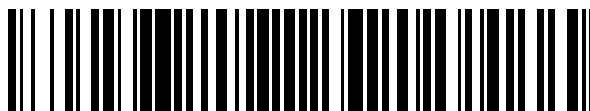


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 302**

51 Int. Cl.:

A61K 31/11 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)
A61K 31/085 (2006.01)
A61K 31/618 (2006.01)
A23K 20/111 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2013 PCT/EP2013/066094**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020067**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013 E 13744529 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2879662**

54 Título: **Composiciones para aliviar trastornos del tracto gastrointestinal o trastornos sistémicos asociados a los mismos en rumiantes y camélidos**

30 Prioridad:

31.07.2012 DE 102012015029

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

**FREIE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)
Kaiserswerther Str. 16-18
14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**STUMPPF, FRIEDRIKE;
ROSENDAHL, JULIA y
ASCHENBACH, JÖRG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 302 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para aliviar trastornos del tracto gastrointestinal o trastornos sistémicos asociados a los mismos en rumiantes y camélidos

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a complementos alimenticios para aliviar trastornos del tracto gastrointestinal y trastornos sistémicos relacionados con los mismos en un animal del suborden de los rumiantes (*Ruminantia*) o de los tilópodos (*Tylopoda*) (rumiantes). Además, la presente invención se refiere a medicamentos para el tratamiento de enfermedades que están asociadas a trastornos del tracto gastrointestinal, en particular acidosis ruminal y/o paresia puerperal.

10

Antecedentes de la invención

15

En la explotación actual de animales de producción aparecen con frecuencia trastornos metabólicos gastrointestinales, ya que su alimentación se ha tenido que modificar, a causa de las exigencias de la producción animal moderna, para garantizar un suficiente mantenimiento así como aumento de la masa animal para la producción cárnica y, además, una suficiente producción de productos tales como leche. A este respecto ha resultado ser problemático, entre otras cosas, que la capacidad de reabsorción de los órganos gastrointestinales no sigue el ritmo de la demanda.

20

La ración normal de un rumiante es forraje en forma de plantas herbáceas y productos secundarios celulolíticos de la producción agrícola. Estos se dan como alimento en forma fresca como pasto o hierba cortada, en forma seca como heno o en un estado conservado como ensilaje. La capacidad para usar estos materiales como fuentes de alimento solo es posible gracias a una fermentación bacteriana pregástrica en el rumen, la sección no de tipo fundus del estómago animal. Aquí, una acción bacteriana reduce los hidratos de carbono con estructura compleja, celulosa, hemicelulosa y lignina, y los hidratos de carbono no estructurales asociados; pectina, almidones y azúcar hasta dar ácidos grasos de cadena corta que se reabsorben a través de la pared del rumen y entran en el metabolismo de los hidratos de carbono. Aparte de los ácidos grasos también se reabsorben derivados de nitrógeno, tales como amoníaco, y electrolitos, tales como sodio, calcio y magnesio a través de la pared del rumen y pasan a la sangre.

25

30

Los microorganismos que se desarrollan en el rumen, después del flujo fuera del rumen se someten a una acción digestiva en el estómago de tipo fundus y en el intestino delgado y representan la fuente esencial de proteínas del rumiante. Por el contrario, las proteínas contenidas en el alimento son degradadas por la flora microbiana del rumen sobre todo hasta dar amoníaco, que debe entrar de nuevo en la biosíntesis de proteína microbiana para poder ser aprovechado por el animal.

35

La adaptación de los rumiantes a una digestión pregástrica ha desarrollado un sistema de retención de la ración ingerida, lo que representa una parte importante del mecanismo para la máxima extracción de la energía de los hidratos de carbono estructurales de difícil digestión. Esta retención requiere una cierta renuncia en la ingestión de alimentos, que se limita adicionalmente en alimentos que se basan en forrajes, ya que el alimento ingerido más grueso se tiene que retener durante más tiempo para conseguir una extracción eficaz de la energía. Esto representa un problema especial en el caso de los rumiantes domesticados modernos, ya que la demanda de nutrientes que se genera por una selección genética en relación con un rápido crecimiento de músculo magro o alto nivel de producción de leche superará, en gran medida, el aporte que se genera por una fermentación de la ración basada en forraje.

40

45

La ración que se tiene que dar como alimento requiere la adición de grandes cantidades de hidratos de carbono no estructurales (almidones y azúcares), que se dan como alimento en forma de granos. Además es necesaria una alimentación con nutrientes ricos en proteínas (por ejemplo, harina de soja o leguminosas) para cubrir la demanda de proteínas. Esos aditivos conducen a una actividad de fermentación acelerada en el rumen, liberándose altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta y amoníaco que representan, con frecuencia, una fuente de estrés fisiológico y metabólico. A este respecto se produce con frecuencia una desviación acidótica del medio del rumen (acidosis ruminal). Como una consecuencia, las estrategias alimentarias deben intentar maximizar el uso de forraje sin alterar el aporte de nutrientes necesario para el mantenimiento y la producción. Como alternativa se puede intentar optimizar la reabsorción de los productos de la fermentación que se producen durante la fermentación ruminal, de tal manera que aparezcan menos trastornos gastrointestinales, o ninguno, tales como por ejemplo la acidosis ruminal.

50

55

60

Los tratamientos recomendados para la acidosis ruminal, como uno de los trastornos o afecciones gastrointestinales más frecuentes, incluyen la administración de una mezcla de bicarbonato sódico, formaldehído, óxido de magnesio y carbón para destruir las bacterias que se dividen rápidamente (NebGuide G91-1074-A). No obstante, por ello se inhibe también la degradación, necesaria para el paso posterior, de fibras estructurales de forrajes, heno o ensilaje por enzimas bacterianas. Para la neutralización de los ácidos que se producen durante la fermentación se usan además tampones (Horn, 1979, Kennlley, 1999) que, no obstante, no parecen ser suficientemente eficaces para

65

- satisfacer a la industria animal. La palatabilidad de la mayoría de los tampones es mala y requiere un manejo cuidadoso para evitar una reducción en la ingestión del alimento. Los antibióticos ionóforos, tales como monensina, lasalocid y salinomycin, en general son eficaces contra bacterias gram-positivas, inclusive las bacterias ruminales principales formadoras de lactato, *S. bovis* y especies de *Lactobacillus* (Burrin y Britton, 1986, Coe, 1999, Nagaraja, 1985). Por tanto, son eficaces en la prevención de acidosis aguda en el paso a la alimentación con alimento muy concentrado, cuando los bovinos llegan por primera vez a las instalaciones de engorde en semiestabulación o después del parto y estabilizan el pH del rumen. Sin embargo, los ionóforos reducen también la ingestión de alimento. También se ha mostrado que otras clases de antibióticos previenen o mejoran la acidosis aguda, inclusive la virginamicina en ovejas (Thorniley *et al.*, 1998) y el antibiótico peptídico que contiene azufre tiopeptina, que es particularmente eficaz contra *S. bovis* (Armstrong, 1984). Sin embargo, el uso a largo plazo de aditivos alimenticios antibióticos, entre otras cosas debido a la generación de resistencias con efectos secundarios para el ser humano, ya no se considera una herramienta adecuada de gestión (para una revisión véase: *The use of drugs in food animals: benefits and risks*, 1999).
- En otro trastorno o enfermedad gastrointestinal que aparece con frecuencia, la paresia puerperal, la concentración en sangre de calcio disminuye a valores que conducen a trastornos en la transmisión de excitaciones neuromusculares con consecuencia de parálisis. La causa son las altas pérdidas de calcio con la leche, la insuficiente capacidad de reabsorción del tracto gastrointestinal y la insuficiente movilización de los depósitos corporales (huesos y proteínas plasmáticas). A esto contribuye el estado metabólico alcalótico del rumiante. Como terapia habitualmente se administra un alimento diferenciado antes y después del parto, administrándose alimento mineral sin Ca en el periodo seco y alimento mineral rico en Ca a partir del parto. Como alternativa se administran elevadas cantidades de sales de Ca y vitamina D. No obstante, altas dosis de vitamina D pueden conducir a calcificaciones irreversibles del tejido de partes blandas (Littledike *et al.*, 1986) y la alimentación diferencial es compleja de llevar a cabo. Además, la vitamina D favorece la incorporación de Ca en el hueso, a partir de lo cual puede producirse una disminución adicional de la concentración en sangre de calcio. Con la administración de altas concentraciones de sales de calcio ciertamente se produce una corrección parcial del estado metabólico alcalótico del animal con una posterior capacidad de movilizar en mayor medida calcio del hueso (Goff y Horst, 1993), sin embargo, no bastante frecuencia esto conlleva a una ingestión menor de calcio cuando la alimentación dura demasiado tiempo. En este caso, dosis demasiado altas de calcio pueden ser incluso tóxicas (Goff *et al.*, 2002). Además, se emplean las denominadas sales "aniónicas" o "ácidas", tales como por ejemplo sulfato de amonio (Goff *et al.*, 2004; Gelfert *et al.* 2010), con las que se debe corregir el estado metabólico alcalótico del rumiante para favorecer la movilización de calcio de hueso y proteínas plasmáticas. Pero también en este caso se debe contar con una reducción de la ingestión de alimento. La paresia puerperal sigue representando una considerable complicación que reduce la producción y también en este caso existe una necesidad de nuevos complementos alimenticios o medios para prevenir y aliviar la enfermedad.

Por el documento EP 1 609 372 A2 se conocen complementos alimenticios que contienen timol, eugenol y/o aldehído cinámico y que se emplean para mejorar la producción de leche en vacas.

- Ante este trasfondo, el objetivo de la presente invención era facilitar complementos alimenticios que fuesen adecuados como complementos alimenticio o como componente integral de un alimento para animales, garantizar un aprovechamiento óptimo de los alimentos para animales en animales del suborden de los ruminantes (*Ruminantia*) o de los tilópodos (*Tylopoda*) (ruminantes) al prevenir la generación de trastornos subclínicos o enfermedades manifiestas de causa metabólica, tales como, por ejemplo, la acidosis ruminal o la paresia puerperal, aumentar el aprovechamiento de las proteínas y/o mejorar la relación de la ingestión de alimento con respecto a la producción del animal (por ejemplo, producción láctea).

Breve descripción de la invención

- Para conseguir el objetivo, la presente invención facilita complementos alimenticios que contienen sustancias que pueden modular la actividad de uno o diferentes canales receptores de potencial transitorio (TRP, *Transient Receptor Potential*) y, por tanto, se pueden clasificar como agonistas y/o antagonistas de estos canales. Para esto se proponen métodos de alimentación de acuerdo con la invención que comprenden la administración con la alimentación o la administración farmacológica de uno o varios de los agonistas y/o antagonistas de TRP señalados en el anexo o de uno o varios de estos complementos alimenticios que contienen moduladores de TRP en un intervalo de concentración de 0,01 a 10 g/kg de alimento para influir en los procesos de reabsorción en ruminantes así como en camélidos.

- Sin desear quedar ligado a una teoría, a causa de los resultados mostrados en los ejemplos se supone que los moduladores de TRP pueden modular la velocidad con la que se reabsorben cationes tales como amonio, calcio, magnesio y protones del rumen. Como otra ventaja, los moduladores de TRP o los complementos alimenticios de acuerdo con la invención que contienen los mismos influyen en la reabsorción de los iones indicados del rumen de tal manera que se causa una mejora de trastornos del tracto gastrointestinal. Además, debido a la modificación de los acontecimientos de reabsorción en el tracto gastrointestinal se produce una mejora del estado de salud y/o de la producción del animal, realizándose por ejemplo una mayor incorporación de amoniaco en proteína microbiana aprovechable por el animal con una menor liberación al medio ambiente. Preferentemente, los complementos

alimenticios de acuerdo con la invención a este respecto no influyen en la microflora en el intestino de los rumiantes o tilópodos.

Como alternativa o adicionalmente se facilitan moduladores de TRP y composiciones que contienen los mismos para su uso en el alivio de una afección de un animal en el tracto gastrointestinal.

Las figuras muestran

Fig. 1: medición de la corriente transepitelial a través del epitelio del rumen del bovino. La adición de NH_4Cl 40 mM a la solución de mucosa (Ringer) conduce a un claro aumento de la corriente de cortocircuito (I_{sc}). La administración adicional de mentol (1 mM) como modulador de TRP conduce a un aumento adicional de esta corriente, partiéndose de una apertura de canales iónicos permeables para iones NH_4^+ .

Fig. 2: resumen de los resultados. Se han aplicado los valores medios de la corriente transepitelial (\pm ETM) a lo largo del tiempo de 13 mediciones individuales en 3 epitelios distintos como en la Figura 1. Después de la administración de mentol ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) como modulador de TRP se produce un aumento estadísticamente significativo de la corriente a través del epitelio ($p < 0,05$; Student-Newman-Keuls). Se observan resultados similares también en ensayos con la administración de una menor dosis ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) de mentol).

Fig. 3: problemas del rumiante. La capacidad de reabsorción del rumen para cationes tales como calcio, magnesio e iones H^+ (protones) es limitada. En el rumen se produce la desviación acidótica con reducción del aprovechamiento proteico. Por el contrario, sistémicamente se encuentra una deficiencia en protones (=estado metabólico básico o alcalosis), que dificulta la movilización de calcio y magnesio de los depósitos en hueso y proteínas plasmáticas. El amoniaco (NH_3) que escapa del rumen agudiza la acidosis ruminal y la alcalosis sistémica. Además se evita la transformación de amoniaco en proteína microbiana para la formación de leche y la producción de carne. El amoniaco absorbido sistémicamente es tóxico, se debe excretar y conduce a una contaminación del medio ambiente.

Fig. 4: La reabsorción de amoniaco/amonio del rumen. El amonio (NH_4^+) que se encuentra en el rumen se escinde de forma continua hasta dar amoniaco (NH_3), escindiéndose un protón (H^+). El NH_3 escapa rápidamente del rumen, ya que la membrana lipídica de las células del epitelio del rumen es altamente permeable para sustancias liposolubles tales como amoniaco (NH_3). El protón queda atrás y acidifica rumen, mientras que la entrada de amoniaco (NH_3) en la célula y, a continuación, en el organismo contribuye a la generación de una alcalosis (= desviación del metabolismo básica). Como alternativa puede llegar amonio (NH_4^+) a través de la membrana celular. De vía de transporte hacen los canales catiónicos no selectivos que conducen numerosos cationes a través del epitelio del rumen, entre ellos también calcio y magnesio (Martens y Harmeyer 1978; Lang y Martens 1999; Schweigel, Lang *et al.* 1999; Abdoun, Stumpff *et al.* 2005; Leonhard-Marek, Stumpff *et al.* 2005). Numerosos agonistas y antagonistas regulan, a través de distintos mecanismos, la permeabilidad de estos canales para cationes y conducen así con exposición a la activación de percepciones sensoriales (Ramsey, Dellling *et al.* 2006; Xu, Dellling *et al.* 2006; Vriens, Nilius *et al.* 2008).

