

Cepa de *Bifidobacterium longum* y usos de la misma

La presente invención se encuadra dentro del campo de la actividad terapéutica de composiciones o preparaciones farmacéuticas, así como dentro del campo de la alimentación. En particular, la presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 30763 y a su uso para la prevención o el tratamiento de alteraciones del estado del ánimo, como la depresión y la ansiedad, trastornos cardiometabólicos o trastornos hepáticos, solas o presentadas como comorbilidades.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

Los trastornos mentales, como la depresión y la ansiedad, y los trastornos cardiometabólicos, como las enfermedades cardiovasculares, la fibrosis hepática y la diabetes de tipo 2, están entre las principales causas de discapacidad, morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Estas enfermedades presentan una alta tasa de comorbilidad, es decir que se presentan simultáneamente. La depresión y la ansiedad se presentan conjuntamente en alrededor de un 50% de casos. Estas patologías psiquiátricas también aumentan el riesgo de sufrir alteraciones cardiometabólicas (como el síndrome metabólico, diabetes y las enfermedades cardiovasculares) y alteraciones hepáticas, y viceversa, por lo que frecuentemente se presentan simultáneamente. La existencia de comorbilidades, además de dificultar el diagnóstico, también empeora el pronóstico de la enfermedad y la respuesta a las terapias.

Los trastornos del estado de ánimo y, especialmente, la depresión y la ansiedad, son altamente prevalentes y una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo. Se estima que el coste total de los trastornos mentales es de 798 mil millones, de los cuales los trastornos del estado de ánimo representan un coste anual directo e indirecto de alrededor de 118 mil millones. El término depresión incluye la depresión mayor o unipolar, depresión típica o melancólica y atípica, la depresión pre- y post-parto, el trastorno bipolar, la depresión psicótica, distimia, desorden depresivo de la personalidad, desorden afectivo estacional, desorden del estado de ánimo inducido por el abuso de sustancias o por el uso de fármacos. Los trastornos de ansiedad incluyen el trastorno de pánico, el trastorno de ansiedad generalizada, la fobia social y la fobia específica, la agorafobia y la ansiedad debida a una condición médica general. La eficacia de las terapias actuales frente a estas patologías es bastante limitada. Se estima que, por ejemplo, aproximadamente sólo un 50% de los tratamientos con

antidepresivos son totalmente efectivos; muchos pacientes quedan con sintomatología sub-clínica y con frecuencia sufren recaídas y un subgrupo de pacientes no presentan ninguna mejoría.

- 5 La depresión muestra una alta comorbilidad con alteraciones mentales (por ejemplo, ansiedad) y físicas (por ejemplo, las alteraciones cardiometabólicas, como el síndrome metabólico, diabetes y las enfermedades cardiovasculares), que empeoran el curso de la enfermedad y reducen la respuesta terapéutica y aumentan su riesgo de padecerla. La ansiedad también muestra una alta comorbilidad con enfermedades mentales y
- 10 cardiometabólicas, como por ejemplo, la hipertensión arterial y las cardiopatías coronarias. Además, aumenta el riesgo de sufrir eventos coronarios adversos mayores, como por ejemplo el infarto de miocardio, insuficiencia ventricular izquierda, procedimiento de revascularización coronaria y accidente cerebrovascular que se producen en personas con las enfermedades cardiovasculares.

15

- El estrés es uno de los principales factores de riesgo del desarrollo de depresión y ansiedad. Asimismo, el estrés se ha asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y obesidad, así como a alteraciones en el hígado induciendo, por ejemplo, fibrosis hepática. En el hígado, el
- 20 estrés puede reducir el flujo sanguíneo hepático, producir daño tisular, aumentar los niveles de transaminasas, promover el desarrollo de algunas enfermedades hepáticas y la aparición de fibrosis hepática asociada a un aumento de la inflamación. La inflamación que tiene lugar en el hígado por activación de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o daño celular (PAMPS
- 25 o DAMPS del inglés: *pathogen-associated molecular patterns or damage-associated molecular patterns*), induce la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas quiescentes a miofibroblastos que son altamente fibrogénicos. La fibrosis hepática es una enfermedad que se caracteriza por una acumulación excesiva de proteínas en la matriz extracelular en el hígado, principalmente colágeno, dificultando
- 30 su correcto funcionamiento y que, además, favorece la aparición de un hepatocarcinoma.

- La alta comorbilidad de las patologías mentales y cardiometabólicas indica que podrían estar desencadenadas por los mismos factores de riesgo y compartir los mecanismos
- 35 de patofisiológicos. Esto también sugiere que podrían existir soluciones comunes para prevenir o tratar estas comorbilidades. La inflamación crónica y las alteraciones de la

respuesta al estrés son unos de los mecanismos fisiopatológicos que vinculan la depresión y la ansiedad con las enfermedades cardiometabólicas. La inflamación crónica y la desregulación de la respuesta al estrés mediada por el eje hipotalámico-pituitaria adrenal (HPA) pueden derivar de alteraciones en la comunicación entre el intestino y el cerebro (eje intestino-cerebro). Este eje está regulado en gran parte por la microbiota intestinal, por lo que, su modulación representa una diana preventiva y terapéutica. De hecho, en modelos animales se observa que, el aumento de la respuesta del eje HPA inducido por el estrés, provoca alteraciones de la microbiota intestinal; a su vez, la microbiota alterada contribuye a trastornos del comportamiento y el estado de ánimo. Los estudios en animales también muestran que la configuración específica de la microbiota intestinal influye en la respuesta al estrés agravando o mejorando sus consecuencias neuroquímicas y conductuales, a través de mecanismos que coordinan el diálogo de los sistemas inmunológico, endocrino y nervioso.

El uso de bacterias intestinales para el tratamiento de patologías como la depresión, la ansiedad, trastornos cardiometabólicos o hepáticos ha sido investigado, considerando estas condiciones como entidades individuales e independientes. Dada la alta prevalencia e importancia clínica de dichas condiciones, el estado de la técnica evidencia la necesidad de disponer de cepas bacterianas alternativas para su prevención y/o tratamiento, más aún, teniendo en cuenta la carencia de estudios sobre el uso y efectividad de cepas microbianas para estas condiciones cuando se presentan en forma de comorbilidades, las cuales hacen mucho más complejo su manejo, incluyendo la prevención y tratamiento.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una cepa *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), en concreto, una cepa de *B. longum* con número de depósito CECT 30763, y cepas derivadas, a componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de dicha cepa, y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a su uso para la prevención y/o tratamiento de alteraciones o trastornos del estado del ánimo, como la depresión y la ansiedad; trastornos cardiometabólicos, como la obesidad, el síndrome metabólico, diabetes tipo 2, y enfermedades cardiovasculares; o trastornos hepáticos, como esteatosis y fibrosis hepática. Puesto que muchos de estos trastornos presentan una alta tasa de comorbilidad, la invención también se refiere a la cepa *B. longum* CECT 30763 para su uso en prevención y/o tratamiento de comorbilidades

psiquiátricas, cardiometabólicas y/o hepáticas.

Los inventores han identificado y aislado esta cepa *B. longum* CECT 30763 a partir de heces de voluntarios sanos, y han demostrado que la cepa presenta capacidad para ejercer efectos beneficiosos sobre el comportamiento depresivo y ansiogénico, así como sobre alteraciones cardiometabólicas y hepáticas, en animales en los que se inducen estas comorbilidades mediante su exposición a estrés social crónico.

En particular, los inventores han demostrado que la administración de *B. longum* CECT 30763 por vía oral al modelo animal de estrés social atenúa el comportamiento depresivo y ansiogénico, tal y como muestran los resultados de los tests de comportamiento descritos en el Ejemplo 2.

Por otro lado, la cepa de la invención redujo los niveles de quimioquinas y citocinas en plasma, en concreto, CXCL9, CXCL10, CCL2, IL-6 y TNF- α , cuyo aumento está asociado a la depresión y ansiedad en dicho modelo animal de estrés y en humanos, restaurándolos hasta alcanzar niveles similares a las del modelo control (Ejemplo 5). Estas quimioquinas y citocinas también son mediadores inflamatorios que se encuentran también aumentados en patologías cardiometabólicas, por lo que los resultados indican que la cepa de la invención ejerce un papel positivo en trastornos de este tipo. En este sentido, el efecto antiinflamatorio de la cepa *B. longum* CECT 30763 también puede derivarse del aumento de linfocitos T reguladores (Tregs), asociados a un papel antiinflamatorio, y cuyos niveles se encontraron disminuidos de forma significativa tanto en bazo como en intestino como consecuencia del estrés crónico siendo la cepa capaz de incrementarlos (Fig. 6A y 6B). Además, tras la primera exposición al estrés (estrés agudo) la cepa de la invención, ya indujo un aumento significativo de Tregs indicando que este efecto anti-inflamatorio y regulador lo ejerce en estadios tempranos y contribuyen a prevenir los efectos adversos del estrés crónico (Fig. 6C).

