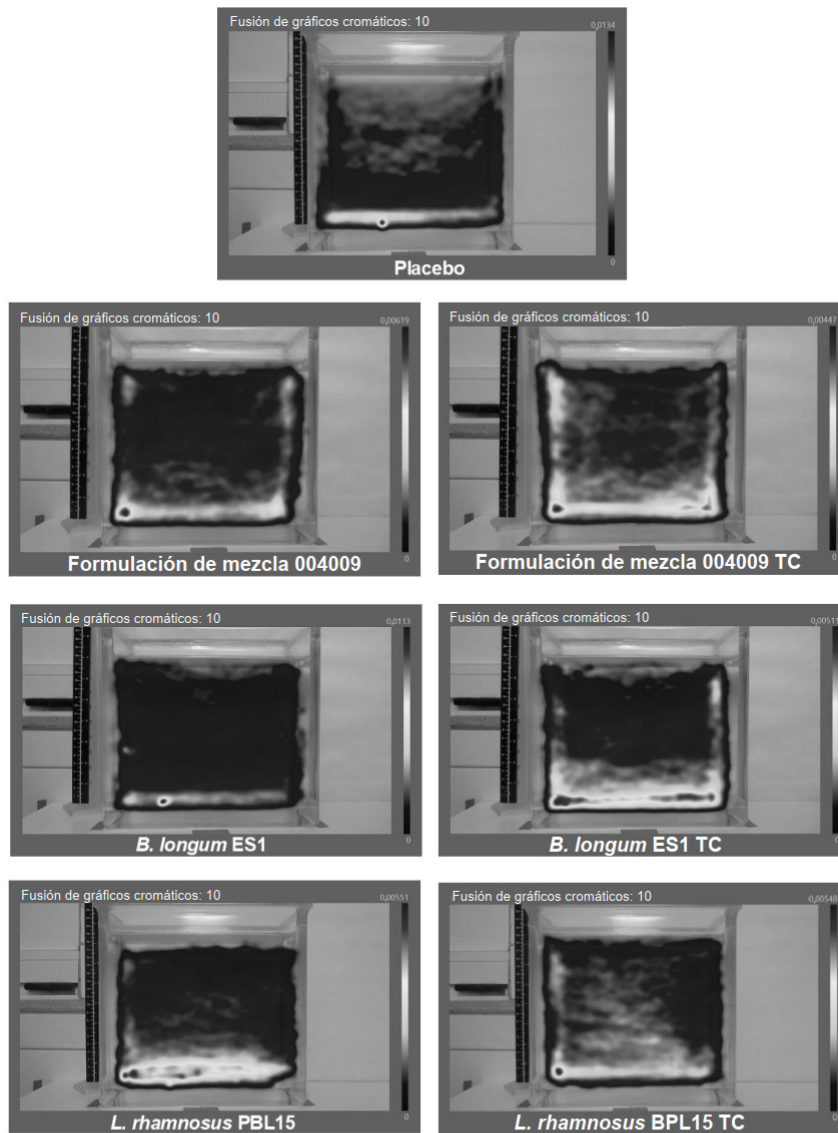


FIG. 8