Fig. 5: Aumento de la conductividad de cationes: mediante administración de un agonista de TRP se aumenta la capacidad de reabsorción del rumen para cationes. El nitrógeno que no puede ser aprovechado por las bacterias llega sobre todo en la forma protonada como amonio (NH_4^+) a través de la pared del rumen. Por ello se eliminan protones del lumen ruminal y se normaliza el pH del rumen. Al mismo tiempo se corrige la alcalosis sistémica. Los protones desplazan calcio y magnesio de la unión a proteínas plasmáticas y estimulan la secreción de parathormona para la movilización del hueso. Una capacidad mejorada de reabsorción del epitelio del rumen para cationes, entre ellos calcio, magnesio y protones, respalda el efecto. Se normaliza la concentración en plasma de calcio y magnesio y se evita la aparición de estados carenciales de calcio como en la paresia puerperal. En la normalización del valor de pH en el lumen ruminal se espera además un desarrollo bacteriano mejorado con un mayor aprovechamiento del amoniaco remanente para la biosíntesis de proteínas.

Fig. 6: disminución de la conductividad de amonio: mediante administración de un antagonista de TRP se reduce la reabsorción de amonio (NH_4^+) a través de la pared del rumen. Queda más nitrógeno en el rumen y se puede integrar en proteína bacteriana. Se puede reducir la administración a través del alimento de proteínas, disminuye la carga del hígado y lleva menos nitrógeno al medio ambiente. Ya que no se puede descartar una reducción simultánea de la absorción de calcio y protones, esta forma de aplicación se debería considerar sobre todo en bovinos de carne en los que no se presenta la paresia puerperal (=hipocalcemia). Pero también resulta concebible que entre las sustancias que se deben proteger se encuentren las que modulan la permeabilidad de los poros, de tal manera que se absorben en mayor medida cationes bivalentes tales como calcio y magnesio con desplazamiento de los cationes monovalentes (tales como amonio) del poro. Se espera acidosis ruminal que aparece con

mayor frecuencia como posible efecto secundario indeseado de la administración de un antagonista de TRP. Se podrían emplear antagonistas de TRP por ejemplo en producción extensiva con una alta proporción de alimento bruto. Aquí aparece con menor frecuencia la acidosis ruminal.

5 **Fig. 7:** mediciones en la cámara de Ussing horizontal. **A:** la sustitución de NMDG+ 40 nM por una cantidad equimolar de NH₄⁺ conduce a un aumento significativo de la corriente transepitelial. La medición demuestra que el epitelio transporta amonio en forma ionizada. **B:** efectos de concentraciones crecientes de mentol sobre la corriente transepitelial.

10 **Fig. 8:** mediciones en la cámara de Ussing horizontal: **A:** efecto de aldehído cinámico en la corriente transepitelial. **B:** efecto de salicilato de metilo sobre la corriente transepitelial.

15 **Fig.: 9:** mediciones en la cámara de Ussing horizontal. Representación comparativa de nueve mediciones en las que se puso timol 1 mM en una solución de perfusión sin Na⁺ que contenía NH₄⁺.

20 **Fig. 10:** flujo de calcio a través del epitelio del rumen. **A:** aumento dependiente de la concentración del transporte de calcio a través del tejido ruminal después de la administración de mentol en dos concentraciones distintas en comparación con el grupo de control. N=4 (bovinos) n=85 (epitelios). **B:** modificación del transporte de calcio a través del tejido ruminal después de la administración de timol en comparación con el grupo de control. N=2 (una vaca, una oveja); n=44 (epitelios).

Definiciones y términos

25 A menos que se desprenda inequívocamente otra cosa a continuación del contexto, en el caso del uso de las formas en singular o formas en plural queda comprendido siempre tanto el plural como el singular.

30 El término de una "composición" comprende, en el sentido de la invención, medicamentos y complementos alimenticios y está caracterizada por que al menos uno de los constituyentes o ingredientes es un modulador de canal de TRP en el sentido de la presente invención. Están enumerados ejemplos de moduladores de TRP en el sentido de la presente invención en las Tablas 10 a 13. Por un "modulador de TRP" se entiende sustancias que activan ("agonistas de TRP"), inhiben ("antagonistas de TRP") uno o varios canales de TRP o incluso sustancias que tienen un efecto diferente en diferentes canales de TRP.

35 Las proteínas de canal de TRP forman canales de TRP que comprenden 6 dominios transmembrana que median en el flujo catiónico de forma correspondiente a sus gradientes electroquímicos, por lo que se elevan las concentraciones iónicas intracelulares de Ca²⁺ y Na⁺ y se despolariza la respectiva célula. También pueden atravesar los poros otros cationes, dependiendo la permeabilidad selectiva del tipo de canal (Owsianik, Talavera *et al.* 2006). Según la nomenclatura dominante, los genes para las 28 subunidades de canal conocidas se dividen en 7 familias.

40 Muchos de los canales de TRP se pueden activar por múltiples estímulos. Esta sensibilización polimodal sugiere que los estímulos fisiológicamente relevantes de un determinado canal de TRP dependen del respectivo contexto celular. Además, la cooperación entre diferentes canales de TRP contribuye a que, en relación con sustancias que interaccionan, no siempre es sencillo realizar la delimitación entre un agonista y un modulador.

45 Los canales de TRP tienen múltiples funciones como sensores que permiten a células individuales y al respectivo organismo constatar cambios en el entorno que comprenden cambios de temperatura, detección de contactos, dolor, sabor y de determinadas sustancias químicas (véase Ramsey *et al.*, 2006; y Vriens *et al.*, 2008). Pero también está demostrada una participación de estos canales en la reabsorción epitelial de calcio (Lambers, Bindels *et al.* 2006) y magnesio (Voets, Nilius *et al.* 2004).

50 Basándose en los resultados de ensayo mostrados en el presente documento, con la adición de los agonistas y/o antagonistas de TRP se debe contar con un cambio (aumento en el caso del empleo de agonistas; inhibición en el caso del empleo de antagonistas) de los parámetros electrofisiológicos y de las velocidades de transporte a través del epitelio del rumen.

La "familia de canal de TRP" relevante para el mamífero consta de seis subfamilias:

- TRPC (clásico)
- 60 • TRPV (receptor vainilloide)
- TRPM (melastatina)
- TRPA1 (ANKTM1)
- TRPP (policistina)
- 65 • TRPML (mucolipina)

Estas subfamilias se pueden clasificar en subgrupos, de los cuales se expresan muchos en el tracto gastrointestinal del mamífero.

5 En el sentido de la presente invención se entiende por agonistas y/o antagonistas de TRP en particular los correspondientes agonistas y/o antagonistas de los siguientes canales:

TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPV6
TRPA1, TRPM3, TRPM5, TRPM6, TRPM7, TRPM8.

10 De los términos y la función de los canales de TRP como canales iónicos se desprende que un agonista en esencia aumenta la conductividad de iones del epitelio del rumen a través del canal en cada caso influido, mientras que un antagonista disminuye la misma.

15 El término de los "ruminantes" o "*Ruminantia*" comprende en el sentido de la invención animales del suborden de los artiodáctilos (*Artiodactyla*), que están caracterizados por un estómago de ruminante policavitario que permite a los animales, entre otras cosas, una digestión eficaz de la celulosa. El estómago en estos animales se divide en cuatro cavidades, los tres pre-estómagos, en concreto el rumen (también herbario, estómago papilar o panza), el retículo (también red, redecilla o bonete), el omaso (también libro, estómago de hojuelas, librillo o salterio) y el estómago verdadero, el abomaso (también cuajo o cuajar). Como consecuencia se cuentan como pertenecientes a los ruminantes animales de las familias de los jiráfidos (*Giraffidae*), de los mósquidos (*Moschidae*), de los antilocápridos (*Antilocapridae*), de los cérvidos (*Cervidae*) y de los bóvidos (*Bovidae*). En particular, en el sentido de la presente invención pertenecen a los ruminantes animales del grupo que comprende: vacas, ovejas, cabras, jirafas, yaks, ciervos comunes, gamos comunes, alces, corzos, antílopes, búfalos y bisontes.

25 La expresión de los "tilópodos (*Tylopoda*) (ruminantes)" comprende en el sentido de la invención animales del suborden de los artiodáctilos, cuya estructura estomacal se parece a la de los ruminantes, a pesar de una falta de homología. En comparación con los ruminantes presenta un omaso (librillo) reducido que, por este motivo, se representa en parte como de tres partes. Se cuentan como pertenecientes a esto animales de la familia de los camélidos (*Camelidae*), de los géneros de los camellos del Viejo Mundo (*Camelus*), llamas (*Lama*) y vicuñas (*Vicugna*). En particular, en el sentido de la presente invención se consideran pertenecientes a los tilópodos animales del grupo que comprende: camellos, dromedarios, alpacas, llamas, guanacos y vicuñas.

35 La expresión de la "acidosis ruminal" comprende un trastorno metabólico en ruminantes y en tilópodos que aparece sobre todo como consecuencia de cantidades demasiado elevadas de alimentos para animales ricos en hidratos de carbono y cantidades demasiado pequeñas de alimentos fibrosos para animales en la ración (Dirksen *et al.*, 2002). La acidosis ruminal está caracterizada por una sobreacidificación del rumen, es decir, un bajo valor de pH del líquido ruminal, por norma general por debajo de pH 5,5 (el valor normal se encuentra en aproximadamente pH 5,9 y superior). La acidosis ruminal puede conducir a considerables trastornos en la composición de la flora ruminal y, como consecuencia, a la lesión de la mucosa ruminal (abrasión).

40 El pH del líquido ruminal se puede medir después de su extracción. Puede tener lugar una extracción a través de una sonda introducida por vía oral, sin embargo, el valor informativo en este caso se ve alterado debido a la saliva muy alcalina. Por este motivo, para la extracción de líquido ruminal es más adecuada la extracción por punción del saco ruminal caudoventral (ruminocentesis) con acceso ventrolateral, tal como se describe en Nordlund *et al.* 1994 y 45 1995. Como alternativa se puede registrar el valor de pH también mediante el empleo de una sonda/bolo (por ejemplo, de la empresa smaXtec animal care sales GmbH; Graz, AUSTRIA) durante cierto tiempo directamente en el estómago y leerse de forma inalámbrica, tal como se describe, por ejemplo, en Gasteiner *et al.*, (2009) en la sección Material y Métodos en las páginas 3-5, cuyo contenido de divulgación se incorpora por referencia en la presente solicitud. La medición debería tener lugar aproximadamente 2-4 horas después de la alimentación, siempre en varios animales de una manada, considerándose asegurado el diagnóstico de una acidosis ruminal cuando se comprueba un pH reducido en al menos el 25 % de los animales.

55 La acidosis ruminal aguda está caracterizada por una brusca disminución del valor de pH con una alta concentración de ácido láctico ruminal (50 -100 mM). La población microbiana ruminal experimenta un desplazamiento significativo, aumentando mucho la cantidad de bacterias ácido lácticas gram-positivas. El pH decreciente conduce a la muerte de bacterias gram-negativas y a la reducción o la desaparición completa de protozoos flagelados. La acidosis ruminal subaguda (entre pH 5,2 y 5,8) y la acidosis metabólica latente de forma crónica están caracterizadas por una menor ingestión de alimento (inapetencia) y un rendimiento corporal por ello menor, entre otros producción de leche y rendimiento de engorde, (Enemakr *et al.*, 2004, Garret *et al.* 1999). Puede conducir también a modificaciones de la consistencia de las heces, que puede tener un color verde grisáceo y ser de pastosa a tener consistencia de sopa. 60 Con una manifestación de gravedad media de la acidosis ruminal, el ruminante interrumpe la ingestión de alimentos y se pierde de flujo de leche. Otros síntomas son trastornos digestivos graves, tales como cólicos y diarrea, así como apatía, pérdida de equilibrio y cojeras. Se puede clasificar la acidosis ruminal como subclínica o clínica correspondientemente a la existencia de síntomas o su ausencia/manifestación débil. En casos graves, los animales resultan lentos y apáticos, no se pueden levantar, se puede observar también gemidos y bruxismo. En caso de una 65 evolución rápida aparecen agitación, temblores musculares, dolor al encoger las extremidades o incluso fenómenos

de cólicos, sudoración, postración y revolcado así como diarrea grave con secreciones verde-amarillentas, espumosas-acuosas, en muchas ocasiones sanguinolentas. En caso de evolución grave, después de los síntomas que se han descrito previamente se produce la inactividad de los animales que están apáticos, posteriormente comatosos o presentan altas frecuencias cardíacas de >120 pulsaciones/min. Sin tratamiento se puede producir la muerte del animal.

Como consecuencia de déficit de tiamina producido de forma secundaria puede aparecer adicionalmente necrosis de la corteza cerebral.

Una causa frecuente de la acidosis ruminal es una proporción demasiado elevada de ingredientes fácilmente digeribles del alimento (por ejemplo almidón, azúcar), tal como por ejemplo una proporción demasiado elevada de alimento concentrado en las raciones totales de alimento y una proporción demasiado baja de fibra bruta estructurada. También repentinos cambios de alimentación pueden conducir a acidosis. Ya que los hidratos de carbono obtenidos gracias a la degradación de alimento concentrado son fácilmente digeribles, durante la degradación microbiana del almidón se producen inicialmente grandes cantidades de ácidos grasos de cadena corta. Además, disminuye la actividad de la rumia, por lo que llega una cantidad demasiado baja de saliva alcalina y enriquecida con tampones al rumen y se sobreacidifica el contenido del rumen. Por ello se ve alterada la composición de la microflora en el rumen, se produce un aumento de microorganismos formadores de ácido láctico y una disminución adicional del pH, de tal manera que disminuye la fermentación hasta dar ácidos grasos volátiles que se pueden reabsorber a través de la pared del rumen y que se pueden aprovechar energéticamente por el rumiante. Por el contrario, se acumula lactato en el rumen, el pH del rumen disminuye y la pared del rumen se lesiona hasta la disolución de la función de barrera con formación de abscesos hepáticos y otras manifestaciones sistémicas (Nocek 1997; Owens, Secrist *et al.* 1998; Kleen, Hooijer *et al.* 2003; Krause y Oetzel 2006).

La expresión "paresia puerperal" (también hipocalcemia o "fiebre vitularia") describe una afección metabólica de animales en lactación, tales como vacas lecheras. De forma correspondiente al nombre, la afección está caracterizada por una disminución del contenido total de calcio en el plasma por debajo de los límites fisiológicos de 2,3-3 mmol/l (Kraft y Dürr 2005). Aparece como hipocalcemia subclínica (déficit de calcio) alrededor del momento del parto y en fases tempranas de la lactación. La paresia puerperal aparece con una incidencia del 5 % (Horst, 1986) o del 6-10 % (Malz y Meaer, 1992). Aparte de la cetosis, se cuenta entre los trastornos metabólicos más frecuentes (Fürl *et al.*, 1996). Son signos típicos de una paresia puerperal en primer lugar una ingestión reducida de alimento, agitación y nerviosismo, seguido de un estado de debilidad generalizada e inmovilidad. La actividad del estómago está reducida, se interrumpe la excreción de heces y orina. En otros estadios sigue una inmovilidad del animal en posición de decúbito prono y estados comatosos que conducen a la muerte del animal en caso de falta de tratamiento (Blum y Fischer 1974, Radostits *et al.* 2000; Allen y Davies 1981; Martig 2002; Oetzel 1988, Horst *et al.* 1997).