Otros efectos ejercidos por la cepa *B. longum* CECT 30763 son la mejora de la respuesta endocrina y dopaminérgica, ya que reduce la sobreproducción de corticosterona y los elevados niveles de dopamina inducidos por el estrés crónico (ver Ejemplo 4). La cepa *B. longum* CECT 30763 también ejerce efectos beneficiosos a nivel hepático (ver Ejemplo 5), modificando la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado alterada por el estrés, así como los cambios de expresión

de moléculas profibróticas (Fig. 9A, 9B y 9C). La cepa *B. longum* CECT 30763 también ejerce efectos beneficiosos en el corazón reduciendo el estrés oxidativo (Ejemplo 6, Fig. 11).

5 Cepa de la invención y derivados

En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de *Bifidobacterium longum* con número de depósito CECT 30763, de aquí en adelante la “cepa de la invención”, o “*B. longum* CECT 30763”.

10

La cepa *B. longum* CECT 30763 (G121) fue aislada a partir de heces de seres humanos sanos, y depositada el 13 de diciembre de 2022 bajo el Tratado de Budapest en la en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980, Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 30763.

15

La clasificación científica de la cepa de la invención es: Dominio: *Bacteria*; Filo: *Actinobacteria*; Clase: *Actinobacteria*; Orden: *Bifidobacteriales*; Familia: *Bifidobacteriaceae*; Genero: *Bifidobacterium*; Especie: *B. longum*.

20

Los miembros del género *Bifidobacterium* se encuentran entre los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal humano, y se cree que ejercen beneficios para la salud de su huésped. Las bifidobacterias se han explotado comercialmente como agentes probióticos debido a dichos beneficios para la salud y por ser generalmente reconocidas como seguras.

25

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

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cepa derivada de la cepa *B. longum* CECT 30763 donde dicha cepa mantiene o mejora las capacidades de la cepa original, descritas a lo largo de la presente invención.

35

En una realización preferida, sola o en combinación con otras realizaciones preferidas, la cepa derivada de *B. longum* CECT 30763 tiene una identidad de secuencia de, al menos un, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 5. La secuencia SEQ ID NO: 5 corresponde a la secuencia del gen 16S-rRNA de la cepa *B. longum* CECT 30763.

En la presente invención se entiende por “identidad de secuencia” al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al. Basic local alignment search tool*. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, y TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

El microorganismo derivado puede producirse de forma natural (por ejemplo, mutantes espontáneos) o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse a, el crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Así, en una realización preferida, la cepa de la invención o la cepa derivada de la especie *B. longum* es un mutante genéticamente modificado o un mutante espontáneo. Los términos cepa mutante o cepa derivada pueden ser utilizados indistintamente.

La cepa *B. longum* CECT 30763 o cualquier mutante o derivado de la misma puede ser utilizada en cualquier forma que ejerza los efectos descritos, como por ejemplo, según una realización preferida de la presente invención, la cepa *B. longum* está en forma de células viables (cultivables o no cultivables), o según otra realización preferida de la invención la cepa *B. longum* CECT 30763 está en forma de células no viables (células “muertas” inactivadas por cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, calor, congelación o radiación ultravioleta). Así, en una realización más preferida, las células no viables de cepa *B. longum* CECT 30763 se seleccionan de la lista que consiste en: tratadas por calor, congeladas, liofilizadas o

tratadas por radiación ultravioleta.

Tal y como se utiliza aquí, el término "no viables" (o "inanimadas", "inactivas" o "inactivadas", términos que pueden ser usadas indistintamente en el presente documento), se refiere a cualquier microorganismo metabólica o fisiológicamente inactivo, es decir que no conserva su actividad metabólica y la capacidad de elongación tras la administración de nutrientes. La viabilidad es independiente de la capacidad del microorganismo para formar colonias en medios sólidos.

- 5
- 10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención, cepa derivada, o a partir de una combinación de microorganismos que comprenda al menos una cepa de la invención y/o cepa derivada.
- 15 Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como, por ejemplo, pero sin limitarse, peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana, u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones, como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas. Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como
- 20 consecuencia de su actividad metabólica durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, pero sin limitarse, procesos de elaboración de alimentos o fármacos), durante el almacenamiento del producto o durante el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono,
- 25 lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula exportada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, de elaboración de alimentos o fármacos), el almacenamiento del producto o el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse, ácidos orgánicos
- 30 e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

Composiciones de la invención y usos

- 35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición, de aquí en adelante "composición de la invención", que comprende la cepa de la invención, cepa derivada

y/o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cepa derivada, o cualquiera de sus combinaciones.

La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado, al menos, por la cepa de la invención y/o la cepa derivada en cualquier concentración; o, al menos, por los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o la cepa derivada, o cualquiera de sus combinaciones; o por una combinación de los mismos.

- 10 En una realización preferida, la composición de la invención tiene una concentración de la cepa de la invención, y/o de la cepa derivada, de entre 10^4 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.

15 En otra realización preferida, la composición de la invención además puede comprender, al menos, otro microorganismo adicional diferente a la cepa de la invención o derivada, y/o sus componentes celulares, metabolitos o moléculas secretadas, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, pero sin limitarse a, el microorganismo adicional que puede formar parte de dicha composición es seleccionado entre al menos uno de los siguientes grupos:

- 20 - al menos una bacteria láctica o bifidobacteria de origen intestinal, alimentario o ambiental. La bacteria láctica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse a, una bacteria del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* o *Streptococcus*;

- 25 - al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariotas de origen intestinal, alimentario o ambiental, como por ejemplo pero sin limitarse a Archaea, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Metanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacteres, Deferribacteres, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cyanobacteria*, *Methanobrevibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*,
30 *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio* o *Clostridium*;

- 35 - al menos una cepa de hongo o levadura como por ejemplo, pero sin limitarse, perteneciente al género *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Penicillium*.

Dicho microorganismo adicional puede ser una cepa de la misma especie o de diferente especie o grupo taxonómico de microorganismos del que le corresponde a la cepa de la invención. Las células que comprende la composición pueden ser no viables o viables y estar en cualquier fase del estado de desarrollo o crecimiento (latente, exponencial, estacionaria, etc.), independientemente de la morfología que presente. En una realización particular, dicho microorganismo adicional comprende al menos una bacteria intestinal o una bacteria láctica.

Opcionalmente, en otra realización particular, la composición de la invención puede además comprender al menos un componente bioactivo (sustancia activa, principio activo o agente terapéutico), como son por ejemplo componentes de alimentos, productos vegetales y/o fármacos. El término “componente bioactivo” hace referencia a un compuesto con actividad biológica en el ámbito de aplicación de la patente que pueda mejorar o complementar la actividad de la cepa *B.longum* CECT 30763, incluyendo ingredientes o componentes de los alimentos (por ejemplo y sin limitar: ácidos grasos poli-insaturados, ácido linoléico conjugado, prebióticos, fibra, goma Guar, glucomanano, quitosano, picolinato de cobre, calcio, etc.), otros probióticos, plantas, extractos o componentes de plantas y fármacos

Además, la composición de la invención puede ser formulada para la administración farmacéutica, es decir, formando parte de productos farmacéuticos para ser administrado al sujeto por cualquier medio de administración. Así, en una realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica, de aquí en adelante también llamada como “composición farmacéutica de la invención”. La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado, al menos por la cepa de la invención y/o la cepa derivada en cualquier concentración; o al menos, por los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cepa derivada, o cualquiera de sus combinaciones, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud o reducción del riesgo de enfermedad. Dicha composición farmacéutica puede ser un medicamento, de aquí en adelante también denominado como el medicamento de la invención.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera

de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención, para su uso como medicamento.

El término medicamento tiene un significado más limitado que el significado de “composición farmacéutica”, tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto preventivo o terapéutico. El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Además del requerimiento de la eficacia terapéutica donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y un componente bioactivo, donde a dicho componente bioactivo se le atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento. Dicho compuesto de la invención se refiere obviamente a la cepa de la invención, o a la cepa derivada de ella, o a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención o cepa derivada.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente, farmacéuticamente aceptables.

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y

administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como, por ejemplo, el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica o medicamento se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral, preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral. La composición

farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la invención, o medicamento de la invención, está formulada en forma líquida o en forma sólida.

En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la composición de la invención, preferiblemente la composición farmacéutica de la invención o medicamento, se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral. En una realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la invención o medicamento de la invención, se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Ejemplos de formas adaptadas a la administración oral son, sin limitarse a, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

En una realización aún más preferida, la composición farmacéutica de la invención, o medicamento de la invención, se presenta en una forma adaptada a la administración oral seleccionada de la lista que consiste en: gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco y liofilizado.

La “forma galénica” o “forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

En la presente invención, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o

condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad de la cepa de la invención; de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, en cualquier forma de presentación; la cantidad terapéuticamente efectiva variará también según la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

Alternativamente a la composición farmacéutica, la composición de la invención también puede ser una composición nutritiva, también llamada en el presente documento como la “composición nutritiva de la invención”. Así, en otra realización particular, la composición de la invención es una composición nutritiva.

El término “composición nutritiva” de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término “composición nutritiva” de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

En una realización preferida, la composición nutritiva es un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico, un simbiótico, un postbiótico, un parabiótico o un psicobiótico.