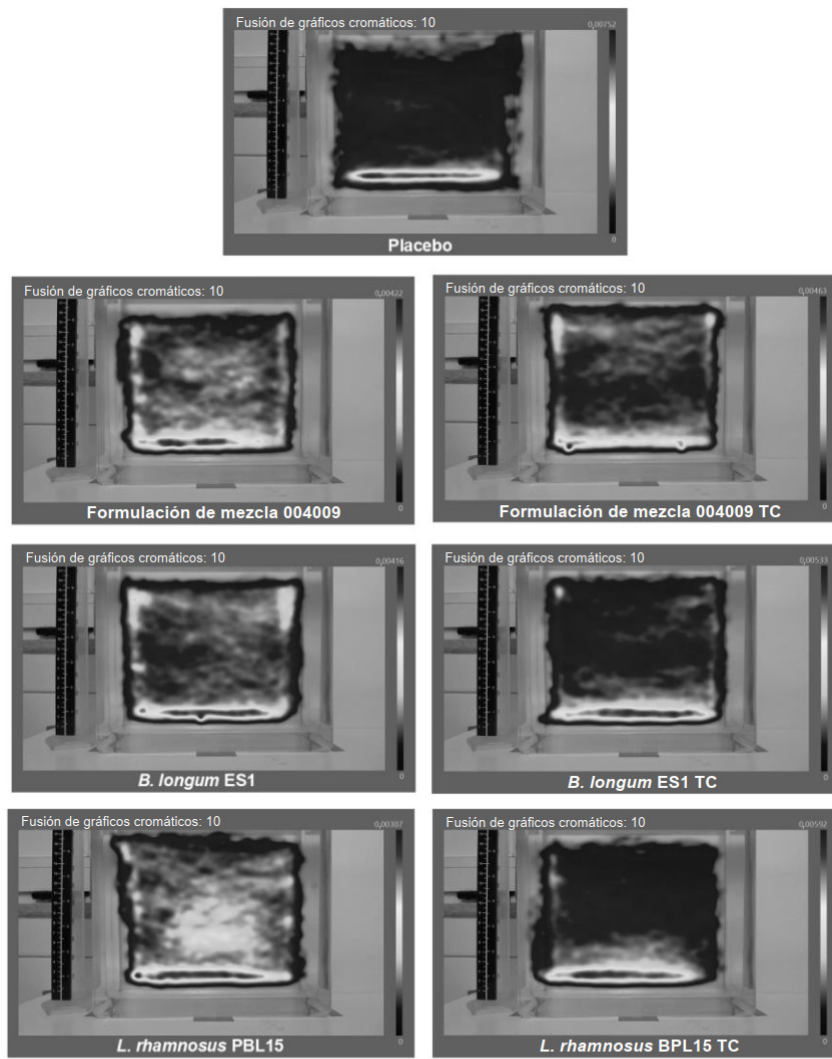


FIG. 9

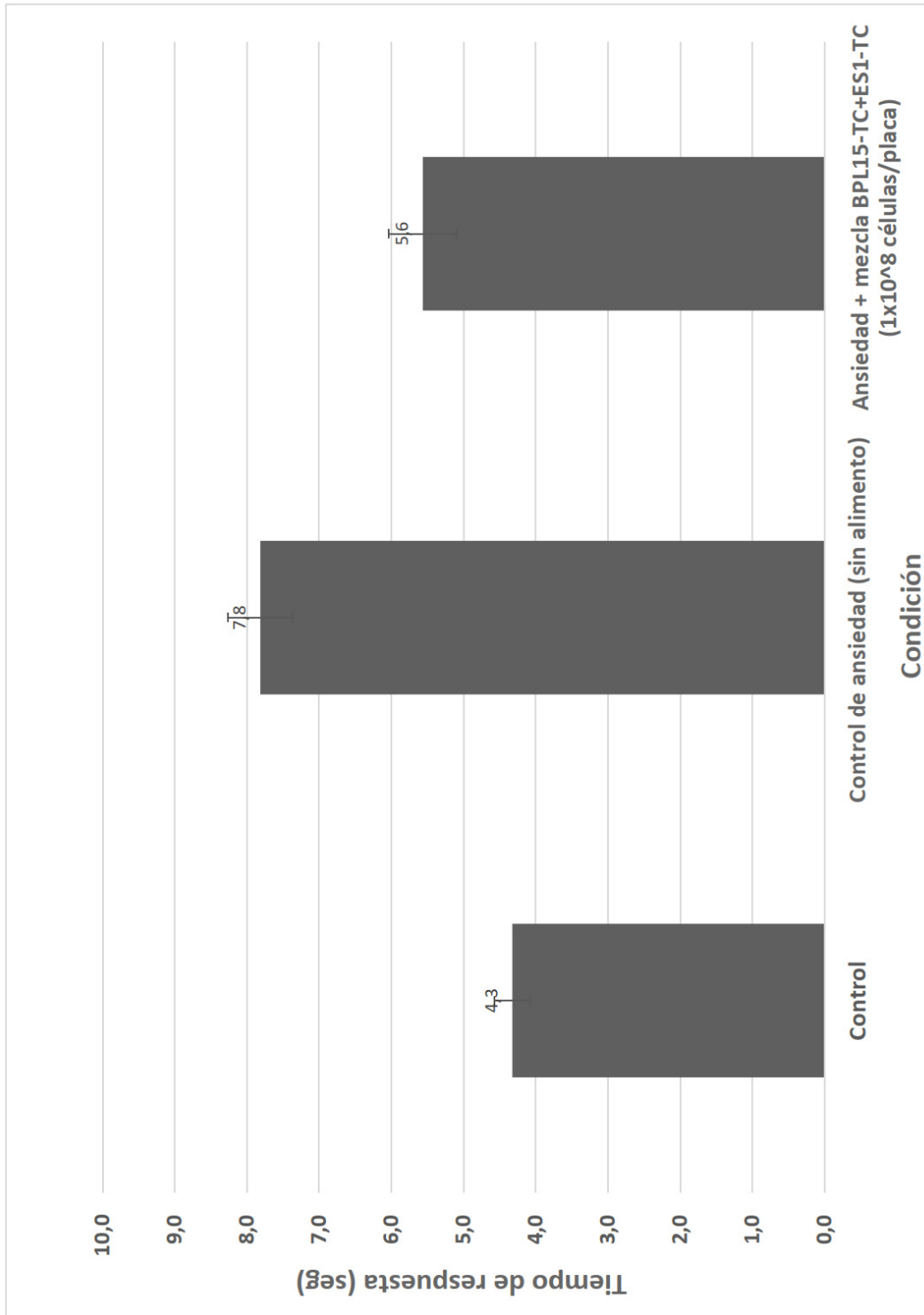