Debido a la hipocalcemia clínica o subclínica además se produce distocia, prolapso uterino, retención de placenta, endometritis, infertilidad, mastitis, desplazamiento de abomaso, cetosis e inmunosupresión (Ducusin *et al.*, 2003, Houe *et al.*, 2001, Kimura *et al.*, 2006), que se tienen que abordar en su totalidad terapéuticamente.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna se supone que los complementos alimenticios de acuerdo con la invención debido a una digestión mejorada indirectamente o mediante influencia en la conductividad de iones Ca/Mg de los correspondientes canales de TRP causan directamente una mayor absorción de iones calcio o magnesio o movilización de los mismos. Además, una corrección del estado metabólico alcalótico del rumiante debería conducir a una normalización de la excreción de parathormona con posterior movilización de calcio de los depósitos en el hueso.

El término "alivio", aparte de con su significado reconocido en general, es decir, el alivio de la causa y/o de los síntomas de una dolencia, se puede emplear también en el sentido de los significados reconocidos en general del término "tratamiento", es decir, la prevención, evitación, contención, alivio, mejora, ralentización, detección o inversión de la progresión o gravedad de un estado patológico o de las dolencias del mismo. En particular, en este sentido aparte del alivio de la causa y/o los síntomas de un trastorno del tracto gastrointestinal tal como la acidosis ruminal puede estar comprendido también el tratamiento y la prevención del correspondiente trastorno.

La expresión "vehículo de alimento para animales" comprende productos de partida de alimento para animales o agua que después de la combinación, complejación o agregación con uno o varios de los agonistas de TRP y/o antagonistas de TRP de acuerdo con la presente invención representa el complemento alimenticio de acuerdo con la invención o el alimento para animales.

En relación con el uso de los agonistas de TRP y/o antagonistas de TRP de la presente invención como medicamento, la expresión "vehículo farmacéutico" comprende ingredientes inertes que después de la combinación, complejación o agregación con uno o varios de los agonistas de TRP y/o antagonistas de TRP de la presente invención representan las formulaciones farmacéuticas deseadas y están en disposición de liberar las mismas en el lugar de acción deseado (es decir, en el estómago) en el animal. Por consiguiente, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden cualquier composición que se prepara mediante mezcla de un modulador de la

presente invención y un vehículo farmacéutico, que se pueden usar para aliviar afecciones gastrointestinales, donde puede ser útil la modulación de los canales de TRP. Los vehículos de alimento para animales o vehículos farmacéuticos preferentes consisten en o comprenden sustancias del grupo que comprende compuestos que contienen silicio, tales como wollastonita (conocida también como volastonita, CaSiO_3 , o con más precisión $\text{Ca}_3[\text{Si}_3\text{O}_9]$, ácidos silícicos precipitados, Aerosil, tierra de diatomeas, silicatos de aluminio, silicatos de calcio, silicatos de hierro y silicatos de magnesio. Aparte o en lugar de los compuestos que contienen silicio se pueden usar también compuestos insolubles en el tracto gastrointestinal de los rumiantes o de los tilópodos (rumiantes) e inocuos en cuanto a la fisiología de la alimentación tales como sulfato de calcio dihidrato, óxidos de aluminio y óxidos de magnesio. Preferentemente, las anteriores sustancias de vehículo se usan de forma altamente dispersa con una superficie específica de más de $20 \text{ m}^2/\text{g}$, por lo que se evita un desmezclado de vehículo y principios activos (moduladores de TRP). Sin desear quedar ligado a teoría alguna se supone que las sustancias de vehículo a este respecto hacen también de emulsionante para que los complementos alimenticios de la presente invención sean más fácilmente digeribles para liberar los principios activos. Otra posibilidad consiste en la administración de las sustancias en una sustancia de vehículo de oleosa a grasa. En este sentido se pueden emplear grasas y aceites grasos (aceites) animales y vegetales, prefiriéndose no obstante grasas y aceites vegetales tales como, por ejemplo, grasa de coco y aceite de colza. En una forma de realización, en caso del empleo de sustancias de soporte oleosas, los constituyentes sólidos se dispersan preferentemente en el aceite vegetal o grasa vegetal usado como vehículo hasta que consiga una distribución uniforme de los constituyentes sólidos y, mediante una viscosidad correspondiente, se evita un desmezclado de los principios activos y vehículos durante el almacenamiento. Son ejemplos del aceite vegetal usado de acuerdo con la invención aceite de colza, aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de girasol y aceite de germen de trigo y también mezclas de estos aceites, tales como por ejemplo un aceite mixto de aceite de palma y aceite de coco. En caso del empleo de aceite vegetal, en una forma de realización el vehículo farmacéutico o la sustancia de vehículo a causa de sus ventajas en cuanto a la fisiología de la alimentación y en cuanto a la técnica de procesamiento comprende preferentemente aceite de colza, aceite de palma o aceite de soja o mezclas de estos aceites. Son ejemplos de aceites vegetales preferentes aceite de coco y aceite de palma, aquí en particular aceite de palma protegido que comprende ácidos grasos de aceite de palma saponificados (jabones de Ca) y grasa de pulverización en frío al igual que mezclas de estas grasas. Por tanto, en una forma de realización, el vehículo farmacéutico o la sustancia de vehículo comprende grasa de coco o grasa de palma, preferentemente grasa de palma protegida. Además, en una forma de realización el vehículo farmacéutico o la sustancia de vehículo comprende mezclas de al menos de una de las grasas que se han mencionado anteriormente con al menos uno de los aceites que se han mencionado anteriormente.

La compatibilidad tanto del vehículo del alimento para animales como del vehículo farmacéutico se garantiza al seleccionarse para esto solamente sustancias que no tengan ninguna influencia perjudicial al ser ingeridas por el animal.

El agonista o antagonista de TRP puede estar comprendido en un extracto vegetal o derivarse del mismo. Preferentemente, el agonista y/o antagonista de TRP se facilita como principio activo aislado, por ejemplo aislado de material vegetal o extracto vegetal o preparado mediante síntesis química. Frente a esto preferentemente no se emplean plantas enteras que contengan agonistas y/o antagonistas de TRP de la presente invención en los complementos alimenticios de acuerdo con la invención para conseguir los efectos descritos en el presente documento de los agonistas y/o antagonistas de TRP para aliviar trastornos del tracto gastrointestinal y trastornos sistémicas relacionadas con los mismos en un animal del suborden de los rumiantes o de los tilópodos (rumiantes). Por tanto, en una forma de realización preferente, al menos uno de los moduladores de TRP está presente como principio activo aislado en el alimento para animales de la presente invención.

Pellas, piezas prensadas, granulados y compactados indican formas de alimentos para animales o complementos alimenticios que después de la mezcla de sus constituyentes se han reducido en su volumen mediante prensado, por lo que se pueden ahorrar por ejemplo capacidades de transporte y de almacenamiento. Ya que debido al prensado también se retira agua de los alimentos para animales o complementos alimenticios se prolonga también su tiempo de conservación. Los términos se pueden emplear en parte de forma intercambiable, sin embargo en parte se diferencian en su tamaño. Por piezas prensadas (aproximadamente $2 - 30 \text{ mm}$), granulados (aproximadamente $0,5 - 3 \text{ mm}$) y compactados se entiende partículas fluidas de menor tamaño, las pellas pueden tener hasta aproximadamente 4 cm de tamaño (en función de la longitud o del diámetro). Los flóculos representan asimismo una forma prensada y secada que, no obstante, presenta más bien una forma plana bidimensional en comparación con las demás formas tridimensionales. En un ejemplo de realización, los complementos alimenticios de la presente invención se formulan de tal manera que la liberación de los moduladores de TRP de la presente invención se realiza en el rumen. Esto se puede conseguir, por ejemplo, al incorporarse los moduladores de TRP aislados en una sustancia de vehículo que contiene grasa, tal como se ha definido anteriormente. Debido a un aumento de temperatura existente en el rumen (a diferencia de la temperatura ambiental) se produce la liberación de las sustancias. Como alternativa, la incorporación de los moduladores de TRP aislados se puede realizar en una sustancia de vehículo sensible a ácido, realizándose una liberación de los moduladores de TRP inducida por el valor de pH ácido existente en el rumen de forma dirigida en el rumen.

La expresión "complemento alimenticio" o "aditivos alimenticios" en el presente documento, a menos que se indique de otro modo, se emplean de forma equivalente y comprenden sustancias, microorganismos o preparaciones que no

son productos de partida de alimentos para animales o premezclas y se añaden de forma intencionada a alimentos para animales o agua para cumplir una o varias funciones tales como, por ejemplo, el alivio de los trastornos y enfermedades definidos en el presente documento. Estas funciones se pueden seleccionar como alternativa, adicionalmente y en parte también de manera adecuada del grupo que comprende: influencia positiva en la naturaleza del alimento; influencia positiva en la naturaleza de los productos animales, cubrir la necesidad de alimentación de los animales; influencia positiva en las consecuencias ecológicas de la producción animal; influencia positiva en la producción animal, el rendimiento o el bienestar de los animales, en particular debido a la acción sobre la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los alimentos para animales; ejercer un efecto coccidiostático o histomonastático.

El término "trastorno" se usa de forma sustancialmente equivalente al término "afección" o enfermedad en el sentido conocido en general como con relación a un estado de debilidad, dolencia o necesidad de un mamífero debido a una función defectuosa de un órgano, de la psique o de todo el organismo. Además, el término "trastorno" se emplea para describir asimismo estados de un organismo que están debilitados por la manifestación de los síntomas concomitantes al estado y que caracterizan el mismo, mientras que en una afección los síntomas se manifiestan con mayor intensidad hasta los estados con peligro para la vida del organismo. En relación con la nomenclatura médica, el término "trastorno" se refiere a un estado de debilidad sintomáticamente subclínico o subagudo de un organismo, mientras que el término "afección" se refiere a un estado de debilidad clínico, agudo o incluso crónico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un complemento alimenticio para su uso en el alivio de trastornos del tracto gastrointestinal o trastornos sistémicos asociados a los mismos mediante modulación de un canal receptor de potencial transitorio (TRP) en un animal del suborden de los rumiantes (*Ruminantia*) o de los tilópodos (*Tylopoda*) (rumiantes) que contiene al menos un agonista y/o antagonista de TRP. En particular se usan agonistas y/o antagonistas de TRP de acuerdo con la invención o los complementos alimenticios que contienen los mismos para influir, es decir, mejorar la reabsorción de cationes en el rumen, preferentemente caracterizados por que comprenden los cationes amonio y/o calcio.

Los enfoques para optimizar la concentración de nitrógeno en el rumen para la fermentación microbiana se basan actualmente en exclusiva en una adaptación de la composición o de la forma de presentación del alimento o en intervenciones en los acontecimientos de fermentación microbiana [1-3].

No obstante, para la concentración de nitrógeno en el rumen, aparte del aporte con el alimento, también desempeña un papel el hecho de que llegan cantidades grandes y variables de nitrógeno en forma de amoníaco desde el rumen a la sangre y se excretan desde allí través del riñón [4-6]. Esto representa un gran problema en dos aspectos en la producción animal moderna: por un lado se tiene que aumentar el aporte de nitrógeno con el alimento (por norma general en forma de alimento proteico caro); por otro lado aparecen problemas al desechar los productos excretados, cuyos altos contenidos en nitrógeno contaminan el medio ambiente. Como muestra una compilación del año 2000 de la Bundeszentrale für politische Bildung, el 95 % de las emisiones de NH₃ proceden de la agricultura, debiéndose a su vez el 50 % de las mismas a la producción de rumiantes [7].

Hasta ahora, en general se ha partido de que en el caso del acontecimiento de reabsorción que conduce a pérdidas de nitrógeno desde el rumen a la sangre se trata de un proceso de difusión exclusivamente pasivo de la molécula de NH₃ lipófila no cargada a través de la membrana lipídica de las células epiteliales del rumen. Con este concepto no se pueden combinar distintas observaciones en cuanto a la fisiología de transporte en cuanto a la reabsorción de amoníaco *in vivo* [8] e *in vitro* [9].

Un punto de partida de la presente invención era la hipótesis de que aparte de la difusión de la forma lipófila de amoníaco a pH fisiológico del rumen (aproximadamente pH 6,4) pueden llegar grandes cantidades en forma de NH₄⁺ a través de proteínas especiales a la sangre, cuya naturaleza parece hacer concebible una influencia farmacológica. Esto se ha podido demostrar en el marco de los ensayos en los que se basa la presente invención en preparaciones de órganos (epitelio de rumen fresco, aislado de vaca). Aquí se ha mostrado una conductividad inducida por amonio en la que se ha podido influir de forma significativa mediante la aplicación de acuerdo con la invención de moduladores de TRP, tales como por ejemplo capsaicina y mentol. Como muestran los Ejemplos 1 y 4 y las Figuras 7 a 10, también se pueden emplear otros moduladores de TRP, tales como se muestra como un ejemplo mediante mentol, timol, salicilato de metilo y cinamaldehído (denominado también cinamal o aldehído cinámico) para influir en la conductividad inducida por amonio en el epitelio del rumen. Así se ha podido demostrar la capacidad de influencia en los mecanismos de reabsorción mediados por proteínas y representa la base de las composiciones de acuerdo con la invención, que se describen con más detalle a continuación.

Estos ensayos respaldan además la hipótesis de trabajo en relación con la naturaleza de la proteína modulada, por lo que se debe partir del efecto de una pluralidad de sustancias adicionales en la conductividad de amonio del rumen (véase anexo). Además se ha podido demostrar que aparte de la conductividad para amonio también se puede influir en la reabsorción de calcio. Se tiene que partir de que también se puede influir en la conductividad de otros cationes (en particular, sodio, potasio, magnesio, protones) por estas sustancias, ofreciendo los complementos

alimenticios de la presente invención la ventaja de poder regular los mecanismos de reabsorción para estos cationes de forma diferencial para optimizar los mismos. En otras palabras se emplean, de acuerdo con los hallazgos resultantes por los experimentos llevados a cabo de acuerdo con la invención, agonistas y/o antagonistas de TRP preferentemente de forma dirigida para influir en la conductividad de cationes, en particular de iones amonio y calcio.

A causa de esto, el complemento alimenticio de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para el tratamiento de enfermedades y para influir en condiciones de la producción animal en las que el metabolismo de nitrógeno y calcio desempeña un papel y/o procesos metabólicos, que se ven influidos por esos iones y su reabsorción en el rumen. Por tanto, en una forma de realización, el complemento alimenticio de la presente invención está caracterizado por que el mismo contiene al menos un agonista y/o antagonista de TRP para influir en la reabsorción de cationes en el rumen, comprendiendo los cationes preferentemente amonio y/o calcio.

Preferentemente, el al menos un agonista y/o antagonista de TRP está presente en una concentración que se corresponde (recalculado) en esencia a la que es suficiente para influir en la conductividad de epitelio del rumen aislado y/o células epiteliales del rumen para amonio de acuerdo con la descripción experimental en el Ejemplo 1 y/o 2 y/o el flujo de calcio a través del epitelio del rumen de acuerdo con la descripción experimental en el Ejemplo 4.

Preferentemente, la concentración del al menos un agonista y/o antagonista de TRP se encuentra como máximo 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces o 6 veces por encima del valor calculado, más preferentemente como máximo 5 veces o 4 veces, aún más preferentemente como máximo 3 veces o 2 veces por encima del valor calculado y en particular preferentemente como máximo 1,5 veces por encima del valor calculado o en el valor calculado, preferentemente teniendo en cuenta la cantidad recomendada de adición de complemento alimenticio y el peso del animal que se va a tratar.

Otra ventaja de las composiciones de la presente invención resulta debido a que una influencia en los procesos de reabsorción en el rumen tendrá efectos en la composición del contenido del rumen, por lo que son de esperar efectos sobre toda la función del rumen (fermentación, motórica, etc.) y de los siguientes órganos (salterio, abomaso, duodeno) con efectos de tipo creciente en la producción animal.