En una realización más preferida, el alimento se selecciona de la lista que consiste en producto lácteo, producto vegetal, producto cárnico, aperitivo, chocolate, bebida o alimento infantil.

Ejemplos de productos lácteos incluyen, sin limitar a, producto derivado de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitar yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitar, helado, mantequilla, margarina, suero lácteo). En una realización más

preferida, el alimento es un producto lácteo seleccionado de la lista que consiste en yogur, queso, helado, mantequilla, margarina, suero lácteo, y cualquier otro producto derivado de leche fermentada o no fermentada.

- 5 Ejemplos de productos vegetales incluyen, sin limitar a, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado o no fermentado. En otra realización más preferida, el alimento es un producto vegetal, en donde dicho producto vegetal es un cereal fermentado o no fermentado.
- 10 Ejemplos de bebida incluyen, sin limitar a, cualquier zumo de frutas o verduras u hortalizas o leche no fermentada. En otra realización más preferida, el alimento es una bebida, en donde dicha bebida es un zumo de frutas o verduras u hortalizas o leche no fermentada.
- 15 El término “suplemento”, sinónimo de cualquiera de los términos “suplemento dietético”, “suplemento nutricional”; o “suplemento alimenticio” es un “ingrediente alimenticio” destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos son, sin limitarse a, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se
- 20 presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia sino como complemento de la dieta. Además, el suplemento puede presentarse en forma simple o combinada y comercializarse en forma de, sin limitar a, cápsulas, píldoras, tabletas y otras formas similares, sobres de polvo, ampollas de líquidos y dispensadores de gotas, y otras formas similares de líquidos y
- 25 polvos diseñados para ser tomados en una sola cantidad.

El término “nutracéutico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud.

30

El término “probiótico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo hospedador.

- 35 El término “simbiótico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a aquellos alimentos que contienen una mezcla de prebióticos y probióticos. Por regla general

contienen un componente prebiótico que favorece el crecimiento y/o actividad metabólica y en definitiva el efecto del probiótico con el que se combina, como por ejemplo y sin limitar, puede ser la asociación de fructooligosacáridos o galactooligosacáridos a las bifidobacterias.

5

El término “postbiótico” tal y como se emplea en la presente invención se refiere a aquellos alimentos o suplementos que contienen las sustancias o metabolitos producidos por los microorganismos probióticos y que tienen un efecto beneficioso para la salud del huésped a nivel nutricional, metabólico e inmunitario, como por ejemplo y sin limitar puede ser metabolitos como la vitamina K, ácidos grasos de cadena corta o neurotransmisores como el GABA, la serotonina o la acetilcolina.

10

El término “parabiótico” tal y como se emplea en la presente invención se refiere a material no viable de origen microbiano que habría demostrado que puede tener beneficios para la salud humana y/o animal. Este material no viable podría incluir por ejemplo y sin limitar componentes celulares como ácidos teicoicos, peptidoglicanos o proteínas de superficie.

15

El término “psicobiótico” tal y como se emplea en la presente invención se refiere a probióticos, prebióticos y otras estrategias dietéticas que influyen en la microbiota (por ejemplo, algunas fibras presentes en las frutas y las verduras) y que ejercen un beneficio para la salud mental.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa de la invención, cepa derivada, o los componentes derivados de ella/s, o la composición de la invención, para la fabricación o elaboración de un medicamento, de una composición nutritiva o de un alimento. El término medicamento ha sido definido previamente, y es aplicable al presente aspecto de la invención.

25

30 Usos de la invención

Como se ha mencionado previamente, los inventores han demostrado que la cepa *B. longum* CECT 30763 presenta capacidad para prevenir y/o atenuar alteraciones del estado del ánimo tales como el comportamiento depresivo o ansiogénico. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera

35

de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de, al menos, una alteración del estado de ánimo de un sujeto, así como su presencia conjunta como comorbilidades.

5

En la presente invención se entiende por “sujeto” a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, en particular, un ser humano, de cualquier raza, sexo o edad. En una realización preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, solas o

10

En la presente invención, el término “tratamiento” se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

15

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

20

En la presente invención, el término “prevención” se refiere a evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

25

En la presente invención, los trastornos o alteraciones del estado de ánimo pueden definirse como condiciones que afectan al estado mental/emocional de un sujeto, y que pueden tener un impacto en su comportamiento, e incluyen, sin limitar a, depresión, trastornos de ansiedad, depresión mayor, depresión atípica, depresión típica o melancólica, depresión psicótica, depresión catatónica, depresión pre- y postparto, el

30

trastorno bipolar trastorno afectivo estacional, distimia, desorden depresivo de la personalidad, depresión doble, trastorno depresivo no especificado, trastorno depresivo breve recurrente, depresión menor, desorden del estado de ánimo inducido por el abuso de sustancias o por el uso de fármacos.

35

Otra realización preferida se refiere a la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus

combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de al menos, dos, tres, cuatro, cinco o una pluralidad de trastornos o alteraciones del estado del ánimo de un sujeto.

- 5 Los trastornos o alteraciones del estado del ánimo, pueden además presentarse de forma simultánea o secuencial.

En una realización más preferida, la alteración del estado de ánimo se selecciona de la lista que consiste en depresión, ansiedad o trastorno de ansiedad, depresión mayor, depresión atípica, depresión típica o melancólica, depresión psicótica, depresión catatónica, depresión pre- y postparto, el trastorno bipolar trastorno afectivo estacional, estrés, distimia, desorden depresivo de la personalidad, depresión doble, trastorno depresivo no especificado, trastorno depresivo breve recurrente, depresión menor, desorden del estado de ánimo inducido por el abuso de sustancias, desorden del estado de ánimo inducido por el uso de fármacos, y cualquier combinación de ellas. Más preferiblemente, la alteración del estado de ánimo es depresión y/o ansiedad. Más preferiblemente, cuando la alteración del estado del ánimo es estrés, el estrés es estrés crónico, aún más preferiblemente estrés social crónico, o estrés agudo.

20 La ansiedad es una emoción caracterizada por sentimientos de tensión, pensamientos de preocupación y cambios físicos, como el aumento de la presión arterial. La ansiedad puede ser experimentada no sólo por los seres humanos, sino también por otros animales, en particular por otros mamíferos no humanos.

25 Los trastornos de ansiedad son los más comunes de los trastornos mentales en los seres humanos y afectan a casi un 30% de los adultos en algún momento de su vida. Los trastornos de ansiedad incluyen, pero sin limitar a, el trastorno de ansiedad generalizada, el trastorno de pánico, la fobia específica, la agorafobia, trastorno de ansiedad social (antes llamado fobia social), la aversión al ruido o el trastorno de ansiedad por separación.

En la presente invención, el término "trastornos de ansiedad" incluye no sólo los trastornos de ansiedad descritos anteriormente, sino también las condiciones relacionadas, incluyendo pero no limitadas a trastorno de estrés postraumático (TEPT); trastorno de estrés agudo; trastorno obsesivo-compulsivo o los trastornos de adaptación.

Por otro lado, la depresión es una enfermedad mental de alta prevalencia a la que se enfrenta el sistema sanitario. Al igual que la ansiedad, puede ser experimentada no sólo por los seres humanos, sino también por otros animales, en particular por otros mamíferos no humanos.

En la presente invención, el término “depresión” se refiere a un trastorno clínico que incluye un estado de ánimo predominantemente triste o deprimido y que puede ser acompañado de otros síntomas psicológicos y/o físicos, presentándose opcionalmente.

La depresión y/o la ansiedad afectan al funcionamiento social y a la productividad, incluida la laboral, y aumentan el riesgo de suicidio y de otras enfermedades crónicas como las cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares, la diabetes y la obesidad, como un trastorno depresivo o relacionado con la ansiedad.

En particular, se cree que la depresión se da hasta en el 60% de las personas con trastornos de ansiedad. Los síntomas depresivos se asocian a futuras deficiencias en la movilidad y el funcionamiento, y a mayores costes médicos

Además, la cepa *B. longum* CECT 30763 es capaz de mejorar la respuesta neuroendocrina, tal y como muestra el Ejemplo 4, en el que el tratamiento con *B. longum* CECT 30763 del modelo animal de depresión inducido por estrés, redujo los niveles de corticosterona, dopamina en plasma. La cepa *B. longum* CECT 30763 también reduce los mediadores de la inflamación inducida por el estrés crónico (CXCL9, CXCL10, CCL2, IL-6 y TNF- α), y aumenta la proporción de células T reguladoras en el intestino y en el bazo tras el estrés agudo y crónico (Ejemplo 5, Fig. 6A, 6B y 6C). Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la mejora de la respuesta neuroendocrina de un sujeto, preferiblemente para su uso en la mejora de la respuesta neuroendocrina comórbida con al menos una alteración del estado del ánimo. Ejemplos usados para definir trastornos o alteraciones del estado de ánimo, han sido previamente mencionados, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son también aplicables al presente aspecto de la invención.