FIG. 10

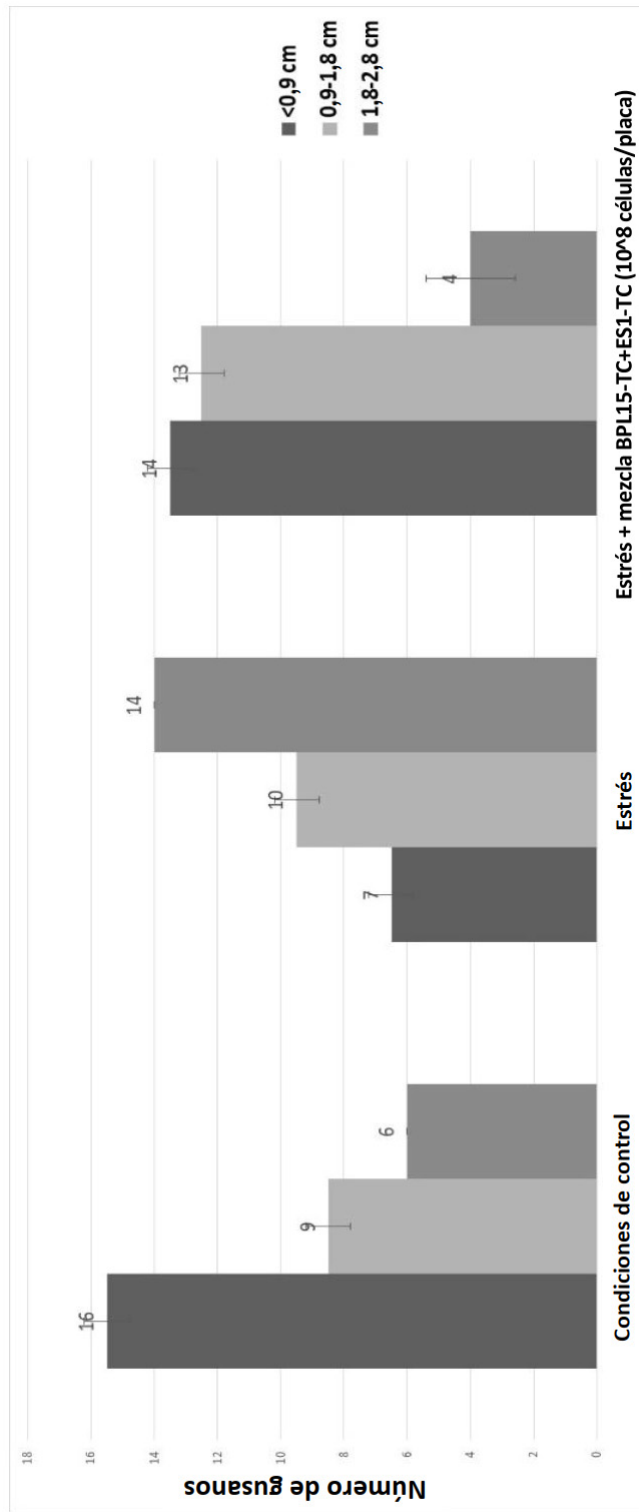