El cambio de la I_{sc} por adición de mentol y otros moduladores de TRP mencionados en el anexo, comprobado en los experimentos *in vitro* realizados en preparaciones de órganos, descritos en el presente documento, demuestra una influencia en la conductividad iónica del epitelio del rumen por estas sustancias. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, mediante estos resultados de los ensayos se asume que las proteínas que intervienen en los procesos de transporte a través del epitelio del rumen se pueden ver influidas por moduladores de TRP tales como mentol, como representante ilustrativo de sustancias del tipo mentol, y/o sustancias de tipo timol, tales como por ejemplo, timol o capsaicina.

El complemento alimenticio de acuerdo con la invención que se ha definido anteriormente está caracterizado preferentemente por que el canal de TRP pertenece al grupo que comprende TRP vainilloide 1 (TRPV 1), TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPV6, TRP anquirina 1 (TRPA 1), TRP melastina 3 (TRPM 3), TRPM 5, TRPM 6, TRPM 7 y TRPM 8.

En una forma de realización, el complemento alimenticio de acuerdo con la invención está caracterizado por que el agonista de TRP y/o antagonista de TRP está presente como principio activo aislado.

En este sentido, en una forma de realización preferente de la presente invención, el complemento alimenticio está caracterizado por que el agonista de TRP y/o antagonista de TRP se selecciona del grupo compuesto por capsaicina (número de CAS 404-86-4), capsazepina (número de CAS 138977-28-3), capsiato (número de CAS 205687-01-0), capsaicinoide, mentol (números de CAS 2216-51-5, 89-78-1, 15356-60-2, 1490-04-6), eucaliptol (número de CAS 8024-53-1), resiniferatoxina (número de CAS 57444-62-9), resiniferanoide, piperina (número de CAS 94-62-2), piperidina (número de CAS 110-89-4), alcanfor o canfor (números de CAS 76-22-2, 464-49-3, 464-48-2), bisandrografolida (5508-58-7), 2-aminoetil-defenilborinato, icilina (número de CAS 87-08-1), olvanilo (número de CAS 58493-49-5), verapamilo (número de CAS 52-53-9, 152-11-4), quinidina (número de CAS 6591-63-5), GsMTx4, hipérico, hiperforina (número de CAS 11079-53-1), jengibre (*Zingiber officinale*; número de CAS 84696-15-1), vainillilacetona (zingeron; número de CAS 122-48-5), evadamina, [6,8,10]gingerol (número de CAS 23513-14-6), [6,8,10] shogaol (número de CAS 555-66-8), otros shogaoles, cannabinoil (número de CAS 521-35-7), cannabidiol (número de CAS 13956-29-1), cannabis, tetrahidrocannabinol (THC; número de CAS 1972-08-3), otros cannabinoides, poligodol (número de CAS 6754-20-7), drimaniol (número de CAS 352311-05-8), cinamodial (número de CAS 23599-45-3), cinamosmolida (número de CAS 23599-46-4), cinamolida (número de CAS 23599-47-5), afromodial, ancistrodial (número de CAS 68398-28-7), merulidial (número de CAS 68053-32-7), drimenol (número de CAS 468-68-8), grifolina (números de CAS 6379-55-1, 6903-07-7), neogrifolina (número de CAS 23665-96-5), albaconol, o-prenilfenol (número de CAS 1128-92-3), BCTC (N-(4-butilfenil terciario)-4(3-colorpiridin-2-il)tetrahidropirazina 1(2H)-carboxamida) (número de CAS 393514-24-4), isoveleral (número de CAS 37841-91-1), vainillina (número de CAS 121-33-5), vainillatoxina 1, 2 y 3, arvanilo (número de CAS 128007-31-8), *Cnidarian envenomations*, tapsigargina (número de CAS 67526-95-8), yohimbina (número de CAS 65-19-0), toxina AG489 (número de CAS 128549-96-2), toxina AG505, paradol (número de CAS 27113-22-0), ginsenósido (número de CAS 52286-74-5), aceite de mostaza (número de CAS 57-06-7), isotiocianato de alilo (wasabi; número de CAS 57-06-7),

- carvacrol (número de CAS 499-75-2), carveol (número de CAS 99-48-9), timol (número de CAS 89-83-8), borneol (números de CAS 464-43-7, 464-45-9, 16725-71-6, 10334-13-1, 507-70-0, 124-76-5), mentona (números de CAS 14073-97-3, 3391-87-5, 10458-14-7), geraniol (número de CAS 106-24-1), linalool (números de CAS 78-70-6, 126-91-06, 126-90-9), lactato de mentilo (número de CAS 59259 38 0), p-mentan-3,8-diol (números de CAS 3564-98-5, 3564-95-2, 42822-86-6), L-carvona (número de CAS 6485-40-1), D-carvona (número de CAS 2244-16-8), isopulegol (número de CAS 89-79-2), hiroxicitronelal (número de CAS 107-75-5), alicina (número de CAS 539-86-6), aldehído cinámico (cinamaldehído; número de CAS 104-55-2), salicilato de metilo (número de CAS 119-36-8), isotiocianato de alilo (wasabi) (número de CAS 57-06-7), isotiocianato de bencilo (número de CAS 622-78-6), isotiocianato de feniletilo (número de CAS 2257-09-2), isotiocianato de isopropilo (número de CAS 2253-73-8), isotiocianato de metilo (número de CAS 556-61-6), prostaglandinas (PGA1 14152-28-4, PGB1 13345-51-2, PGC1 35687-86-6, PGD1 17969-82-0, PGE1 745-65-3, PGE2 363-24-6, PGF1 α 745-62-0, PGG2 51982-36-6, PGH3 60114-66-1, PGA2 13345-50-1, PGB2 13367-85-6, PGD3 71902-47-1, PGF2 α 551-11-1, PGF2 β 4510-16-1, PGC3 52590-97-3, PGI2 35121-78-9), inhibidores de síntesis de prostaglandina, ácido acetilsalicílico (número de CAS 50-78-2), paracetamol (número de CAS 103-90-2), ibuprofeno (número de CAS 15687-27-1) y warburganal (número de CAS 62994-47-2).
- Los números de CAS se indicaron en este caso como números de identificación internacionales para la respectiva sustancia y dado el caso las distintas isoformas entre paréntesis detrás de la sustancia. Mediante el número se pueden identificar y comprobar las sustancias individuales y sus fórmulas en bases de datos públicas, por ejemplo, en <http://chemsub.online.fr/> o en obras de consulta en línea, tales como <http://en.wikipedia.org>.
- Los resultados presentados en los ejemplos, en particular en los Ejemplos 1 y 4 y las Figuras 1, 2 y 7 a 10 demuestran que mediante moduladores de TRP de acuerdo con la invención se puede modular la conductividad o la reabsorción de cationes a través del epitelio del rumen. A este respecto se diferencia entre diferentes perfiles de acción que pueden conducir a efectos que se pueden aprovechar de forma diferente en todo el organismo y a causa de los cuales los moduladores de TRP de la presente invención se clasifican y se emplean preferentemente como sigue:

Moduladores de TRP que causan el aumento de la reabsorción de cationes (tipo "mentol"):

- Sin desear quedar ligado a teoría alguna, a causa de los resultados presentados en el presente documento se supone que las sustancias con el perfil de acción que se ha representado en el presente documento a modo de ejemplo mediante mentol (perfil de acción del tipo mentol) son particularmente adecuadas para influir en la conductividad del epitelio del rumen para cationes y mejorar, por tanto, por ejemplo, la reabsorción de calcio y/o magnesio, aumentar la reabsorción de protones del rumen y/o aumentar la reabsorción de amonio del rumen. Por tanto, en una forma de realización, los complementos alimenticios de la presente invención contienen sustancias con el perfil de acción de tipo mentol para modular la conductividad del epitelio del rumen para cationes. En una forma de realización preferente, los complementos alimenticios de la presente invención contienen sustancias de perfil de acción del tipo mentol para mejorar la reabsorción de calcio y/o magnesio, aumentar la reabsorción de protones del rumen y/o aumentar la reabsorción de amonio del rumen.
- La asignación de las sustancias a uno de los dos tipos mencionados de perfil de acción, es decir, al tipo mentol o al tipo timol, se efectúa en relación con los moduladores de TRP de la presente invención preferentemente a causa de su idoneidad para alcanzar los efectos que se han indicado anteriormente e indicados a continuación para los respectivos tipos de sustancia sobre la reabsorción de amonio, calcio, magnesio y/o de protones del rumen. Las sustancias que muestran el mismo perfil de acción que el mostrado en relación con esos efectos en los ejemplos para mentol se asignan al tipo mentol, las sustancias que muestran el mismo perfil de acción que el mostrado en relación con esos efectos en los ejemplos para timol, al tipo timol.

A este respecto, en una forma de realización como constituyente de los complementos alimenticios de la presente invención como sustancias con el perfil de acción del tipo mentol se emplean sustancias del grupo que comprende: mentol, mentona, eucaliptol y geraniol, compuesto preferentemente de mentol, eucaliptol y mentona. De forma particularmente preferente se emplea mentol como constituyente de los complementos alimenticios de la presente invención como sustancia del tipo de perfil de acción de mentol.

A causa de la idoneidad de las sustancias del tipo de perfil de acción de mentol para aumentar la absorción de cationes de rumen y el aumento subsiguiente de la concentración en sangre de magnesio y calcio y/o el aumento de la absorción de amonio del rumen y un aumento subsiguiente del pH del rumen resulta una ventaja particular de los complementos alimenticios de la presente invención que contienen los moduladores de TRP de perfil de acción de mentol debido a su idoneidad para la profilaxis y/o el alivio de la paresia puerperal/tetania de la hierba y/o la profilaxis y/o el alivio de la acidosis ruminal. En un ejemplo de realización, por tanto, los complementos alimenticios de la presente invención que contienen moduladores de TRP del perfil de acción de mentol, de forma particularmente preferente mentol, se emplean para la profilaxis y/o el alivio de la paresia puerperal/tetania de la hierba y/o de la acidosis ruminal. No obstante, una desventaja del uso exclusivo de moduladores de TRP de tipo mentol de la presente invención podría radicar en un empeoramiento del aprovechamiento de nitrógeno debido a pérdidas de amonio del rumen.

65

Moduladores de TRP que causan la inhibición de la reabsorción de cationes (tipo "timol"):

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, a causa de los resultados presentados en el presente documento se espera que las sustancias con el perfil de acción que se presenta en el presente documento a modo de ejemplo mediante timol (perfil de principio activo del tipo timol) son particularmente adecuadas para inhibir la reabsorción de amonio del rumen y/o mejorar la reabsorción de calcio y/o magnesio.

10 Por tanto, en una forma de realización como constituyente de los complementos alimenticios de la presente invención se emplean sustancias con el perfil de acción del tipo timol para inhibir la reabsorción de amonio del rumen y/o mejorar la reabsorción de calcio y/o magnesio. En una forma de realización se emplean como sustancias con el perfil de acción del tipo timol sustancias del grupo que comprende: timol, cinamaldehído (aldehído cinámico), salicilato de metilo, carvacrol, eugenol y aceite de mostaza, compuesto preferentemente de timol, salicilato de metilo y aldehído cinámico, compuesto de forma particularmente preferente de timol. En relación con el aceite de mostaza se emplea adicionalmente o como alternativa como un constituyente preferente isotiocianato de ajo.

15 Mediante los resultados de ensayo descritos en el presente documento se ha podido mostrar que los moduladores de TRP ilustrativos de la presente invención timol, aldehído cinámico y salicilato de metilo presentan un perfil de acción similar en el sistema de pre-estómagos, especialmente el rumen. El timol es un agonista de TRPV3. El aldehído cinámico y el salicilato de metilo son ambos potentes agonistas de TRPA1, a lo cual pertenecen también carvacrol, eugenol y aceite de mostaza (una de cuyas sustancias activas es isotiocianato de ajo); véase también la Tabla 4 en las páginas 90-91 en Vriens, Nilius *et al.*, *Curr Neuropharmacol* 6 (2008), 79-96, cuyo contenido de divulgación queda incluido por referencia en la presente solicitud.

20 El mentol, otro modulador de TRP ilustrativo de la presente invención mostró, por el contrario, otro perfil de acción. El mentol se considera un potente agonista de TRPM8, al igual que mentona, eucaliptol y geraniol (véase la Tabla 3 en Vriens, Nilius, *et al.* (2008); anteriormente, cuyo contenido de divulgación queda incluido por referencia en la presente solicitud.

25 No obstante, el efecto de estas sustancias, también debido a sus complejos con comportamientos de unión y modulación en relación con otros canales de TRP, en diferentes órganos también puede ser diferente.

30 El mentol pertenece por ejemplo asimismo a los agonistas de TRPV3, no obstante los experimentos realizados con este modulador de TRP y descritos en los ejemplos en ensayos en el rumen mostraron un efecto opuesto al timol (asimismo un agonista de TRPV3). Esto señala que aparece un efecto mediado por mentol, específico de TRPM8 o que prevalece frente al mediado por TRPV3.

35 El eugenol pertenece, adicionalmente a su propiedad como agonista de TRPM8, también a los agonistas de TRPA1 y TRPV3 y pertenece por tanto al tipo timol, ya que el perfil de acción descrito en el presente documento ya se ha mostrado de forma comprobada tanto para agonistas de TRPA1 (aldehído cinámico) como de TRPV3 (timol).

40 Los resultados que se describen en el contexto de la presente invención en relación con mentol, timol, aldehído cinámico y salicilato de metilo en el presente documento al igual que la bibliografía existente se pueden usar también para efectuar una asignación de los moduladores de TRP preferentes de la presente invención, indicados de forma adicional, a los dos tipos de modulador que se han mencionado anteriormente.

45 Sin desear quedar ligado a teoría alguna se supone, por tanto, que

- los moduladores de TRP que muestran un comportamiento similar al descrito en el presente documento para mentol, es decir, que tienen preferentemente un efecto de agonista de TRPM8, se pueden asignar al tipo mentol.
- 50 - Los moduladores de TRP que muestran un comportamiento similar al descrito en el presente documento para timol, aldehído cinámico y salicilato de metilo, es decir, que preferentemente activan TRPV3 y/o TRPA1, no obstante no TRPM8, se pueden asignar al tipo timol. Se pueden incluir asimismo en el tipo timol por consiguiente también moduladores de TRP que activan TRPV3, TRPA1 y TRPM8, tales como por ejemplo eugenol.