Además, la cepa de la invención y productos derivados, también tiene aplicabilidad en relación a la prevención y/o tratamiento de trastornos cardiometabólicos.

- 5 Así, otro aspecto de la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de, al menos, 10 un trastorno cardiometabólico en un sujeto.

Al igual que en otro aspecto anterior, algunas realizaciones preferidas contemplan la prevención y/o tratamiento de, al menos, dos, tres, cuatro, cinco o una pluralidad de 15 trastornos cardiometabólicos de un sujeto. Estas, pueden presentarse de forma simultánea o secuencial.

Los trastornos cardiometabólicos son alteraciones, en muchos casos, relacionadas con diferentes factores interrelacionados como la hipertensión, inflamación, elevación de la glucemia, dislipidemia, obesidad abdominal y la elevación de los triglicéridos en un 20 sujeto. Estos trastornos cardiometabólicos incluyen enfermedades o desórdenes cardiovasculares o metabólicas.

Ejemplos de trastornos cardiometabólicos incluyen, sin limitar a, hiperlipidemia, hiperglicemia, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, obesidad, hipertensión arterial, 25 cardiopatía coronaria, u otra enfermedad cardiovascular. En una realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el trastorno cardiometabólico se selecciona de la lista que consiste en: una enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, obesidad, hiperlipidemia, hiperglicemia, y cualquier combinación de ellas.

30

La cepa de la invención demuestra ejercer efectos protectores sobre la salud cardiometabólica reduciendo el estrés oxidativo en el corazón (Ejemplo 6, Fig. 11). Por otro lado, tal y como se ha mencionado, la cepa de la invención es capaz de reducir los niveles de CXCL9, CXCL10, CCL2, IL-6 y TNF- α , que son mediadores inflamatorios que 35 se encuentran también aumentados en patologías cardiometabólicas. Además, la cepa *B. longum* CECT 30763 también aumentó los Tregs en bazo e intestino, tras el estrés

agudo y crónico, indicando un efecto antiinflamatorio (Ejemplo 5, Fig. 6A, 6B y 6C).

Así, en otra realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, el trastorno cardiometabólico comprende inflamación. Más preferiblemente, la inflamación está mediada por al menos una citoquina seleccionada de la lista que consiste en CXCL9, CXCL10, CCL2, IL-6, TNF- α y cualquier combinación de ellas, y/o por niveles de Tregs reducidos en comparación con valores de referencia. Por “valores de referencia” se entiende los niveles de Tregs en sujetos sanos.

La presente invención, también tiene aplicabilidad en relación a la prevención y/o tratamiento de trastornos o alteraciones hepáticas. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de, al menos, un trastorno o alteración hepática en un sujeto.

Al igual que en aspectos de la invención anteriores, algunas realizaciones preferidas contemplan la prevención y/o tratamiento de, al menos, dos, tres, cuatro, cinco o una pluralidad de trastornos o alteraciones hepáticas en un sujeto. Estas pueden presentarse de forma simultánea o secuencial.

En la presente invención, se entiende por trastorno o alteración hepática a desórdenes o afecciones que impiden el correcto funcionamiento del hígado. Ejemplos de trastorno o alteración hepática incluyen, sin limitar a, hígado graso o esteatosis, fibrosis hepática, hepatocarcinoma, insuficiencia hepática o hepatitis.

En otra realización más preferida, sola o en combinación con el resto de realizaciones preferidas, la alteración hepática se selecciona de la lista que consiste en: esteatosis, fibrosis hepática, hepatitis, hepatocarcinoma, insuficiencia hepática y cualquier combinación de ellas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición

de la invención, para su uso en la prevención y/o tratamiento de trastornos del estado de ánimo y/o trastornos cardiometabólicos y/o trastornos hepáticos y/o en la mejora de la respuesta neuroendocrina en un sujeto.

- 5 Los trastornos o alteraciones del estado de ánimo, como la depresión y/o ansiedad, están asociadas a otras afecciones médicas psiquiátricas y no psiquiátricas (por ejemplo, trastornos cardiometabólicos, como las enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, la diabetes y las alteraciones hepáticas, como hígado graso o esteatosis, fibrosis hepática) y con frecuencia se presentan conjuntamente.

10

En la presente invención, el término “comorbilidad” se refiere a la presencia de uno o más trastornos además de la enfermedad o trastorno primario en el mismo sujeto. Pueden ocurrir al mismo tiempo o bien uno después del otro. La “comorbilidad” implica además que pueda haber interacción entre las enfermedades empeorando la evolución

15 de cada una y dificultando el tratamiento.

Así, en otro aspecto la presente invención se refiere a la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones, obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la

20 composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos o alteraciones del estado de ánimo comórbidas en un sujeto.

Ejemplos usados para definir trastornos o alteraciones del estado de ánimo, han sido

25 previamente mencionados, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son también aplicables al presente aspecto de la invención.

Preferiblemente los trastornos o alteraciones del estado del ánimo son depresión y ansiedad.

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones, obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la

35 composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de comorbilidades cardiometabólicas en un sujeto. La frase “comorbilidades

cardiometabólicas” se refiere a que uno o más trastornos cardiometabólicos están presentes en un sujeto además del trastorno primario, en la presente invención, en donde dicho trastorno primario es al menos un trastorno o alteración del estado de ánimo. Así, el presente aspecto se refiere al uso en la prevención y/o el tratamiento de uno o más trastornos cardiometabólicos comórbidos con al menos una alteración del estado del ánimo de un sujeto.

Ejemplos usados para definir trastornos cardiometabólicos han sido previamente mencionados, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son también aplicables al presente aspecto de la invención.

En otra realización particular, el trastorno cardiometabólico comprende inflamación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones, obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de comorbilidades hepáticas en un sujeto. La frase “comorbilidades hepáticas” se refiere a que uno o más trastornos hepáticos están presentes en un sujeto además del trastorno primario, en la presente invención, en donde dicho trastorno primario es al menos un trastorno o alteración del estado de ánimo. Así, el presente aspecto se refiere al uso en la prevención y/o el tratamiento de uno o más trastornos hepáticos comórbidos con al menos una alteración del estado del ánimo de un sujeto.

Ejemplos usados para definir trastornos hepáticos han sido previamente mencionados, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son también aplicables al presente aspecto de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, la composición de la invención, incluyendo la composición farmacéutica o la composición nutritiva de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de comorbilidades cardiometabólicas y hepáticas en un sujeto. Tal y como se ha descrito previamente, cuando se definió “comorbilidades cardiometabólicas”, y “comorbilidades

hepáticas”, se refiere a que uno o más trastornos cardiometabólicos, y uno o más trastornos hepáticos, respectivamente, están presentes en un sujeto además del trastorno primario, en la presente invención, en donde dicho trastorno primario es al menos un trastorno o alteración del estado de ánimo. Es decir, el presente aspecto de la invención se refiere al uso en la prevención y/o el tratamiento de uno o más trastornos hepáticos y uno o más trastornos cardiometabólicos, comórbidos con al menos una alteración del estado del ánimo de un sujeto.

Además, la cepa de la invención, cepa derivada de ella, componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención, pueden ser usados como coadyuvante.

En la presente invención se entiende por “coadyuvante” a aquel compuesto que ayuda a mejorar la efectividad o eficiencia de otros medicamentos para el tratamiento y/o prevención de un trastorno, alteración o enfermedad, lo que permitiría reducir su dosis y/o la frecuencia de administración o potenciar su eficacia mediante la administración de una formulación de la cepa de la invención con mecanismos de acción complementarios.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención, para su uso como coadyuvante en los tratamientos y/o prevención de trastornos del estado de ánimo y/o trastornos cardiometabólicos y/o trastornos o alteraciones hepáticas y/o en la mejora de la respuesta neuroendocrina en un sujeto.

Ejemplos usados para definir trastornos del estado del ánimo, trastornos cardiometabólicos trastornos o alteraciones hepáticas han sido previamente mencionados, y tanto ellos como sus realizaciones preferidas son también aplicables al presente aspecto de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición

de la invención, para su uso como coadyuvante en los tratamientos y/o prevención de trastornos del estado de ánimo comórbidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención, para su uso como coadyuvante en los tratamientos y/o prevención de comorbilidades cardiometabólicas y/o comorbilidades hepáticas y/o mejora de la respuesta neuroendocrina comórbida en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención, para su uso como coadyuvante en los tratamientos y/o prevención de uno o más trastornos cardiometabólicos, y uno o más trastornos hepáticos, comórbidos con al menos una alteración del estado del ánimo en un sujeto.