FIG. 11

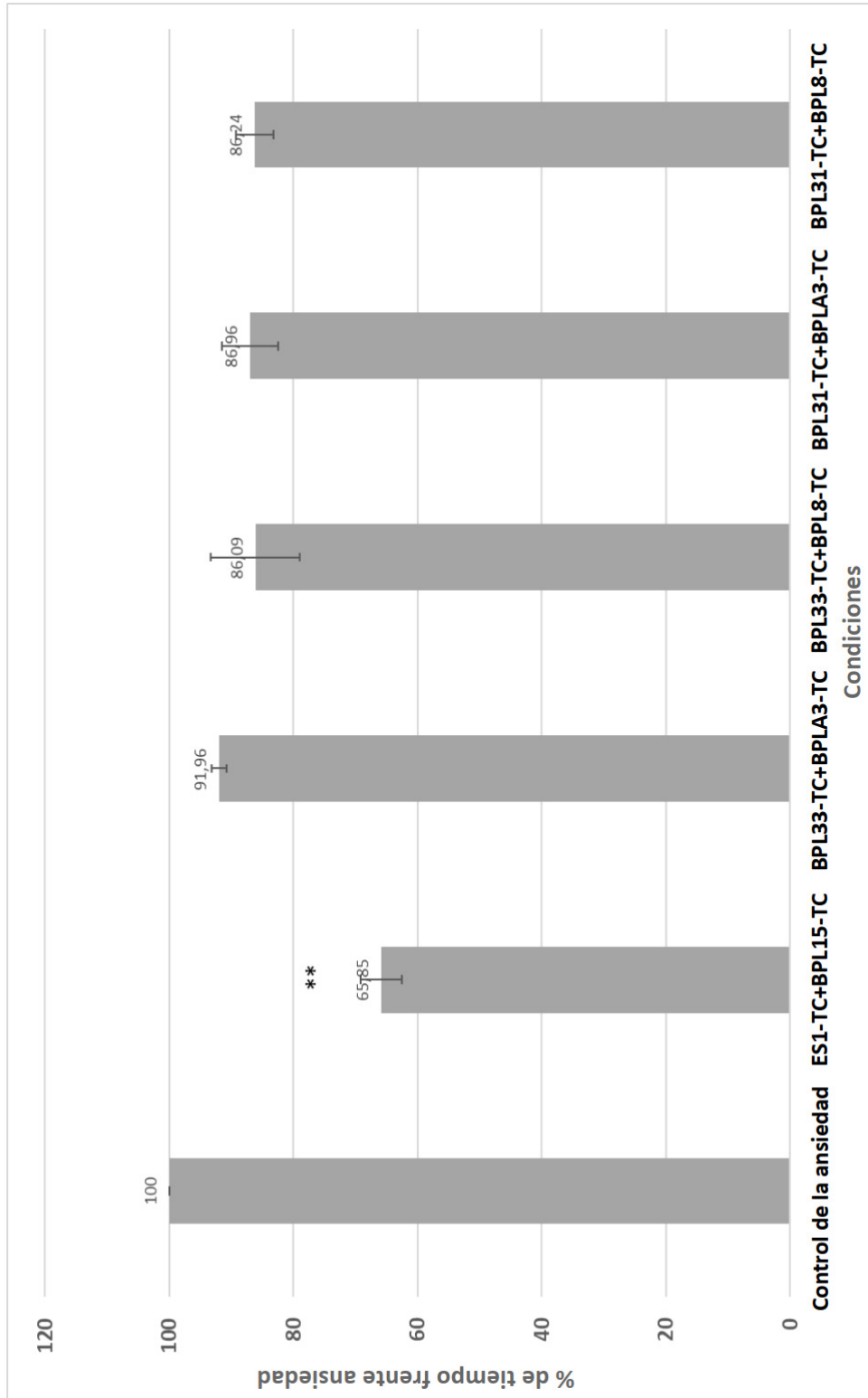


FIG. 12