55 Otra ventaja particular de los complementos alimenticios de la presente invención que contienen los moduladores de TRP del perfil de acción de timol resulta a partir de su idoneidad para la mejora del aprovechamiento de las proteínas por una reducción de la absorción de amonio del rumen a la sangre y un aumento de la concentración de amonio en el rumen y una mayor incorporación, resultante a partir de esto, de nitrógeno en la proteína microbiana, de lo cual resulta como consecuencia también una reducción de la emisión de nitrógeno al medio ambiente. Además, los resultados representados en los ejemplos muestran la idoneidad de los moduladores de TRP de tipo timol para la profilaxis y/o el alivio de estados patológicos marcados por hipocalcemia, tales como paresia puerperal, o hipomagnesemia, tal como en la tetania de la hierba a causa de la mayor reabsorción, causada por los mismos, de calcio o de magnesio. En un ejemplo de realización se emplean por tanto los complementos alimenticios de la presente invención que contienen moduladores de TRP del perfil de acción de timol, de forma particularmente preferente timol, para mejorar el aprovechamiento de las proteínas y/o la profilaxis y/o el alivio de la paresia puerperal/tetania de la hierba. Los complementos alimenticios de la presente invención que contienen los

moduladores de TRP caracterizados en el presente documento que causan la mayor conductividad de calcio del epitelio del rumen o una mayor reabsorción de calcio se emplean para la profilaxis o el alivio de esta enfermedad en todos los estadios de una hipocalcemia. De forma análoga, los complementos alimenticios de la presente invención que contienen los moduladores de TRP caracterizados en el presente documento, que causan la mayor conductividad de magnesio del epitelio del rumen o una mayor reabsorción de magnesio, se emplean para la profilaxis o el alivio de esta enfermedad en todos los estadios de una hipomagnesemia.

Mezclas de los tipos de sustancias que se han mencionado anteriormente:

Según los resultados mostrados en los ejemplos, con la combinación de sustancias de tipo mentol/timol, preferentemente una combinación del propio mentol y el propio timol, se podría conseguir un principio de acción óptimo con una combinación de las ventajas y una sustancial evitación de las desventajas del empleo del respectivo tipo de perfil de acción de la sustancia, tal como se ha expuesto anteriormente, por ejemplo, por tanto una estimulación de la reabsorción de calcio y/o magnesio, profilaxis y/o alivio de la paresia puerperal o tetania de la hierba y/o de la acidosis ruminal y/o una inhibición de la reabsorción de amonio/mejora del aprovechamiento de nitrógeno y una sustancial evitación concomitante del empeoramiento del aprovechamiento de nitrógeno debido a pérdidas de amonio desde el rumen.

Resulta a este respecto una ventaja decisiva del uso de tales preparados de combinación, es decir, complementos alimenticios que contienen moduladores de TRP de ambos tipos de perfil de acción, es decir, del tipo mentol y timol, que al parecer el timol actúa inhibiendo selectivamente el transporte de cationes monovalentes (amonio) sin interferir con los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}).

En este sentido, en un ejemplo de realización, los complementos alimenticios de la presente invención contienen preferentemente al menos un modulador de TRP de cada uno de los dos tipos de perfiles de acción seleccionado del grupo que comprende mentol, mentona, timol, carvacrol, geraniol, aldehído cinámico, eugenol, aceite de mostaza, citral y eucaliptol, de forma particularmente el grupo que comprende mentol, mentona, timol, carvacrol, geraniol, eugenol y aldehído cinámico, aún más preferentemente del grupo que comprende mentol, mentona, timol, carvacrol y eugenol y de forma particularmente preferente del grupo que comprende mentol y timol. A este respecto, en una forma de realización preferente al menos uno de los moduladores de TRP está presente como principio activo aislado en el alimento para animales de la presente invención.

En una forma de realización, en la preparación de los complementos alimenticios de la presente invención se mezclan los moduladores de TRP de los tipos de perfiles de acción que se han mencionado anteriormente en una relación de cantidades de tipo mentol a tipo timol de 1 : 10 a 10 : 1; preferentemente en una relación de cantidades de tipo mentol a tipo timol de 1 : 3 a 3 : 1 y de forma particularmente preferente en una relación de cantidades de tipo mentol a tipo timol de 1 : 1 a 2 : 1.

A este respecto, en una forma de realización en la preparación de los complementos alimenticios de la presente invención se selecciona una cantidad o dosificación diaria de los moduladores de TRP del tipo de perfil de acción de mentol en una cantidad de 10 a 3000 mg/kg de materia seca (MS) del concentrado (C), preferentemente de 20 a 500 mg/kg MS C (sin sustancia de vehículo), más preferentemente de 22 a 333 mg/kg MS C (sin sustancia de vehículo), aún más preferentemente de 22 a 222 mg/kg MS C (sin sustancia de vehículo) y, de forma particularmente preferente, de 56 a 166 mg/kg MS C. En una forma de realización preferente se emplea en este sentido mentol como representante preferente de las sustancias del tipo de perfil de acción de mentol.

En una forma de realización, a este respecto en la preparación de los complementos alimenticios de la presente invención se selecciona una cantidad o dosificación diaria de los moduladores de TRP del tipo de perfil de acción de timol en una cantidad de 10 a 3000 mg/kg de materia seca (MS) del concentrado (C), preferentemente de 10 a 500 mg/kg MS C, más preferentemente de 11 a 167 mg/kg MS C, aún más preferentemente de 11 a 111 mg/kg MS C y, de forma particularmente preferente, de 28 a 84 mg/kg MS C (en cada caso sin sustancia de vehículo). En este sentido, en una forma de realización preferente se emplea timol como representante preferente de las sustancias del tipo de perfil de acción de timol.

En los complementos alimenticios de la presente invención que contienen moduladores de TRP de ambos tipos de perfil de acción, en una forma de realización se selecciona una cantidad total o dosificación diaria de los moduladores de TRP de ambos tipos de perfil de acción de 20 a 6000 mg/kg de materia seca (MS) del concentrado (C), preferentemente de 20 a 1000 mg/kg, más preferentemente de 20 a 500 mg/kg MS C, aún más preferentemente de 33 a 333 mg/kg MS C y, de forma particularmente preferente, de 83 a 250 mg/kg MS C (en cada caso sin sustancia de vehículo). En una forma de realización preferente se emplean en este sentido mentol como representante preferente de las sustancias de tipo de perfil de acción de mentol y timol como representante preferente de las sustancias del tipo de perfil de acción de timol.

En una forma de realización, por tanto, la presente invención pone a disposición un complemento alimenticio para influir en la reabsorción de cationes, tales como por ejemplo amonio, calcio y magnesio en el sistema de pre-estómagos de los rumiantes (*Ruminantia*) o de los tilópodos (*Tylopoda*) (rumiantes), que contiene al menos un

modulador de canal receptor de potencial transitorio (TRP) del grupo de los agonistas y/o antagonistas de TRP, quedando comprendido preferentemente un vehículo de alimento para animales compatible.

5 Algunas de las sustancias que se han indicado anteriormente o extractos vegetales que contienen tales sustancias se han examinado ya en estudios previos. La solicitud internacional de patente WO 2011/153200 A2 describe por ejemplo la administración como alimento de la planta de orégano o extractos de la misma para influir en el proceso de fermentación mediante una influencia en los procesos digestivos en vacas con el fin de una producción reducida de metano. No obstante, no se encuentra indicio alguno en relación con una modificación de los mecanismos de reabsorción del epitelio del rumen para amoníaco o amonio o para otros iones.

10 La solicitud US 2009/0004308 A1 describe la administración de ácido benzoico como complemento alimenticio junto con una mezcla de al menos dos sustancias del grupo compuesto por timol, eugenol y piperina, que están presentes en extractos vegetales o en las propias plantas correspondientes a aves, que debe conducir a una mejor digestión y a una ganancia de peso más rápida de los animales. Allí, no obstante, no se encuentra divulgación alguna de efectos de una administración en el alimento de este tipo en relación con la digestión de rumiantes que se diferencian de forma fundamental en el proceso de digestión de aves.

15 Ando *et al.* (2003) describen el suministro mediante la alimentación de menta en vacas. Observaron un acontecimiento de digestión ligeramente mejorado en los animales alimentados de este modo, no obstante, igualmente sin ningún indicio de una modificación de los mecanismos de la reabsorción del epitelio del rumen para amonio o para otros iones. Además, también observaron una reducción del pH del rumen en los animales a los que se había dado como alimento las hierbas, lo que representaría una contraindicación de este suministro con el alimento en el tratamiento de la acidosis ruminal. A diferencia de los procedimientos y los alimentos para animales presentados en ese documento, la presente invención tiene como objetivo un acontecimiento sin alterar de la fermentación influyendo simultáneamente en la reabsorción.

20 Las concentraciones empleadas de acuerdo con la presente invención de agonistas y/o antagonistas de TRP se encuentran en un intervalo de dosis muy bajo. En la bibliografía existen distintos estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que en el caso de las sustancias y dosificaciones preferentes de acuerdo con la presente invención no se produce influencia alguna en la composición de los microorganismos y en la fermentación que se origina en los mismos.

25 Así, por ejemplo, Evans y Martin (Curr Microbiol 41 (2000), 336 -340) en investigaciones *in vitro* con cantidades de timol de 3-12/60 l no han podido comprobar efecto alguno sobre la flora bacteriana en el líquido ruminal. Macheboeuf *et al.* (Anim. Feed Sci. Technol. 145 (2008) 335-350) en el caso del empleo de timol 1,5 mM (correspondiente a 14 g/60 l de líquido ruminal) no han podido observar ninguna influencia en la producción de metano, amonio, acetato y propionato que se pudiera usar como indicadores de posibles modificaciones de la flora bacteriana. Castillejos *et al.* (J. Dairy Sci. 89 (2006), 2649-2658) no han podido reconocer hasta concentraciones muy altas a partir de 500 mg/l (correspondientes a 30 g/60 l) una influencia significativa sobre pH, concentración de NH₃ y la producción de ácidos grasos volátiles (VFA – *volatile fatty acids*).

30 De forma similar, en la bibliografía tampoco existen indicios de que altas dosis de mentol tengan un efecto sobre la composición de los microorganismos y la fermentación que se origina en los mismos. Así, ni siquiera en el caso del empleo del 0,3 % de mentol en relación con la materia seca de alimento (correspondiente a 8 g de mentol/día) a lo largo de 30 d en toros se ha podido observar influencia alguna sobre la cantidad de *E. coli* en las heces de los animales (véase última sección en la página 139 de la tesis doctoral "*Factors influencing Escherichia Coli 0157 colonization of the gastrointestinal track of feedlot cattle*" de Celine C. Aperce en la Universidad estatal de Kansas en 2012). En el caso del empleo de mentol como constituyente en menta (aceite de menta), Agarwal *et al.* (Anim. Feed Sci. Technol. 148 (2009), 321-327) con 9 g/60 l de líquido ruminal ciertamente han podido observar que se reducía la producción de metano, sin embargo sin que se viera influida la producción de ácidos grasos volátiles o la composición bacteriana.

35 Por tanto, mediante los moduladores de TRP descritos en el presente documento y sus dosificaciones se puede partir de que en el caso del suministro con el alimento de los complementos alimenticios de acuerdo con la invención no se produce ninguna influencia en la composición de los microorganismos y la fermentación que se origina en los mismos. En una forma de realización preferente, por tanto, los complementos alimenticios de acuerdo con la invención no influyen en la microflora en el intestino de los rumiantes o los tilópodos.

40 Frente a esto, en experimentos realizados en relación con la presente invención se ha comprobado que el comportamiento de reabsorción en rumiantes y tilópodos (rumiantes) mediante modulación de los canales de TRP mediante agonistas y/o antagonistas de TRP, tales como por ejemplo mentol, como representante de sustancias de tipo mentol y/o de sustancias del tipo timol, por ejemplo, timol, capsaicina, aldehído cinámico o verapamilo se puede modificar de tal manera que, a causa del flujo iónico modificado, se produce una reabsorción modificada de amonio y de otros iones y, así, se puede contrarrestar la generación de trastornos que se basan por ejemplo en una mayor concentración iónica en el tracto gastrointestinal.

En una forma de realización preferente está presente el complemento alimenticio de acuerdo con la invención, caracterizado por que queda comprendido un vehículo de alimento para animales compatible.

5 En ese sentido se puede usar un alimento para animales discrecional que se dé como alimento a rumiantes, por ejemplo un alimento para animales que comprenda un constituyente de hierba, hortalizas, maíz o ensilaje de grano pequeño o heno, productos secundarios de grano, oleaginosas o harinas de oleaginosas, granos de maíz y pequeños granos, etc. para poner a disposición un alimento para animales complementario.

10 La cantidad de adición del complemento alimenticio de acuerdo con la invención en ese sentido puede variar por cabeza por día dependiendo de la administración y de la especie que se va a alimentar.

En general, el complemento alimenticio de acuerdo con la invención está caracterizado por que el agonista de TRP y/o antagonista de TRP se emplea en un intervalo de concentración de 0,01 a 10 g/kg de alimento.

15 Dependiendo de qué canales de TRP se van a modular y de qué resultado deba tener esta modulación en relación con los respectivos canales de TRP, puede ser ventajoso combinar, en lugar de solo uno, dos o varios moduladores de TRP en un complemento alimenticio. En tales casos, el complemento alimenticio de acuerdo con la invención puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agonistas de TRP; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antagonistas de TRP; o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moduladores de TRP, tal como se enumera en las Tablas 10 a 13, de los cuales algunos son agonistas de TRP y otros antagonistas de TRP. Algunos de los moduladores presentan efectos diferentes en relación con diferentes canales de TRP. El mentol, por ejemplo, es un antagonista del canal iónico TRPA-1, no obstante al mismo tiempo también un agonista del canal iónico TRPM8. Otros moduladores de TRP tales como, por ejemplo, jengibre pueden influir en varios canales de TRP, entre ellos, por ejemplo TRPV3 (véase la Tabla 13). Dependiendo del efecto pretendido pueden estar contenidos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moduladores de TRP, tal como se indica en las Tablas 10 a 13, en un complemento alimenticio de acuerdo con la invención. En una forma de realización, el complemento alimenticio que se ha definido anteriormente está caracterizado por que el complemento alimenticio contiene al menos dos o más agonistas de TRP y/o antagonistas de TRP. En una forma de realización preferente, el complemento alimenticio que se ha definido anteriormente está caracterizado por que el complemento alimenticio contiene al menos un modulador de TRP de tipo mentol y/o de tipo timol, siendo de forma particularmente preferente mentol el modulador de TRP de tipo mentol y timol del modulador de TRP de tipo timol.

35 Como se ha expuesto anteriormente, los complementos alimenticios de la presente invención se pueden emplear en general para un aprovechamiento mejorado del alimento como consecuencia de una digestión mejorada, para la modificación de la composición de los gases que se producen en este sentido, en particular, para la reducción de la generación de amonio así como también en el caso de trastornos del tracto gastrointestinal y/o trastornos/afecciones asociados a los mismos para el alivio de un trastorno/enfermedad de este tipo.

40 Por tanto, la presente invención facilita también un complemento alimenticio tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que se pueden aliviar los trastornos del tracto gastrointestinal o los trastornos sistémicos asociados a los mismos que pertenecen al grupo que comprende alteraciones motoras de red y rumen; alteraciones del paso por los pre-estómagos; inflamación de red y rumen; síndrome de Hoflund; trastornos de la fermentación; acidosis ruminal subaguda; acidosis ruminal subclínica; acidosis ruminal clínica; acidosis ruminal aguda; desplazamiento de abomaso; laminitis; abscesos hepáticos; úlceras; alcalosis ruminal; fermentación pútrida; timpanismo ruminal; enfermedades de la cavidad oral y del esófago; enfermedades de salterio, abomaso, intestino delgado e intestino grueso; hipomagnesemia/tetania de la hierba; hipocalcemia/paresia puerperal. En particular se prefiere que el trastorno del tracto gastrointestinal o el trastorno sistémico asociado al mismo comprenda acidosis ruminal y paresia puerperal.