Métodos de prevención y/o tratamiento

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de, al menos, una alteración del estado de ánimo de un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de, al menos, un trastorno cardiometabólico en un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de, al menos, un trastorno o alteración hepática en un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de trastornos o alteraciones del estado de ánimo comórbidas en un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de comorbilidades cardiometabólicas en un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención. La frase “comorbilidades cardiometabólicas” se refiere a que uno o más trastornos cardiometabólicos están presentes en un sujeto además del trastorno primario, en la presente invención en donde dicho trastorno primario es al menos un trastorno o alteración del estado de ánimo. Así, el presente aspecto se refiere al método en la prevención y/o el tratamiento de uno o más trastornos cardiometabólicos con al menos una alteración del estado del ánimo en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de comorbilidades hepáticas en un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones, obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición de la invención. La frase “comorbilidades hepáticas” se refiere a que uno o más trastornos hepáticos están presentes en un sujeto además del trastorno primario, en la presente invención en donde dicho trastorno primario es al menos un trastorno o alteración del estado de ánimo. Así, el presente aspecto se refiere al método en la prevención y/o el tratamiento de uno o más trastornos hepáticos con al menos una alteración del estado del ánimo en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de comorbilidades cardiometabólicas y hepáticas en un sujeto, que comprende la administración de la cepa de la invención, una cepa derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones, obtenidas de la cepa de la invención o cepa derivada, o la composición

de la invención. El presente aspecto se refiere al método en la prevención y/o el tratamiento de uno o más trastornos hepáticos y uno o más trastornos cardiometabólicos con al menos una alteración del estado del ánimo en un sujeto.

- 5 Los términos usados para definir los métodos de prevención y/o tratamiento de la invención han sido definidos y explicados en aspectos de la invención anteriores, siendo aplicables al igual que sus realizaciones preferidas a ellos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

Fig. 1. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=13 (C), 13 (E), 14 (E+B)) expuestos a estrés social crónico en el test de preferencia de sacarosa. Los datos están expresados en porcentaje de ingesta de sacarosa respecto del volumen total ingerido y error estándar.

- 15 Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un análisis de Kruskal-Wallis seguido por el test de múltiple comparación de Dunn's (*= $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

- 20 **Fig. 2. Evaluación del efecto de la administración de la cepa *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=13 (C), 13 (E), 11 (E+B)) expuestos a estrés social crónico en el test de suspensión por la cola.** Los datos están expresados en segundos y su error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test post
- 25 hoc Tukey (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ****= $p < 0.0001$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

- Fig. 3. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=27 (C), 26 (E), 23 (E+B)) expuestos a estrés social crónico en el test de natación forzosa.** Los datos están expresados en segundos y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test post hoc Tukey (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ****= $p < 0.0001$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B,
- 35 ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 4. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=14 (C), 14 (E), 11 (E+B)) expuestos a estrés social crónico en test de campo abierto. Los datos están expresados en número de movimientos de rearing o exploración erguida y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un análisis de Kruskal-Wallis seguido por el test de múltiple comparación de Dunn's (**=p<0.01). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 5. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=8-9/grupo) expuestos a estrés social crónico sobre el sistema inmune en plasma. Niveles de las quimioquinas y citocinas CXCL9 (A), CXCL10 (B), CCL2 (C), IL-6 (D), TNF- α (E) en plasma. Los datos están expresados en picogramos (pg) por mililitro (ml) y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un análisis de Kruskal-Wallis seguido por el test de múltiple comparación de Dunn's (*=p<0.05, ***=p<0.001, ****=p<0.0001). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 6. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=8-10/grupo) expuestos a estrés social agudo y crónico sobre el sistema inmune en bazo e intestino delgado. Niveles de los linfocitos Tregs en bazo (A) e intestino delgado (B) en ratones expuestos a estrés crónico y niveles linfocitos Tregs en bazo (C) en ratones expuestos a estrés agudo. Los datos están expresados en picogramos (pg) por mililitro (ml) y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test post hoc Tukey (*=p<0.05, **=p<0.01, ****=p<0.0001). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 7. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 (n=12-16/grupo) expuestos a estrés social sobre los niveles de corticosterona y dopamina en plasma. Niveles de corticosterona (A) y dopamina (B) en plasma. Los datos están expresados en porcentaje respecto al grupo control y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test post hoc Tukey (**=p<0.01,

****= $p<0.0001$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 8. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 ($n=7-9$ /grupo) expuestos a estrés social crónico sobre la expresión de los receptores de dopamina en corteza prefrontal del cerebro.

Expresión relativa del RNAm de los receptores de dopamina D2L (A) y D1R (B) en la corteza prefrontal (PFCx). Los datos están expresados de forma individual, cada punto y los histogramas representan la media y el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un análisis de Kruskal-Wallis seguido por el test de múltiple comparación de Dunn's ($*=p<0.05$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 9. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 ($n=6-9$ /grupo) expuestos a estrés social crónico sobre la expresión de genes profibróticos en el hígado.

Expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la fibrosis hepática TGF β 1 (A), Col1a1 (B), Col3a1 (C). Los datos están representados de forma individual, cada punto y los histogramas representan la media y el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un test ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni ($*p<0.05$; $**p>0.01$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 10. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763 (1×10^9 ufc/día) en ratones C57BL/6 ($n=8-9$ /grupo) expuestos a estrés social crónico sobre la expresión de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos en el hígado.

Expresión relativa del RNAm de los genes ACC1 (A), DGAT (B), CPT1a (C), y el cociente DGAT/CPT1 (D). Los datos están representados de forma individual, cada punto y los histogramas representan la media y el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un test ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni o con t-student entre dos grupos cuando está indicado ($*p<0,05$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B. longum* CECT 30763.

Fig. 11. Evaluación del efecto de la administración de *B. longum* CECT 30763

(1×10^9 ufc/día) sobre el daño por estrés oxidativo en ratones C57BL/6 (n=9 (C), 9 (E), 7 (E+B)) expuestos a estrés social crónico. Porcentaje del área de tejido positivo al anticuerpo 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) frente al área total de tejido. Los datos están representados de forma individual, cada punto y los histogramas representan la media y el error estándar de la media. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando un test ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). C, ratones control; E, ratones sometidos a estrés crónico sin tratar; E+B, ratones sometidos a estrés crónico y tratados con *B.longum* CECT 30763.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la invención.

EJEMPLO 1. Aislamiento e identificación de la cepa *B. longum* CECT 30763

La cepa de *B. longum* CECT 30763 fue aislada e identificada a partir de las heces de voluntarios sanos en agar MRS + 0.05% de L-cisteína (MRS-cis). Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de heces en PBS-1x + 0.05% L-cisteína y se cultivaron en placas de MRS-cis en anaerobiosis a 37°C durante 48 horas. Las colonias aisladas se identificaron mediante tinción de Gram y posterior secuenciación por PCR en colonia.

Para la identificación de la especie y de diferentes cepas de *B. longum* se utilizaron dos genes diferentes. El gen del 16S rRNA (1.5 Kb) se amplificó con los cebadores 27F (SEQ ID NO 1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1401R (SEQ ID NO 2: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') lo que nos permitió identificar género y especie, y el gen de la treonina-ARNt ligasa (ThrS) se amplificó con los cebadores BifiThrS-F (SEQ ID NO 3: 5'-AAGGACGGCTTCTACTACGA-3') y BifiThrS-R (SEQ ID NO 4: 5'-AAGATCAGGTTGTGCATCGG-3') y utilizado junto con el anterior sirvió para la diferenciación a nivel de cepa. Ambos genes se secuenciaron mediante la tecnología Sanger en un secuenciador ABI 3730XL de Applied Biosystems utilizando tanto el cebador directo como el reverso. Se obtuvieron dos secuencias nucleotídicas para cada uno de los genes (16S rRNA y ThrS), una secuenciada con el cebador directo y otra con el reverso, utilizando la herramienta web PRABI-Doua se genera un único amplicón de

cada uno de los genes (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente). Mediante comparación de las secuencias obtenidas del 16S rRNA con las de la base de datos de NCBI y el algoritmo BLASTn se obtuvo la identificación de la especie con un porcentaje de identidad del 100%. A continuación, se alinearon ambos genes por separado para su posterior concatenación con el software mafft, obteniendo una única secuencia nucleotídica formada por el gen 16S rRNA, 20 nucleótidos ambiguos (N) y el gen ThrS de cada una de las cepas utilizadas para llevar a cabo el análisis. La filogenia se generó utilizando en el software MEGAX. Tras introducir las secuencias en el programa se realizó un alineamiento mediante ClustalW+Muscle, utilizando el modelo estadístico de máxima verosimilitud se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica T92 (Tamura-3-parámetros). Finalmente, el análisis se realizó utilizando el Bootstrap method, con 1000 réplicas. Mediante la elaboración de un dendrograma se confirmó que la cepa objeto de la patente (*B. longum* G121 ó *B.longum* CECT 30763) difiere de otras de la misma especie.

>B.longum_G121_16S-rRNA (SEQ ID NO: 5):

```
GCAGTCGAACGGGATCCACCGGGCTTTGCTTGGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGT
GAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGT
GGTAATGCCGGATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAAGCTTTCGCGGT
ATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGACGGCGGGGTAACGGCCCACCGTG
GCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGAT
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTC
TTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCTGTCCTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTT
AACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGACTG
GAATTCCCGGTGTAACGGTGGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGA
AGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGG
GCCCCGTTCCACGGGTTCCGTGTCTGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
CGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACAT
GTTCCCGACGGTCGTAGAGATACGGCTTCCCTTCGGGGCGGGTTACAGGTGGT
GCATGGTCGTCCTCAGCTCGTGTCGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCCCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTATGCCGGGAACTCACGGGGAACCG
```

CCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAC
 GTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACGCGGCG
 ACGCGGAGCGGATCCCTGAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTC
 GACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCTGCGAAT

5

>B.longum_G121_ ThrS (SEQ ID NO: 6):

CATCGGGCAGTTCATCGGCTTGAGGTAGTAGTCGGCGCCCGGCTTGGTGATGTT
 GCCGTCCGCGTCCTTCTCCTCGTCGAGGTGCATGGGCGGGTACATGCCGTCTT
 GTACCAGTGCAGGTGGCCGGAGGTCTCGTACAGGCCGCCCTTGGTGATGTGCGG
 10 GGTCTGCACGAAGCTGTAATGGTGCTTGCGGTGCATCTCACGGGAGTAGATCCTC
 CATAGCGTTGATCACGGCGGCACCCTTCGGGTGGAACACGGCCAGGCCGGGGC
 CAATTTTCATCCGGGAAGGAGAACAGGTCCATCTCGGCGCCGAGCTTGCGGTGAT
 CGCGCTTGGCGGCTTCTTCCAGGCGGGTCTGGTAGGCCTTGAGGTCTTCCTTGG
 TGGCCCATGCGGTGCCGTAGACGCGCTGCATGGTCGGGTTCTTCTCGGAACCAC
 15 GCCAGTAGGCGGCGGCGGAACGCTCGATTTTGAAGGCCTTGATGTAGCGGGTGT
 TCGGCAGGTGCGGGCCGCGGCACAGGTCTTCCAAACCACATTGCCATCACGGT
 CTACGTTGTCGTAGAAGCTGAGCTCCTTTTCGGAGATCTCGGTGGCGGCGGCCG
 GGTGCGAGGTGTGCTTCCTTGTCTTCGATCAGTTCGATCTTAAAGGGCTGGTCGGC
 CTCTTCCTTCAGAGCCTCTTCCTCGGTACGGAACGGCGGCGGAAGGACTGGGA
 20 GGACTTGATGATGCGCTGCATGCGCTTCTCGATGTCCTTGAGGTCGTTGCGGGTG
 AAGGGCTGGTCGACCTGTAAAGTCGTAGTA

EJEMPLO 2. Efectos de la cepa *B. longum* CECT 30763 sobre el comportamiento en un modelo de depresión inducido por estrés social.

25

Producción de la cepa de *B. longum* CECT 30763

La cepa de *B. longum* CECT 30763 fue cultivada en medio líquido MRS a 37°C en anaerobiosis, utilizando una cámara anaeróbica con una mezcla de gases del 10% CO₂,
 30 10% H₂, 80% N₂ (Bactron 300-2, Shellab, Cornelius, OR, USA). Las células fueron recogidas por centrifugación (12.000 g durante 10 min a 4°C) y lavadas con solución salina fosfatada (PBS, 130 mM de cloruro de sodio, 10 mM de fosfato de sodio, pH 7,4) complementada con un 0.05% de L-cisteína. Las bacterias fueron resuspendidas en
 PBS + 0,05% L-cisteína + 10% glicerol y las alícuotas de estas suspensiones fueron
 35 inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80° C hasta su uso. La viabilidad celular de los cultivos se determinó por cultivo en placas de agar MRS, la

viabilidad de los cultivos tras su conservación a -80°C oscilaba entre el 98-99% de células vivas por mL de cultivo. Las alícuotas fueron descongeladas diariamente para su administración para evitar desviaciones en la viabilidad del cultivo durante el estudio

5 Desarrollo del modelo animal de estrés social agudo y crónico y toma de muestras

Se emplearon ratones C57BL/ 6 machos que llegaron en edad adolescente (día post natal 32, Charles River, Les Oncins, France). Fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad relativa (40-50%) y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados con dieta estándar (D12450K, Research diet, Brogaarden, Dinamarca) durante 7 semanas (la primera semana estuvieron en cuarentena en una sala preparada para prevenir posibles zoonosis). Los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos experimentales (n=10). Grupo control (C), grupo estrés (E), grupo tratado con *B. longum* CECT 30763 (E+B). Los ratones del grupo *B. longum* fueron tratados con una dosis diaria de la bacteria de 1×10^9 unidades formadoras de colonias [UFC]-suspendida en PBS + 0,05% L-cisteína + 10% glicerol. El vehículo o placebo (PBS + 0,05% L-cisteína + 10% glicerol) se administró de igual forma tanto al grupo control como al grupo estrés. Se administró el tratamiento o placebo durante 6 semanas. Transcurridas estas 6 semanas, un subgrupo, se utilizó para los tests de comportamiento y otro fue sacrificado por dislocación cervical para la obtención de muestras, incluyendo sangre, intestino, cerebro, contenido fecal y heces. Otros grupos experimentales se sacrificaron tras la primera exposición al estrés agudo con el fin de analizar efectos en etapas tempranas de la situación traumática.

25 Modelo de estrés social agudo y crónico

Para inducir estrés social crónico se empleó un modelo animal de derrota social basado en el paradigma del residente-intruso. En este modelo se permitió a uno de los dos animales (el residente) establecer territorialidad en su propia caja. A continuación, se introdujo a los ratones objeto de estudio (intruso), en nuestro caso machos C57BL/6, uno por uno en la jaula del ratón residente. Para ello se emplearon como ratones residentes a machos adultos más mayores que los ratones objeto de estudio (5 semanas más de edad) y más agresivos. Estos ratones eran de la cepa CD-1 (Charles River, Les Oncins, France) y previamente fueron aislados y entrenados para ser más agresivos. Durante 10 días seguidos (para el modelo de estrés crónico) o bien durante 1 día (para el modelo de estrés agudo) se realizaron encuentros agonísticos (introducción de ratón

naïve en la jaula del residente durante 5 minutos) en los que se permitió que hubiera contacto físico entre ellos y en los que el ratón intruso sufrió un alto grado de estrés (reflejado en la producción de altos niveles de corticosterona). Los encuentros agonísticos tuvieron lugar en una sala neutra y no en el animalario en el que estaban estabulados habitualmente. Los ratones experimentales (intrusos) mostraron un comportamiento de evasión o huida, así como de defensa/sumisión después de sufrir la agresión (amenaza/ataque) por parte de su oponente. El criterio empleado para definir que un animal había sido derrotado fue la adopción de una postura específica que significa derrota. Se caracteriza por una postura de sumisión vertical con las patas delanteras flácidas, la cabeza inclinada hacia arriba y las orejas retraídas [Can, A., et al., The tail suspension test. J Vis Exp, 2012(59): p. e3769.].

El grupo control no se expuso a la derrota social; sin embargo, todos los ratones de este grupo se introdujeron 5 minutos en una jaula exactamente igual a las que se emplearon para realizar los encuentros agonísticos. Durante 5 minutos exploraron la jaula sin tener contacto con ningún oponente.

Test de preferencia por la sacarosa 3% ("Sucrose Preference Test" SPT)

El test de preferencia por la sacarosa al 3% se realizó para evaluar el comportamiento hedónico/anhedónico asociado a la conducta depresiva. El comportamiento anhedónico (incapacidad para sentir placer), se considera uno de los síntomas más claros de depresión. Diferentes estudios en animales han demostrado que los animales deprimidos consumen menos agua con sacarosa al 3%, considerándose este un comportamiento anhedónico.

La prueba consiste en privar de agua a los animales durante 12 horas y a continuación exponerlos a dos opciones, o bien agua o bien agua con un 3 % de sacarosa disuelta. Las botellas de sacarosa y agua fueron cambiadas durante el periodo de la prueba de 2h de duración para asegurar que no hubiera un efecto relacionado con la preferencia de lugar. La cantidad de sacarosa al 3% ingerida durante esas 2h indicaría un comportamiento hedónico/anhedónico. Una menor ingesta de sacarosa indicaría anhedonia. La preferencia por la sacarosa fue calculada como el porcentaje de sacarosa ingerida en relación al total de la cantidad de líquido consumido y corregida por peso corporal.

Los resultados (Fig. 1) indican que los animales estresados ingieren significativamente menos sacarosa al 3% que los ratones control ($p < 0.05$) indicando un comportamiento anhedónico y, por tanto, depresivo. El tratamiento con *B. longum* CECT 30763 reduce la anhedonia significativamente ($p < 0.001$), indicando su capacidad para reducir el comportamiento depresivo en esta prueba.

Prueba de suspensión de la cola (*Tail suspensión test*)

Los ratones fueron suspendidos en el borde de una mesa con cinta adhesiva colocada aproximadamente a 1 cm de la punta de la cola en una posición que no podían escapar ni aferrarse a superficies cercanas. El comportamiento dirigido a tratar de escapar se cuantificó, así como el tiempo de inmovilidad durante 5 minutos. La duración de la actividad e inmovilidad fue registrada durante los 5 min que duró el test. Este test es ampliamente utilizado para la evaluación del comportamiento depresivo en ratones [Can, A., et al., *The tail suspension test*. J Vis Exp, 2012(59): p. e3769].