50 Los agonistas y/o antagonistas de TRP así como los complementos alimenticios de acuerdo con la invención que contienen los mismos están caracterizados asimismo porque, aparte del alivio de los trastornos del tracto gastrointestinal que se han indicado anteriormente o de los trastornos sistémicos asociados a los mismos, son adecuados, en caso de que empeora en primer lugar por ejemplo el estado del animal afectado, también para emplearse de forma transitoria hasta el tratamiento de la correspondiente afección o se pueden emplear también directamente para el alivio de las correspondientes afecciones, es decir, en las afecciones del tracto gastrointestinal homónimas y/o las afecciones sistémicas asociadas a las mismas. Por tanto, los términos trastorno y afección se emplean en este contexto de forma equivalente en relación con la posibilidad del empleo de los moduladores de TRP de acuerdo con la invención para su alivio.

60 Los complementos alimenticios de acuerdo con la invención están concebidos en primera línea para el empleo en la cría y/o producción comercial de animales, a pesar de esto se pueden emplear en animales tanto domesticados como salvajes.

65 En una forma de realización se facilita el complemento alimenticio que se ha definido anteriormente, perteneciendo el animal al grupo que comprende vacas, ovejas, cabras, jirafas, yaks, ciervos comunes, gamos comunes, alces, corzos, antílopes, búfalos, bisontes, camellos, dromedarios, alpacas, llamas, guanacos y vicuñas.

La administración de los complementos alimenticios de acuerdo con la invención se puede realizar de forma aditiva a los alimentos para animales que se facilitan a los animales, por ejemplo en forma de una premezcla que se mezcla con el respectivo alimento antes, durante o justo después de la distribución del alimento para animales a los animales. Ya que actualmente los alimentos para animales se adquieren y emplean con frecuencia ya como mezclas terminadas por los productores de animales, se puede haber añadido los complementos alimenticios de acuerdo con la invención ya a estas mezclas terminadas. Por tanto, en una forma de realización se facilita el complemento alimenticio tal como se ha definido anteriormente, que está caracterizado por que el complemento alimenticio está mezclado en un alimento para animales.

Además se desvela un procedimiento para la producción de un alimento para animales o complemento alimenticio que comprende las siguientes etapas:

- (a) facilitación de una composición de base de un alimento para animales o complemento alimenticio;
- (b) mezcla de un complemento alimenticio y/o al menos un agonista de TRP y/o antagonista de TRP tal como se ha definido anteriormente; y
- (c) formulación de la mezcla obtenida como alimento para animales o complemento alimenticio.

Este procedimiento está caracterizado en una forma de realización por que la composición de base consiste en esencia en un concentrado para vacas disponible en el mercado al que se añade el complemento alimenticio de acuerdo con la invención. Una composición aproximada de un alimento de este tipo está indicada en la Tabla 9, en el anexo. Esta composición está indicada solo como un ejemplo. La composición del alimento puede variar en función del fin de uso. En alimento de engorde, alimento de cría (de terneros) o alimento para leche se puede añadir por ejemplo también grasa bruta y/o premezclas de vitaminas/minerales y se pueden variar las proporciones individuales en la cantidad (por ejemplo, proporción de proteína bruta entre aproximadamente el 15 y el 40 %, proporción de fibra bruta aproximadamente entre el 7 y 20 %, proporción de grasa bruta entre el 2 y el 6 %, etc.). Se pueden obtener composiciones ilustrativas concretas de alimento para vacas por ejemplo de la Solicitud de Patente DE 102006026512 A1, página 3, sección 19, denominadas allí alimento de obtención o alimento de engorde, cuyo contenido de divulgación queda incorporado por referencia en la presente solicitud.

Los moduladores de TRP se pueden emplear en diferente forma en el procedimiento que se ha descrito anteriormente, que comprende las plantas u organismos en los que aparecen o se concentran, extractos de los mismos, principios activos aislados y/o sintetizados. En una forma de realización se facilita el procedimiento que se ha definido anteriormente caracterizado por que se incluye mediante mezcla al menos un agonista de TRP y/o antagonista de TRP como principio activo aislado.

La presente invención se refiere también a alimentos para animales que contienen un complemento alimenticio de acuerdo con la invención o el al menos uno de los moduladores de TRP que se han mencionado anteriormente y/o que se puede obtener mediante el procedimiento que se ha descrito anteriormente.

Una de las ventajas particulares de la presente invención es que, a causa de los experimentos en los que se basa la invención, es posible definir las sustancias individuales que son adecuadas para conseguir el objetivo que se ha descrito anteriormente. Por ello no es necesario dar como alimento partes vegetales que contienen esas sustancias a los animales, sino que ahora es posible administrar las sustancias individuales identificadas como principios activos y, por tanto, intensificar el efecto conseguido por las mismas o dejar que aparezca por primera vez mediante su aislamiento de las sustancias que posiblemente interaccionen con las mismas. Por tanto, en una forma de realización mediante la presente invención se facilita el alimento para animales o el complemento alimenticio de acuerdo con la invención tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que está presente al menos un agonista de TRP y/o antagonista de TRP en una mayor concentración, medida en su contenido en material vegetal bruto o en un extracto vegetal.

El alimento para animales o complemento alimenticio de acuerdo con la invención se puede formular en diferentes formas que son conocidas y habituales en la alimentación animal. En una forma de realización se facilita el alimento para animales o complemento alimenticio tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado por que el alimento para animales o el complemento alimenticio está presente en la forma que comprende comprimido, pella, pellas recubiertas, flóculos, granulado, pieza prensada, compactado, gragea, solución, polvo, en una bolsa, en un constituyente de bloque para lamer o como gotas.

Además se desvela el uso de agonistas de TRP y/o antagonista de TRP tal como se ha definido anteriormente en la preparación de alimentos para animales, complementos alimenticios, aditivos alimenticios y aditivos para beber.

En el caso de trastornos del tracto gastrointestinal agudos o graves y/o los trastornos sistémicos asociados a los mismos se pueden emplear moduladores de TRP de acuerdo con la invención también como un medicamento y, por ejemplo, administrarse solo después de la aparición de los síntomas de la enfermedad. Por este motivo, en otra forma de realización la presente invención facilita el agonista de TRP y/o antagonista de TRP, tal como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento en el tratamiento de trastornos del tracto gastrointestinal o los trastornos sistémicos asociados a los mismos. También en este caso los moduladores de TRP de acuerdo con la

invención son adecuados para servir de medicamento en el tratamiento de las correspondientes afecciones del tracto gastrointestinal y/o las afecciones sistémicas asociadas a las mismas.

5 Finalmente, los complementos alimenticios, alimentos para animales y moduladores de TRP, es decir, agonistas de TRP y antagonistas de TRP, que se han descrito anteriormente e ilustrados en los ejemplos se desvelan para o en la modulación de la velocidad con la que se reabsorben cationes del rumen en un animal del suborden de los ruminantes o de los tilópodos (ruminantes) y/o para el aumento de la incorporación de amoníaco en proteína microbiana aprovechable por el animal.

10 Estas y otras formas de realización están desveladas y comprendidas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. Otras informaciones relacionadas con materiales, métodos, procedimientos, agentes y sustancias que se deben emplear de acuerdo con la enseñanza de la presente invención se pueden obtener de documentos que son accesibles en o mediante bibliotecas y bases de datos públicas. En este sentido se puede usar por ejemplo la base de datos en línea "Medline" que se facilita por el *National Center for Biotechnology Information* y o la *National Library of Medicine* del *National Institutes of Health*. El experto habitual en la materia conoce otras bases de datos y direcciones de internet o se pueden hallar con ayuda de buscadores de internet.

20 Se pueden obtener informaciones generales en cuanto a la sintomatología y el tratamiento de animales y de enfermedades de animales de producción de obras de referencia de la medicina veterinaria, de las cuales se enumeran algunas a continuación como un ejemplo: Dirksen, G.; Gründer, H. D.; Stöber, M.; 2002 Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Parey in Blackwell Verlag GmbH, Berlin-Wien; Hartmann, H.; Meyer, H.; 1994 Klinische Pathologie der Haustiere. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart; Hoffmann, W.; 1992 Rinderkrankheiten. Tomo 1: Innere und chirurgische Erkrankungen, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 304-305; Kraft, W.; Dürr, U. M.; 2005 Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer.

25 Se pueden obtener informaciones generales en relación con la alimentación de ruminantes y estrategias de alimentación también de una pluralidad de obras de referencia y artículos que se publican por instituciones estatales y privadas, de las cuales se enumeran algunas a continuación como un ejemplo: Kirchgessner, M.; 2004 Tierernährung. DLG Verlag, Frankfurt am Main; Jeroch, H.; Drochner, W.; Simon, O.; 1999 Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart; Hoffmann, M. H.; 1990 Fütterungsregime für Rinder in Tierfütterung, Vol 2ª edición. Dt. Landwirtschaftsverlag, Berlin, 3485; Piatkowski, B.; Gürtler, H.; Voigt, J.; 1990; Grundzüge der Wiederkäuerernährung. Gustav-Fischer-Verlag, Jena-Stuttgart, 236 p; Steinwidder, A.; 2005 Milchviehfütterung: Tier- und leistungsgerecht. Stocker, 240 p.

35 La descripción anterior reproduce una divulgación general de la presente invención. En este sentido se ha citado una pluralidad de publicaciones. Se encuentran las indicaciones completas de las referencias al final de la descripción, inmediatamente antes de las reivindicaciones. El contenido de la divulgación de todas las publicaciones citadas (inclusive la bibliografía científica, las patentes concedidas, las solicitudes publicadas de patente, indicaciones e instrucciones de los fabricantes, etc.) se incorporan por referencia de forma expresa en la presente solicitud.

40 Se puede obtener una comprensión más detallada de la presente invención a partir de los siguientes ejemplos específicos que, no obstante, se adjuntan solo con este fin y de ningún modo tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

45 Ejemplos

Materiales y Métodos

Material de investigación

50 Preparaciones de órganos:

- epitelio del rumen recién aislado
- 55 - de vaca (por norma general de mataderos del entorno)
- de oveja (material de FB Veterinärmedizin Berlin)
- de camello (colaboración con colaboradores de Sudán / Arabia Saudí)
- células aisladas y cultivadas de los tejidos indicados arriba

60 *Obtención, preparación y transporte del epitelio*

Los animales se aturden con pistola de perno cautivo y se sacrifican mediante posterior desangrado. El rumen se extrae a lo largo de la cinta de matadero por personal del matadero y se dispone para la obtención del epitelio (vaca) o se extrae en el lugar por los investigadores (oveja).

La extracción del trozo de epitelio del rumen de tamaño aproximadamente 10 cm² se realiza desde la zona ventrolateral (transición saco ruminal ventral-antecámara) del rumen. Para retirar componentes gruesos del alimento, el epitelio obtenido se lava con abundante solución de tampón de transporte (composición véase la Tabla 1) y a continuación se libera mediante "separación" de la capa grasa y muscular.

El transporte y la conservación antes de ensayo se realizaron en una solución de tampón de transporte atemperado (37 °C), gasificada con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) y ajustada a un valor de pH de 7,4 (Tabla 1).

Aislamiento de las células

El aislamiento de las células se realiza de acuerdo con procedimientos establecidos (tripsinización fraccional (Galfi, Neogrady *et al.* 1981; Schweigel, Lang *et al.* 1999)). Para esto se preparan los cilios del epitelio recién extraído y se incuban con agitación en solución de tampón DPBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (PBS de Dulbecco + EDTA + 4 % de penicilina/estreptomicina (10 000 U·ml⁻¹ / 10 000 µg·ml⁻¹) (Biochrom AG, Berlín, Alemania), a la que se añade el 0,25 % de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., EE.UU.). Después de la incubación (aproximadamente 45 minutos) comienzan a desprenderse las células de la capa superior de células (estrato córneo). La suspensión celular se separa mediante filtración (gasa estéril) de material tisular que se incubaba de nuevo en solución fresca. Este procedimiento se repite hasta que en el sobrenadante se muestren las células redondeadas del estrato basal que se separan mediante centrifugación del resto de material celular y se siembran en placas tratadas con colágeno (colágeno A) con medio de cultivo celular M199 con 150 ml·l⁻¹ de suero fetal bovino, L-glutamina (6,8 mmol·l⁻¹), nistatina (2,4 ·10⁵ U·l⁻¹), gentamicina (50 mg·l⁻¹) y kanamicina (100 mg·l⁻¹) (Biochrom AG, Berlín, Alemania o Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., EE.UU.). Después del establecimiento del cultivo se produce un cambio a medio DMEM (Pan Biotech GmbH, Eidenbach, Alemania, con 4,5 g·l⁻¹ de glucosa, 3,7 g·l⁻¹ de NaHCO₃ y L-glutamina) con el 10 % de suero fetal bovino, HEPES (2 %) y penicilina/estreptomicina (1 %). Después de alcanzar la confluencia se realiza el propio día del ensayo o el día antes del ensayo la siembra sobre cubreobjetos.

Ensayos en el epitelio intacto

Los ensayos en el epitelio intacto se realizan tal como ya se ha descrito (Abdoun, Stumpff *et al.* 2005; Abdoun, Stumpff *et al.* 2010). En el caso de los métodos de medición usados se trata de una combinación de método de cámara de Ussing desarrollado por Ussing (1949) y de microelectrodos.

Medición electrofisiológica mediante la cámara de Ussing

En el examen de procesos de transporte epitelial con la cámara de Ussing se incorpora el epitelio de una cámara especial que posibilita enjuagar ambos lados del epitelio (apical: lado del alimento; basolateral: lado de la sangre) de forma separada uno de otro con soluciones de tampón de distinta composición, siguiéndose los parámetros electrofisiológicos (corriente y tensión) a través del epitelio. De este modo se consigue diferenciar entre el transporte de una sustancia no cargada (por ejemplo amoniaco, NH₃) y el transporte de una sustancia cargada (por ejemplo amonio, NH₄⁺), ya que el primero se realiza sin cambio de corriente ni tensión, mientras que el último está acoplado a la transferencia de una carga y, por tanto, modifica los parámetros eléctricos transepiteliales. En este sentido se lleva a cabo el registro simultáneo de los parámetros electrofisiológicos de hasta 24 trozos distintos de epitelios del mismo animal, pudiéndose seleccionar discrecionalmente las soluciones de ensayo.

Recurriendo a una reestructuración especial se examina también la reacción de epitelios individuales con respecto a cambios de solución muy rápidos y que transcurren sin alteraciones en la evolución en el tiempo. De este modo se puede examinar por ejemplo muy bien la reproducibilidad de una intervención farmacológica en el mismo trozo de epitelio. Esta modificación de la técnica de cámara de Ussing clásica se usa preferentemente, aunque no de forma exclusiva, para la "identificación sistemática" comparativa de las distintas sustancias que son objeto de la presente invención. Aparte de esta investigación, cuyas sustancias tienen efecto sobre procesos de transporte, por tanto, la cámara de Ussing se emplea también por ejemplo para caracterizar la dosis con la que se debe contar con efectos mesurables y/o caracterizar la especie iónica transportada que se ve influida por la respectiva sustancia de ensayo.

Medición del transporte ("flujo") mediante la cámara de Ussing

De forma complementaria se determina cuantitativamente la velocidad de transporte de una sustancia a través del epitelio examinando la solución de tampón antes y después de un periodo de ensayo definido (en relación con los métodos de la presente invención para la determinación del flujo de amoniaco mediante un electrodo de amoniaco (Thermo Scientific Orion 9512HPBNWP, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02454) con registro simultáneo de desplazamientos en el pH de la solución o medición del flujo de calcio con isótopos radioactivos).