Los resultados (Fig. 2) indican que los animales estresados muestran un aumento significativo de la actividad global respecto a los animales control ($p < 0.01$). El tratamiento con *B. longum* CECT 30763 (E+B) normaliza significativamente este comportamiento alterado en el grupo estresado o E ($p < 0.001$), indicando su efectividad para restablecer el comportamiento depresivo.

Forced Swimming test

Para realizar este test (Fig. 3) se colocó un solo ratón en el vaso de precipitados lleno de agua durante un período de 5 minutos y se registró con un software (Smart 2.0, Panlab) su comportamiento. Se analizó el tiempo que los ratones están en movimiento o bien inmóviles.

Los resultados mostraron que los ratones estresados se mueven significativamente más ($p < 0.05$) que los ratones control y el tratamiento con *B. longum* CECT 30763 normaliza este comportamiento ($p < 0.0001$), sugiriendo su efectividad para restablecer las alteraciones del comportamiento depresivo.

Openfield

Este test mide la actividad y ansiedad dentro de un campo abierto. Consiste en introducir a los animales durante 10 minutos en una caja abierta. Se considera que cuanto menos actividad muestran en el centro del openfield mayor ansiedad presentan los animales.

Los resultados de esta prueba (Fig. 4) indican que los animales estresados realizaron menos *rearing* (el roedor se pone sobre sus dos patas traseras) en el centro que los ratones control ($p < 0.01$). El tratamiento con *B. longum* CECT 30763 tiende a normalizar este valor eliminando la significancia.

Globalmente, los resultados de estos tests de comportamiento evidencian que el tratamiento con *B. longum* CECT 30763 restaura el comportamiento depresivo y ansiogénico en ratones que han sido expuestos a estrés social crónico, que son modelo de estas patologías.

EJEMPLO 3. Efectos de la cepa *B. longum* CECT 30763 sobre la respuesta inmune en un modelo animal de depresión inducido por estrés social.

Se analizó la respuesta del sistema inmune en plasma, bazo e intestino delgado mediante citometría de flujo en el modelo animal de depresión inducida por estrés social agudo y crónico. Para evaluar esta respuesta se empleó la citometría de flujo que es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz.

Para medir citocinas y quimioquinas en plasma se obtuvo el plasma a partir de sangre con EDTA y centrifugando a 3500 rpm, 10 minutos a 4°C. Se empleó un kit multiplex (LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel) específico para marcar citocinas y quimioquinas con fluorescencia y poder ser cuantificadas de forma simultánea mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras marcadas se analizaron mediante citometría de flujo con un equipo FORTESSA (Beckton Dickinson, BD LSR-FORTESSA SORP).

Las células del intestino delgado se aislaron de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente por nuestro grupo (López-Almela et al., *Bacteroides uniformis combined with fiber amplifies metabolic and immune benefits in obese mice*. Gut Microbes.2021, 13(1):p. 1)., Las células aisladas y suspendidas en el tampón FACS (PBS con BSA al 0,5%) se incubaron con diferentes marcadores inmunitarios durante 30 minutos a 4°C

en la oscuridad para medir las subpoblaciones de linfocitos (concretamente Linfocitos T reguladores también denominados como Tregs).

Para el bazo se prepararon suspensiones unicelulares presionando los tejidos a través de un colador celular de 100 μ m (Sarstedt colocado en un tubo de 50 ml utilizando el émbolo de una jeringa de 1 ml y lavando el colador con 1X PBS estéril suplementado con 5% de FBS (FACS 5%). Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 300 g. Los glóbulos rojos se lisaron mediante una incubación de 10 minutos a 37 °C con 5 ml de tampón de lisis RBC 1X (eBioscience). Las células inmunes se lavaron con FACS 5%.

Las muestras de bazo e intestino fueron teñidas en FACS 5% con una incubación previa con anti-mouse CD16/CD32 (clon 2.4.G2, Bioscience). Las células Tregs fueron determinadas con: CD45 AF700, CD19 PE-Cy7, CD4 PE, CD3 PerCp Cy5.5, CD 8 FITC, CD25 APC, Foxp3 BV421 (BD). Para el marcaje intracelular se empleó el kit Mouse Foxp3 Buffer Set (BD). Las muestras fueron adquiridas en BD LSR-FORTESSA SORP (Beckton Dickinson) y analizadas con el software de citometría de flujo FCS express versión 5.

Los resultados en plasma de la quimioquina CXCL9 (Fig. 5A), que promueve la diferenciación y la multiplicación de los leucocitos, y la CXCL10 (Fig. 5B), que medía las respuestas inmunitarias a través de la activación y el reclutamiento de leucocitos, se mostraron significativamente aumentadas en los ratones estresados respecto del grupo control ($p < 0.01$). El tratamiento con *B. longum* CECT 30763 redujo significativamente ($p < 0.05$) esta alteración en ambos casos. Estas quimioquinas se encuentran aumentadas en pacientes que presentan niveles elevados de ansiedad y síntomas depresivos, por lo que el tratamiento con el *B. longum* CECT 30763 estaría mejorando marcadores inmunológicos asociados a los estados depresivos y ansiogénicos.

Los resultados de CCL2 (Fig. 5C), quimioquina implicada en el reclutamiento de monocitos, células T de memoria y células dendríticas en los sitios de inflamación, estaba aumentada en el grupo de ratones estresados ($p < 0.001$) y la administración de *B. longum* CECT 30763 restauró esta alteración ($p < 0.001$). Esta quimioquina está aumentada en pacientes con trastorno depresivo mayor, por lo que estos resultados indicarían que *B. longum* CECT 30763 es capaz de disminuir este marcador inflamatorio de depresión en plasma.

Los resultados de IL-6 (Fig. 5D) y TNF- α (Fig. 5E) mostraron un aumento significativo

en el grupo de ratones estresados ($p < 0.0001$ y $p < 0.001$, respectivamente). El tratamiento redujo esta alteración en ambos casos, aunque no llegó a ser un resultado significativo a un valor de $p < 0.05$. La IL-6 tiene un papel crucial en la patogénesis de la depresión y es una de las citocinas que más aumenta en el suero de los sujetos con depresión tanto en ensayos clínicos como preclínicos. Mientras que existe una relación entre los niveles de TNF- α en suero y los sujetos con trastornos de ansiedad. Por lo que podríamos afirmar que *B. longum* CECT 30763 está ejerciendo un papel positivo en la respuesta inmune relacionada con la depresión y la ansiedad.

Globalmente, los resultados indican que *B. longum* CECT 30763 está ejerciendo un papel positivo ya que restaura 5 quimioquinas y citoquinas en plasma, que se encuentran alteradas en pacientes con cuadros de depresión y/o ansiedad. Algunos de estos mediadores inflamatorios también están implicados en el desarrollo de patologías cardiovasculares. Especialmente, CCL2 tiene un papel crucial en el desarrollo inicial de este tipo de patologías, ya que favorece la infiltración de macrófagos y otras células del sistema inmune en el tejido cardíaco, activando, entre otras cosas, una cascada de producción de citoquinas pro-inflamatorias entre las que se incluyen IL-6 y TNF- α . En este caso *B. longum* CECT 30763 podría estar ejerciendo un papel importante sobre la salud cardiovascular ya que la reducción de estas quimioquinas se ha relacionado con una disminución en la fibrosis intersticial y menor disfunción cardíaca en enfermedad cardiovascular.

Los resultados de citometría en células de bazo y en células del intestino delgado (Fig. 6A y 6B, respectivamente), mostraron que los linfocitos T reguladores (Tregs) estaban disminuidos de forma significativa como consecuencia del de estrés crónico y que *B. longum* CECT 30763 era capaz de aumentarlos ejerciendo un efecto anti-inflamatorio tras la exposición repetida al estrés. Además, en el modelo de estrés social agudo (estrés durante 5 minutos un único día) la administración de la bacteria demostró ser capaz de aumentar los linfocitos Tregs de forma significativa ($p < 0.001$) e independiente del efecto del estrés (Fig. 6C). Este último resultado sugiere que *B. longum* CECT 30763 tiene *per se* un efecto antiinflamatorio que ejercido en etapas tempranas de la exposición al estrés reduce los efectos adversos de la exposición continuada.

EJEMPLO 4. Efecto de la cepa *B. longum* CECT 30763 sobre la respuesta neuroendocrina en un modelo animal de depresión inducido por estrés social crónico.

Los resultados del tratamiento con *B. longum* CECT 30763 sobre la respuesta endocrina se midieron mediante el análisis en plasma de la liberación de corticosterona, principal hormona liberada al torrente circulatorio en respuesta a la activación del eje HPA que se produce cuando el organismo percibe estrés. Para preparar la muestra se añadió metanol frío a proporción 1:3 al plasma para desproteínizar, se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se inyectó en el espectrofotómetro de masas.

Los resultados (Fig. 7A) mostraron que el estrés durante 10 días consecutivos es capaz de aumentar significativamente ($p < 0,0001$) los niveles de corticosterona en plasma. El tratamiento con *B. longum* CECT 30763, logró reducir ligeramente los niveles de corticosterona aunque esta reducción no fue significativa.

Se evaluó la respuesta dopaminérgica ya que la dopamina tiene un papel relevante en la depresión inducida por estrés. Se midió concretamente la dopamina (DA) en plasma. Para medir la dopamina se empleó el mismo método utilizado para la corticosterona.

Los resultados (Fig. 7B) mostraron que el grupo de ratones estresados mostró un aumento claro, aunque no significativo, de los niveles de DA en plasma y que el tratamiento con *B. longum* CECT 30763 fue capaz de normalizar de forma significativa ($p < 0,01$, Fig. 7B)).

Se analizó la expresión de dos de los principales receptores de DA en la corteza prefrontal del cerebro que se encuentra afectada tanto en modelos animales como en pacientes con depresión. El análisis se hizo mediante qPCR, para ello se extrajo con trizol el RNA, se obtuvo el cDNA mediante retrotranscripción inversa y se realizó la qPCR con los cebadores específicos para cada gen.

Los cebadores que se emplearon para identificar los receptores fueron los siguientes:
 D2L: 5'-3'-F-GGAGTTTCCCAGTGAACAGGCGG (SEQ ID NO: 7) y 5'-3'-R-TTGCTATGTAGACCGTGGTGGGATG.(SEQ ID NO: 8)
 D1: 5'-3'-F-CAGGTAAACCAGATTACAGTCCTTG (SEQ ID NO: 9) y 5'-3'-R-TTAGGATGCTATAGACTCTGCCCTA (SEQ ID NO: 10).

El gen de referencia o "housekeeping" con el que se comparó y cuantificó la expresión

génica de ambos receptores fue el RPL19 y los cebadores empleados fueron: 5'-3'F-CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT (SEQ ID NO: 11) y 5'-3'R-GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA (SEQ ID NO: 12).

Los resultados mostraron que el receptor D2L (Fig. 8A) se encuentra significativamente disminuido ($p < 0,05$) en el grupo de ratones estresados. El tratamiento con la bacteria restauró esta alteración ($p < 0,05$). En cuanto al receptor D1R (Fig. 8B) se observó una disminución no significativa de la expresión del receptor y el tratamiento muestra una tendencia a restaurar esta ligera alteración (Fig. 8B).

Estos resultados, en conjunto, demuestran que *B. longum* CECT 30763 es capaz de mejorar la respuesta endocrina así como la respuesta dopaminérgica en un modelo animal de depresión inducida por estrés crónico social.

EJEMPLO 5. Efecto de la cepa *B. longum* sobre la respuesta hepática en un modelo animal de depresión inducido por estrés social crónico.

Se analizó la expresión de los genes codificantes de Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1), Colágeno tipo 1 cadena alfa 1 (Col1a1) y Colágeno tipo 3 cadena alfa 1 (Col3a1) (Fig. 9A, B, C, respectivamente) en hígado de los ratones del modelo de estrés social por RT-qPCR.

Tras el análisis de los datos, observamos que el colágeno tipo I esta significativamente aumentado en el grupo de estrés crónico y que el tratamiento con el probiótico era capaz de evitar este efecto. Los resultados de expresión del colágeno tipo III parece que siguen una tendencia similar, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Sin embargo, aunque esperaríamos observar un aumento en la expresión de TGF β 1, ya que es una molécula profibrótica expresada por los miofibroblastos para fomentar la producción de colágeno, no se observaron cambios. Esto puede explicarse ya que esta molécula forma parte de los primeros pasos de la vía de la fibrosis, y, por tanto, tras 10 días de exposición de los ratones al estrés, la expresión ya no esté aumentada, pero sí la proteína o sus genes diana como son los colágenos.

Los cebadores que se emplearon fueron los siguientes:

TGF β 1: 5'-3'- ACCATGCCAACTTCTGTCTG (SEQ ID NO: 13) y 5'-3'-
CGGGTTGTGTTGGTTGTAGA (SEQ ID NO: 14).

Col1a1: 5'-3'-AATGGCACGGCTGTCTGCGA (SEQ ID NO: 15) y 5'-3'-
AGCACTCGCCCTCCCGTCTT (SEQ ID NO: 16)

5 Col3a1: 5'-3'-CTGTAACATGGAACTGGGGAAA (SEQ ID NO: 17) y 5'-3'-
CCATAGCTGAACTGAAAACCACC (SEQ ID NO: 18)

En relación a la salud metabólica, se ha observado que *B. longum* CECT 30763 tiene efectos protectores sobre algunos de los cambios inducidos por el estrés crónico en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado, principal órgano responsable del metabolismo de los mismos. Concretamente, la expresión de la encima ACC1 (acetil-CoA carboxilasa 1) (Fig. 10A) disminuye con el estrés. Esta enzima participa en la síntesis *de novo* de ácidos grasos y se ha visto que la disminución de su actividad produce un aumento del almacenamiento de grasa y de triglicéridos en sangre [Chow, J.D., et al., *Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation*. Mol Metab, 2014. 3(4): p. 419-31.]. El tratamiento con *B. longum* CECT 30763 es capaz de aumentar de forma estadísticamente significativa su expresión en el hígado de ratones con un estrés crónico. Los cebadores que se emplearon fueron los siguientes:

20 ACC1: 5'-3'- TAATGGGCTGCTTCTGTGACTC (SEQ ID NO: 19) y 5'-3'-
CTCAATATCGCCATCAGTCTTG (SEQ ID NO: 20).

Además, el estrés aumenta la expresión de la enzima DGAT (diacilglicerol O-aciltransferasa 1) (Fig. 10 B), implicada en la síntesis de triglicéridos en el hígado a partir de ácidos grasos de la dieta, y reduce la expresión del gen de la enzima CPT1a (carnitina palmitoiltransferasa 1A) (Fig. 10 C) implicada en la oxidación de ácidos grasos y su utilización como fuente de energía. Todo esto provoca un aumento del acúmulo de lípidos en el hígado y favoreciendo la esteatosis hepática. Este desequilibrio entre DGAT/CPT1a (Fig. 10 D) es revertido por *B. longum* CECT 30763, mejorando el metabolismo y disminuyendo el riesgo de desarrollar las alteraciones relacionadas. Los cebadores que se emplearon fueron los siguientes:

DGAT: 5'-3'-TCCGTCCAGGGTGGTAGTG (SEQ ID NO: 21) y 5'-3'-TGAACAAAG
AATCTTGACAGACGA (SEQ ID NO: 22).

35 CPT1a: 5'-3'-TTTGAATCGGCTCCTAATGG (SEQ ID NO: 23) y 5'-3'-
CCCAAGTATCCACAGGGTCA (SEQ ID NO: 24).

Se empleó como gen de referencia el RPL19 cuyos cebadores ya se han especificado en el Ejemplo 4.

5 EJEMPLO 6. Efecto de la cepa *B. longum* CECT 30763 sobre el estrés oxidativo en un modelo animal de depresión inducido por estrés social crónico.

Se ha analizado en tejido cardiaco la presencia de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (Fig. 11), un biomarcador de daño en ADN por estrés oxidativo, que se ha
10 relacionado con alteraciones cardiacas, especialmente en patología hipertensiva. Para estudiar la presencia de daño en ADN por estrés oxidativo, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia en cortes transversales de 10µm de grosor de los corazones de los ratones de los distintos grupos experimentales. Estos cortes se incubaron en primer lugar con un anticuerpo primario monoclonal de ratón frente a 8-OHdG y posteriormente
15 con un anticuerpo secundario frente al primario de ratón fluorescente (Alexa Fluor® 488). También se utilizaron faloidina, una sonda conjugada con un colorante fluorescente en rojo (Alexa Fluor® 546) que marca de forma específica fibras de F-actina, y el marcador fluorescente DAPI que marca de forma específica los núcleos celulares. Para la cuantificación de este daño oxidativo, se analizaron las imágenes
20 obtenidas en un microscopio a 16x con una lámpara de fluorescencia y se calculó el porcentaje de área marcada por el anticuerpo 8-OHdG del área total de tejido .

El análisis de los datos muestra que el estrés crónico en los ratones induce estrés celular debido a la estimulación neurohormonal o a una inflamación excesiva que altera el
25 equilibrio antioxidante de los cardiomiocitos (células musculares del corazón), que aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) induciendo daños en el ADN y en su expresión y, en consecuencia, efectos nocivos sobre la función celular. Esto se ve reflejado con el aumento significativo ($p<0,05$) de -hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en corazón. El tratamiento con *B. longum* CECT 30763 disminuye de forma
30 estadísticamente significativa ($p<0.01$) el daño en ADN producido por estrés oxidativo en tejido cardiaco en el modelo de estrés crónico (Fig. 11) evitando así los efectos perjudiciales derivados, como el aumento de la apoptosis celular, la formación de fibrosis o de la probabilidad de arritmias. Por tanto, podemos afirmar que *B. longum* CECT 30763 está ejerciendo un papel positivo sobre la función cardiaca y podría estar evitando
35 o retardando la aparición de futuras enfermedades cardiovasculares asociadas al modelo animal de depresión inducida por estrés crónico.