Medición de los parámetros intracelulares mediante microelectrodo (potencial apical y pH intracelular)

Durante ensayos individuales se introduce un microelectrodo en el epitelio para registrar el potencial de membrana celular y el valor de pH intracelular de la célula al mismo tiempo que los parámetros electrofisiológicos. Por ello es posible diferenciar si se transporta un ion de forma paracelular (es decir, entre las células) o transcelular (es decir, a

través de las células). Los cambios en el potencial de membrana permiten deducir que el transporte se realiza de forma transcelular a través de canales iónicos.

- 5 Este procedimiento experimental es más bien costoso en cuanto a tiempo y se emplea, por tanto, para la caracterización más detallada de reacciones que aparecen en la identificación sistemática de las sustancias en la medición electrofisiológica mediante la cámara de Ussing.

Registro de los parámetros electrofisiológicos transepiteliales:

- 10 El epitelio se sujeta horizontalmente en una cámara de Ussing modificada, estando dirigido el lado de la mucosa hacia arriba. La cámara fabricada a partir de plexiglás tiene un área de corte transversal de 0,79 cm² que se corrige a 1 cm². Para la protección de daños en los bordes del epitelio "edge damage" se coloca en cada caso entre la cámara y el epitelio un anillo de silicona. Las dos cámaras que se producen (de mucosa y serosa) se abastecen por
- 15 en cada caso un sistema de perfusión propio (bomba Stativ de 4 canales, Ismatec SA). Mediante válvulas de tres vías es posible un cambio de solución independiente en las dos cámaras entre en total ocho soluciones. Durante la conservación, las soluciones se someten en sus recipientes a gas de O₂ al 100 %. Para el calentamiento de las soluciones a 37 °C, los tubos flexibles de perfusión atraviesan una bomba de intercambio de calor. El dispositivo de aspiración (Masterflex R/S, Cole Parmer Instrument Company) presente en las dos cámaras garantiza un cambio de solución rápido y seguro. Para descartar de forma segura artefactos de cambio de solución en la administración de
- 20 antagonistas y agonistas, las sustancias se pipetean a la respectiva solución, sirviendo la gasificación para un rápido entremezclado. Así se pueden descartar de forma segura variaciones de presión o una interrupción del flujo por la cámara.

- 25 Como en el método de cámara de Ussing convencional, para la medición de la diferencia de potencial transepitelial y de la corriente transepitelial (I_{sc}) están presentes en cada caso dos electrodos cercanos a tejido y alejados del tejido. La conexión entre los electrodos de Ag/AgCl, que están llenos de KCl 3 M, se establece a través de puentes de agar. Como en Strecker (Strecker 2011), la cámara de medición se une con una instalación de "pinzamiento de voltaje" (*voltage clamp*) (unidad de cámara de Ussing) en una unidad constructiva con un amplificador de microelectrodo (ambos de la empresa Biomedical Instruments, Germering). Un micromanipulador (MF 500) instalado
- 30 sobre la cámara de medición ofrece la posibilidad de mover el microelectrodo en finos pasos de μm . Adicionalmente, por encima del aparato se encuentra un microscopio así como una fuente de luz fría.

Medición con microelectrodos "de doble cañón" (double barreled)

- 35 El microelectrodo "de doble cañón" se fabrica a partir de dos capilares de borosilicato. Un canal sirve para la medición de la diferencia de potencial de membrana apical y se llena con KCl 0,5 M. El otro canal sirve para la medición del valor de pH intracelular. Este canal obtiene en primer lugar mediante la silanización con diclorometilsilano (Sigma-Aldrich) un revestimiento hidrófobo. Después de cargar un intercambiador iónico líquido (Hydrogen-Inophor I Cocktail A; empresa Sigma-Aldrich) se produce la formación de una membrana líquida y, por
- 40 tanto, una unión firme del ionóforo con selectividad iónica con el capilar de vidrio. Este ionóforo usado es selectivo para iones H⁺, lo que significa que se pueden transportar exclusivamente estos iones a través del ionóforo hasta la "back-fill-solution" y conducen a un cambio de potencial que es proporcional a la concentración existente de H⁺. Este potencial medido se tiene que corregir con el valor de potencial de membrana apical, lo que se posibilita por la medición mediante el electrodo de referencia. Los dos capilares se unen a través de hilos de plata recién clorados con un amplificador de microelectrodos de alto ohmiaje (F-223 A Dual Elektrometer, WPI). El mismo mide en cada caso el potencial existente a través de los dos capilares. Mediante la formación de la diferencia de tensión se genera una función lineal del pH_i (valor intracelular de pH).

- 50 Mediante el empleo de una combinación de microelectrodos de doble cañón y una cámara de Ussing se registran en caso necesario adicionalmente a los datos de medición de cámara de Ussing transepiteliales tales como (PD_t , I_{sc} , conductividad transepitelial) también datos de medición intraepiteliales tales como PD_a y pH_i (Strecker 2011).

Soluciones de ensayo

- 55 Las soluciones de ensayo usadas se pueden obtener con detalle de las tablas en el anexo.

- Se disolvió mentol (Sigma-Aldrich) en una concentración de un 1 mol·l⁻¹ en etanol y se pipeteó a la solución de ensayo que contenía amonio usada. Para una concentración final de 1 mol·l⁻¹ se realizó una adición de 20 μl de esta solución madre a 20 ml de solución de ensayo; para 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ correspondientemente menos. En experimentos de control se añadieron a la solución de ensayo cantidades correspondientes de etanol puro. Se disolvió verapamilo en
- 60 DMSO; la retirada de calcio y magnesio se realizó mediante administración de EDTA.

Ensayos en células aisladas mediante la técnica de pinzamiento zonal (patch-clamp)

- 65 Para los ensayos en el epitelio intacto se tiene que obtener diariamente nuevo epitelio con gasto de tiempo y costes. Por tanto, se pretende realizar mediante ensayos en cultivos celulares una identificación sistemática más rápida y

más eficaz para identificar las sustancias en las que resulte rentable un empleo en el epitelio intacto y finalmente en el animal *in vivo*. La técnica de pinzamiento zonal permite deducciones más detalladas acerca de los mecanismos de acción de las sustancias de ensayo y una comprobación más rigurosa de qué especies iónicas se transportan es posible.

Todos los experimentos de pinzamiento zonal se llevan a cabo con el procedimiento convencional que se ha descrito con detalle en varias publicaciones (Stumpff, Strauss *et al.* 1997; Stumpff, Que *et al.* 1999; Stumpff, Boxberger *et al.* 2005; Stumpff, Bondzio *et al.* 2007; Stumpff, Martens *et al.* 2009; Stumpff, Georgi *et al.* 2011), cuyo contenido de divulgación queda incorporado por referencia en la presente solicitud.

Para esto se estiran capilares de vidrio de borosilicato (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.) con un elemento de tracción universal DMZ (Zeitz-Instruments, Múnich, Alemania) hasta una punta fina que después del llenado con la solución de pipeta (Tabla 6) se pone, con ayuda de un micromanipulador, con control microscópico sobre las células que crecen sobre un cubreobjetos. Las células se lavan en primer lugar con una solución salina fisiológica (solución de NaCl, Tabla 7).

Aplicando una presión negativa se consigue inducir una fusión de la membrana lipídica de la célula con la pared de vidrio de los capilares ("sea"). Con otro impulso de presión brusco se consigue, en una parte de las células, romper la membrana celular que se encuentra entre el capilar de vidrio y el citosol, de tal manera que se establece una unión entre la pipeta y el citosol. A este respecto, la membrana celular debe seguir cerrada con el borde de la pipeta. La solución de pipeta puede fluir ahora en la célula.

Con ayuda del amplificador de pinzamiento zonal (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) ahora se consigue aplicar entre un hilo de plata clorado situado en la pipeta y una conexión a tierra que se encuentra en el baño fuera de la célula impulsos de tensión y medir las corrientes inducidas a través de la membrana celular. A este respecto, la creación de impulso, registro de datos, compensación de capacitancia, filtración de datos y análisis de datos se realizan automáticamente mediante TIDA for Windows (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). En particular, así se consigue crear para cada momento de la medición una curva de corriente-tensión para la célula examinada, a partir de la cual se puede establecer qué iones se dejan pasar a través de la membrana celular y en qué alcance.

El suministro de solución a la cámara de perfusión con las células se realiza mediante dos bombas idénticas (MS/CA4/840, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Suiza), que se equiparon con tubos flexibles de precisión (Tygon, Ismatec) para garantizar caudales idénticos ($4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Los 8 tubos flexibles se introducen mediante un mili-colector (ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, EE.UU.) en una cánula de calentamiento con la que se posibilita el atemperado de las soluciones mediante un controlador a temperatura (PH01, multichannel systems, Reutlingen, Alemania) a valores discretos (por lo general $37 \text{ }^\circ\text{C}$). La estructura posibilita cambios de solución rápidos y sin alteraciones gracias a válvulas de tres vías intercaladas.

Ejemplo 1: los moduladores de TRP influyen en la conductividad de epitelio del rumen intacto para cationes

Después de fijar el epitelio, el mismo se lava en primer lugar por ambos lados con el tampón sin amonio de pH 7,4 (Tabla 2). Normalmente se observa ahora ya una corriente transepitelial discreta correspondiente a la actividad basal de la bomba de sodio epitelial (Na^+/K^+ -ATPasa). Dado el caso, ahora el microelectrodo se introduce en el epitelio cuando se requiere o se desea el registro simultáneo de parámetros intracelulares. Con una punción exitosa debería ajustarse un potencial claramente negativo (-20 mV a -40 mV).

En el lado apical se aplica ahora tampón que contiene amonio (10 mM o 40 mM) pH 6,4 (Tablas 4 y 5); el tampón del lado basolateral ("sangre") permanece sin cambios. El gradiente de pH que se ajusta se corresponde aproximadamente con las condiciones fisiológicas en el rumen. Se observa un aumento de la corriente transepitelial o de la tensión transepitelial correspondiente a un transporte del ion cargado (véase las Figuras 1 y 2).

Al tampón apical se puede añadir a continuación la sustancia de ensayo en la cantidad deseada. Con adición del agonista de canal de TRP mentol ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a la solución que contiene amonio se observa un aumento claro adicional de la corriente transepitelial o de la tensión transepitelial, correspondiente con un mayor transporte del ion amonio (NH_4^+) a través del epitelio. Con adición de verapamilo ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) se produce una caída de corriente. La extracción de calcio conduce asimismo a un aumento de corriente. En total, estas observaciones hablan en favor de una vía de captación común para amonio y calcio por canales catiónicos no selectivos, cuya permeabilidad se puede modular mediante distintas sustancias (por ejemplo mentol) (Vriens, Nilius *et al.* 2008; Nilius y Owsianik 2011).

Los ensayos que se han expuesto anteriormente en la cámara de Ussing se continuaron y se llevaron a cabo asimismo con otros agonistas y/o antagonistas de TRP ilustrativos.

Efecto de amonio sobre la corriente de cortocircuito

En la Fig. 7A y la siguiente Tabla 14 se reconoce una corriente inducida por la adición de amonio que a continuación se modula mediante agonistas correspondientes.

5 **Tabla 14:** Valoración estadística de ensayos tal como en la Fig. 7A; abreviaturas aquí y en las siguientes tablas: n.s. – no significativo; VM – valor medio, ETM – error típico del valor medio (*standard error of the mean*).

N.º	Solución	$\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$						Distribuido de forma normal	p vs 1	p vs 2
		n	VM	ETM	Mediana	25 %	75 %			
1	NaCl	37	-2,43	2,28	-3,60	-11,48	2,40	no		n.s.
2	NH ₄ ⁺ 40 mM	37	-25,73	2,14	-22,32	-34,23	-16,76		<0,05	<0,05
3	NaCl(p)	35	-2,68	1,95	-5,19	-9,03	2,27		n.s.	

10 Dependencia de la dosis del efecto de mentol

El efecto de mentol sobre la corriente de cortocircuito a través del epitelio del rumen, correspondiente a un mayor transporte de cationes, ya se ha expuesto anteriormente. A continuación se examinan los resultados en relación con la dependencia de la respuesta de corriente de la dosis de sustancia (véase la Fig. 7B y la Tabla 15)

15 **Tabla 15:** Dependencia de la dosis del efecto de mentol

N.º	Solución	$\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$						Distribuido de forma normal	p vs 1	p vs 2
		n	VM	ETM	Mediana	25 %	75 %			
1	NH ₄ ⁺ 40 mM	11	-30,99	3,70	-30,65	-39,00	-22,40	sí		0,02
2	Mentol 200 μM	11	-36,34	3,66	-34,21	-46,11	-25,74		0,01	<0,001
3	NH/ 40 mM (p)	11	-26,42	2,71	-25,70	-35,09	-19,19		n.s.	
1	NH ₄ ⁺ 40 mM	12	-24,20	4,51	-22,76	-26,99	-14,71	sí		0,09
2	Mentol 1 mM	12	-28,73	4,83	-26,90	-34,76	-18,14		0,02	0,00
3	NH ₄ ⁺ 40 mM (p)	12	-20,88	3,68	-19,61	-27,00	-16,99		0,09	

Efecto de cinamaldehído

20 Con aldehído cinámico (cinamaldehído) está presente otro principio activo que influye en el transporte a través del epitelio del rumen, esta vez con perfil inhibitor (véase la Fig. 8A y la Tabla 16 abajo). La inhibición del flujo de salida de amonio del rumen podría conducir a una mayor incorporación de nitrógeno en la proteína microbiana y reducir por ello la emisión de nitrógeno al medio ambiente. No se puede descartar una inhibición simultánea de calcio y reabsorción de protones. Aquí son necesarios otros ensayos *in vitro*. Una condición para el empleo podría ser un abastecimiento suficiente con calcio y una administración ahorrativa de concentrado.

25 **Tabla 16:** Resumen de las mediciones con aldehído cinámico

N.º	Solución	$\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$						Distribuido de forma normal	p vs 1	p vs 3
		n	VM	ETM	Mediana	25 %	75 %			
1	NH ₄ ⁺ 40 mM	7	-31,53	3,15	-26,52	-39,66	-23,29	sí	(p = 0,313)	
2	aldehído cinámico	7	-28,39	3,26	-24,03	-33,10	-21,07			
3	NH ₄ ⁺ 40 mM (p)	7	-28,30	4,81	-27,36	-35,79	-23,22			

Efecto de salicilato de metilo

30 El salicilato de metilo tiene un perfil asimismo inhibitor con efecto inhibitor sobre la reabsorción de nitrógeno del rumen. También en este caso en la indicación debería encontrarse en primer plano una mejora del aprovechamiento de la proteína con reducción de la emisión de nitrógeno. Por la adición se produjo como media una disminución máxima de la corriente transepitelial de $-25,44 \pm 1,8 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ a $-21,06 \pm 2,97 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$. Con n = 4 esta disminución (todavía) no era significativa, pero la tendencia es clara.

35 **Efecto de timol**

40 En el caso de timol llama la atención la duración de la inhibición obtenida que se puede comprobar todavía después del lavado (véase la Fig. 9 y la Tabla 17 abajo). Esta sustancia se podría emplear por tanto en un grado particular para inhibir la reabsorción de amonio.

Tabla 17: El timol condujo a una inhibición a largo plazo de la reabsorción de amonio

N.º	Solución	$\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$						Distribuido de forma normal	p vs 1	p vs 3
		n	VM	ETM	Mediana	25 %	75 %			
1	NH_4^+ 40 mM	4	-22,47	3,87	-19,30	-26,70	-18,23	sí	(p = 0,498)	
2	timol 100 μM	4	-22,19	4,00	-19,35	-27,37	-17,01			
3	NH_4^+ 40 mM (p)	4	-15,82	9,60	-20,91	-29,01	-2,63			

Ejemplo 2: Los moduladores de TRP influyen en la conductividad para cationes de células aisladas del rumen

5 Al comienzo del ensayo, las células llenas de la solución de pipeta que contiene gluconato sódico (Tabla 6) se encuentran en una solución de baño que contiene NaCl (Tabla 7). La curva de corriente-tensión muestra un perfil de rectificación ascendente con potencial de inversión negativo correspondiente a una alta conductividad de la célula para cloruro (= canal aniónico (Stumpff, Martens *et al.* 2009)) con baja conductividad de base para sodio (Leonhard-Marek, Stumpff *et al.* 2005). Si se cambia ahora a la perfusión de baño a una solución que contiene como catión sobre todo amonio (Tabla 8), se observa un aumento de la corriente con un potencial de pipeta negativo correspondiente a un flujo de entrada del ion amonio (NH_4^+).

10 En este contexto se señala de nuevo que las mediciones con la técnica de pinzamiento zonal deben posibilitar una "identificación selectiva" más rápida de candidatos para los ensayos en el epitelio intacto, por tanto, se pueden llevar a cabo adicionalmente como pre-identificación selectiva, pero no son esenciales para el procedimiento de identificación selectiva de acuerdo con la invención (véase también la sección "ensayos en células aisladas mediante la técnica de pinzamiento zonal" arriba).

Ejemplo 3: Suministro a vacas de alimentos para animales que contienen moduladores de TRP

20 Las sustancias candidato que se identificaron en los ensayos *in vitro* como los más prometedores se administran después de una distribución aleatorizada a vacas Holstein, preferentemente vacas Holstein-Friesian con alimentación convencional. El grupo de control de vacas obtiene solo la alimentación convencional. La obtención de datos se realiza basándose en la evaluación de parámetros de potencia y salud de los animales y datos del bolo smaXtec (smaXtec animal care sales GmbH; Graz, AUSTRIA)).

25 Como datos de rendimiento se registraron rutinariamente por ejemplo la producción de leche diaria/semanal/mensual o anual (305 días) por animal (en kilogramos o litros) y la composición de la leche por ejemplo en relación con grasa y contenido de proteína y se compararon entre los animales de los dos grupos. Como alternativa o adicionalmente se compararon también las características funcionales convencionales tales como exterior, fertilidad, comportamiento de parto, mortinatos.

30 Como parámetros de salud se registraron por ejemplo hallazgos (por ejemplo tipo de patógeno), localización de la afección (por ejemplo, cuarterones, pezuñas, etc.) y los tratamientos y se compararon entre los dos grupos. En particular, a este respecto se observan enfermedades, se comparan su aparición y su evolución, que se deben potencialmente a una acidosis ruminal, tales como por ejemplo mastitis, endometritis y enfermedades infecciosas de las pezuñas.

35 El registro de los parámetros sanitarios puede tener lugar mediante métodos reconocidos en medicina veterinaria, tal como se conoce en la materia y se describe por ejemplo en "Modern techniques for monitoring high producing dairy cows", Cook *et al.*, In practice 28(2006); 598-603.

40 Mediante el empleo del bolo ruminal especial que se ha mencionado anteriormente existe la posibilidad de registrar automáticamente datos del rumen en el intervalo de 10 minutos. Adicionalmente se toman y examinan muestras de sangre, orina y heces (entre otras cosas para evaluar la concentración de calcio y el estado ácido-base) de los animales.

Ejemplo 4: Los moduladores de TRP influyen en el flujo de calcio a través del epitelio del rumen

45 Para la comprobación directa de una modulación del transporte de calcio a través del epitelio del rumen, en otros ensayos se empleó un isótopo de calcio radiactivo (Ca^{45}). Las mediciones se llevaron a cabo en cámaras de Ussing convencionales sin perfusión continua. En este sentido se tomó tejido de N = 4 (vacas) y se usaron a este respecto n = 85 epitelios.

50 El isótopo se empleó en el lado de la mucosa (correspondiente al lado en el que se encuentra el alimento) y se midió la aparición en el lado de la sangre.

Efecto dependiente de la dosis de mentol sobre el flujo de calcio a través del epitelio del rumen

Preparación de ensayo: se formaron tres grupos. Un grupo permaneció sin tratar como control. Los otros dos grupos se trataron en cada caso con mentol en una dosis de 200 μ M o 1 mM y se compararon con el control (100 %). En este sentido se midió el aumento dependiente de la concentración del transporte de calcio a través del tejido ruminal después de la administración de mentol en dos concentraciones distintas en comparación con el grupo de control.

Efecto de timol sobre el flujo de calcio a través del epitelio del rumen

Preparación de ensayo: en primer lugar se estableció un valor basal del flujo de Ca a través del epitelio del rumen. Después se añadió una sustancia. El flujo de Ca medido a continuación se midió y se comparó con el valor de partida (100 %). Considerando el efecto inhibitor de timol sobre la reabsorción de amonio del rumen con una posible mejora del aprovechamiento de nitrógeno era interesante conocer cómo este principio activo influye en la reabsorción de calcio (véase la Fig. 10B para los resultados de las mediciones). Los resultados anteriores señalan no obstante que a largo plazo no se produce una reducción significativa del transporte del calcio, sino que se hace visible una tendencia al aumento de la reabsorción de calcio.

Por tanto, los anteriores resultados muestran que mediante el empleo de moduladores de TRP específicos (tales como por ejemplo mentol) se puede inducir un aumento del transporte de calcio a través del epitelio del rumen.

Anexo: Composición de las soluciones de ensayo empleadas**- Ensayos en el epitelio intacto -**

Tabla 1: tampón de transporte

Sustancia	mol/l	g/l
NaCl	115,00	6,72
NaHCO ₃	25,00	2,100
NaH ₂ PO ₄	0,40	0,06
Na ₂ HPO ₄	2,40	0,43
KCl	5,00	0,37
HEPES	10,00	2,38
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	5,00	0,99
MgCl ₂ (1 mol/l)	1,20	0,24
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,20	0,18
Gasificación: 95 % CO ₂ /5 % O ₂ , hasta 300 mOsmol/l (manitol); pH 7,4 (base Trizma)		

Tabla 2: Tampón sin amonio pH 7,4

Sustancia	mol/l	g/l
NaCl	70,00	4,09
NaH ₂ PO ₄	0,40	0,06
Na ₂ HPO ₄	2,40	0,43
KCl	5,00	0,37
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	5,00	0,99
MOPS	8,00	1,67
glutamina	2,50	0,37
gluconato de Na	30,00	6,544
MgCl ₂ (1 mol/l)	1,20	0,24
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,20	0,18
NMDGCl	40,00	7,809
Gasificación: 100 % O ₂ , hasta 300 mOsmol/l (manitol); pH 7,4 (base Trizma)		

Tabla 3: Tampón sin amonio pH 6,4

Sustancia	mol/l	g/l
NaCl	70,00	4,09
NaH ₂ PO ₄	0,40	0,06

Na ₂ HPO ₄	2,40	0,43
KCl	5,00	0,37
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	5,00	0,99
MOPS	8,00	1,67
glutamina	2,50	0,37
gluconato de Na	30,00	6,544
MgCl ₂ (1 mol/l)	1,20	0,24
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,20	0,18
NMDGCl	40,00	7,809
Gasificación: 100 % O ₂ , hasta 300 mOsmol/l (manitol); pH 6,4 (base Trizma)		

Tabla 4: Tampón que contiene amonio pH 6,4 (10 mM)

NaCl	70,00	4,09
NaH ₂ PO ₄	0,40	0,06
Na ₂ HPO ₄	2,40	0,43
KCl	5,00	0,37
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	5,00	0,99
MOPS	8,00	1,67
glutamina	2,50	0,37
gluconato de Na	30,00	6,544
MgCl ₂ (1 mol/l)	1,20	0,24
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,20	0,18
NH ₄ Cl	10,00	0,534
NMDGCl	30,00	5,857
Gasificación: 100 % O ₂ , hasta 300 mOsmol/l (manitol); pH 6,4 (base Trizma)		

Tabla 5: Tampón que contiene amonio pH 6,4 (40 mM)

Sustancia	mol/l	g/l
NaCl	70,00	4,09
NaH ₂ PO ₄	0,40	0,06
Na ₂ HPO ₄	2,40	0,43
KCl	5,00	0,37
C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	5,00	0,99
MOPS	8,00	1,67
glutamina	2,50	0,37
gluconato de Na	30,00	6,544
MgCl ₂	1,20	0,24
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,20	0,18
NH ₄ Cl	40,00	2,138
Gasificación: 100 % O ₂ , hasta 300 mOsmol/l (manitol); pH 6,4 (base Trizma)		

5

- Ensayos en células aisladas -**Tabla 6: Solución de pipeta**

Sustancia	mol/l	g/l
KCl	5,00	0,37
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,00	0,14
gluconato de Na	128,20	27,966
Hepes	10,00	2,38
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,00	0,29
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,10	0,22

EGTA	5,00	1,90
NaCl	8,80	0,514
Sin gasificación, hasta 290 mosmol/l (manitol); pH 7,2 (base Trizma)		

Esta solución se modifica dado el caso cuando esto fuese necesario para la transducción de señal (por ejemplo adición de MgATP, reducción de EGTA, etc).

5

Tabla 7: Solución de NaCl

Sustancia	mol/l	g/l
KCl	5,00	0,37
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,00	0,14
NaCl	137,00	8,006
Hepes	10,00	2,38
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,70	0,25
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,90	0,18
Sin gasificación, hasta 290 mosmol/l (manitol); pH 7,4 (base Trizma)		

Tabla 8: Solución de NH₄Cl

Sustancia	mol/l	g/l
NH ₄ Cl	130,00	6,95
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,00	0,14
NaCl	5,00	0,292
HEPES	10,00	2,38
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,70	0,25
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,90	0,18
Sin gasificación, hasta 290 mosmol/l (manitol); pH 7,5 (base Trizma)		

- Composición de alimento-

10

Tabla 9: Composición ilustrativa de un alimento (concentrado de vaca) disponible en el mercado

Componente de alimento [g/kg de materia seca]	
ceniza bruta	70
proteína bruta	200
fibra bruta	100
calcio	9
fosfato	7
magnesio	4
potasio	12
sodio	3,5
cloro	5,5
azufre	1,5

- Sustancias que modulan los canales de TRP -

15

Tabla 10: Moduladores de TRPV

TRPV1		
Sustancia	Acción	
capsaicina	agonista	
piperina	agonista	
eugenol	agonista	
resiniferatoxina	agonista	
gingerol	agonista	
vainillilacetona	agonista	

evadamina	agonista	
cannabidiol	agonista	
poligodial	agonista	
isoveleral	agonista	
canfor	agonista	
vainillotoxina 1, 2 y 3	agonista	
tapsigargina	antagonista	
olvanilo	agonista	
capsazepina	antagonista	
canabidiol	agonista	
TRPV2		
Sustancia	Acción	
tetrahidrocanabinol	agonista	
TRPV3		
Sustancia	Acción	
carvacrol	agonista	
eugenol		no específico
timol		no específico
alcanfor		no específico
vainillina		
mentol		no específico
TRPV4		
Sustancia	Acción	
bisandrografolida A	Agonista	

Tabla 11: Moduladores de TRPM

TRPM8		
Sustancia	Acción	
mentol	agonista	
eucaliptol	agonista	
mentona	agonista	
geraniol	agonista	
linalool	agonista	
lactato de mentilo	agonista	
cis- y trans-p-mentan-3,8-diol	agonista	
L-carvona	agonista	
isopulegol	agonista	
hidroxil-citronelal	agonista	
eugenol	agonista	pero también TRPA1 y TRPV1
aldehido cinámico	antagonista	antagonista
etanol	antagonista	inhibido por modulación de la interacción PiP2
icilina	agonista	
mentona	agonista	

Tabla 12: Moduladores de TRPA

TRPA1		
Sustancia	Acción	
isotiocianato de alilo	agonista	
isotiocianato de bencilo	agonista	
isotiocianato de feniletilo	agonista	
isotiocianato de isopropilo	agonista	
isotiocianato de metilo	agonista	
aldehído cinámico	agonista	
eugenol	agonista	pero también TRPM8 y TRPV1
gingerol	agonista	
salicilato de metilo	agonista	
alicina	agonista	pero también TRPV1
carvacrol	agonista	
alcanfor	antagonista	
mentol	antagonista	pero activa TRPM8
tetrahidrocannabinol	agonista	
wasabi, aceite de mostaza	agonista	
mostaza amarilla	agonista	

Tabla 13: Moduladores inespecíficos

Con acción inespecífica
(activan una serie de canales de TRP, entre ellos también el TRPV3)
piperadina
bisandrografolida
icilina
verapamilo
quinidina
GsMTx4
<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)
hiperforina
capsiato
vainillilacetona (zingerona)
evodiamina
salicilato de mentilo
aceite de mostaza
ginsenósido
carveol
paradol
resiniferanoide
capsiato
otros capsaicinoides
<i>Zingiber officinale</i>
vainillilacetona (zingerona)
evodiamina
[6,8,10]Shogaol
otros shogaoles
cannabis
tetrahidrocannabinol
cannabidiol

Con acción inespecífica
otros cannabinoides
drimanial
cinamodial
cinamosmolida
cinamolida
afromodial
ancistrodial
merulidial
drimenol
grifolina
neogrifolina
albaconol
prenilfenoles
BCTC (N(4-butilfenilo terciario)4(3colorpiridin2il)tetrahidropirazin 1 (2H)carboxamida
isoveleral
vainillotoxina 1, 2 y 3
arvanilo
<i>Cnidarian envenomations</i>
tapsigargina
yohimbina
toxina AG489
toxina AG505
paradol
isotiocianato de alilo
geraniol
linalool
lactato de mentilo
cis y trans p mentan3,8 diol
L-carvona
isopulegol
hidroxilcitronelal
borneol
prostaglandina
inhibidores de la síntesis de prostaglandina
ácido acetilsalicílico
paracetamol
ibuprofeno

Bibliografía

5 [1] De Campeneere S, De Boever JL, Vanacker JM, Messens W, De Brabander DL: Feeding measures to reduce nitrogen excretion in dairy cattle. Arch Anim Nutr 2009, 63(2): 87-103.

[2] Vanhatalo A, Kuoppala K, Ahvenjarvi S, Rinne M: Effects of feeding grass or red clever silage cut at two maturity stages in dairy cows. 1. Nitrogen metabolism and supply of amino acids. J Dairy Sci 2009, 92(11): 5620-5633.

10 [3] Remond D, Bernard L, Savary-Auzeloux I, Noziere P: Partitioning of nutrient net fluxes across the portal-drained viscera in sheep fed twice daily: effect of dietary protein degradability. Br J Nutr 2009: 1-12.

[4] Abdoun K, Stumpff F, Martens H: Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. Anim Health Res Rev 2006, 7(1-2): 43-59.

[5] Harmeyer J, Martens H: Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat. J Dairy Sci 1980, 63(10): 1707-1728.

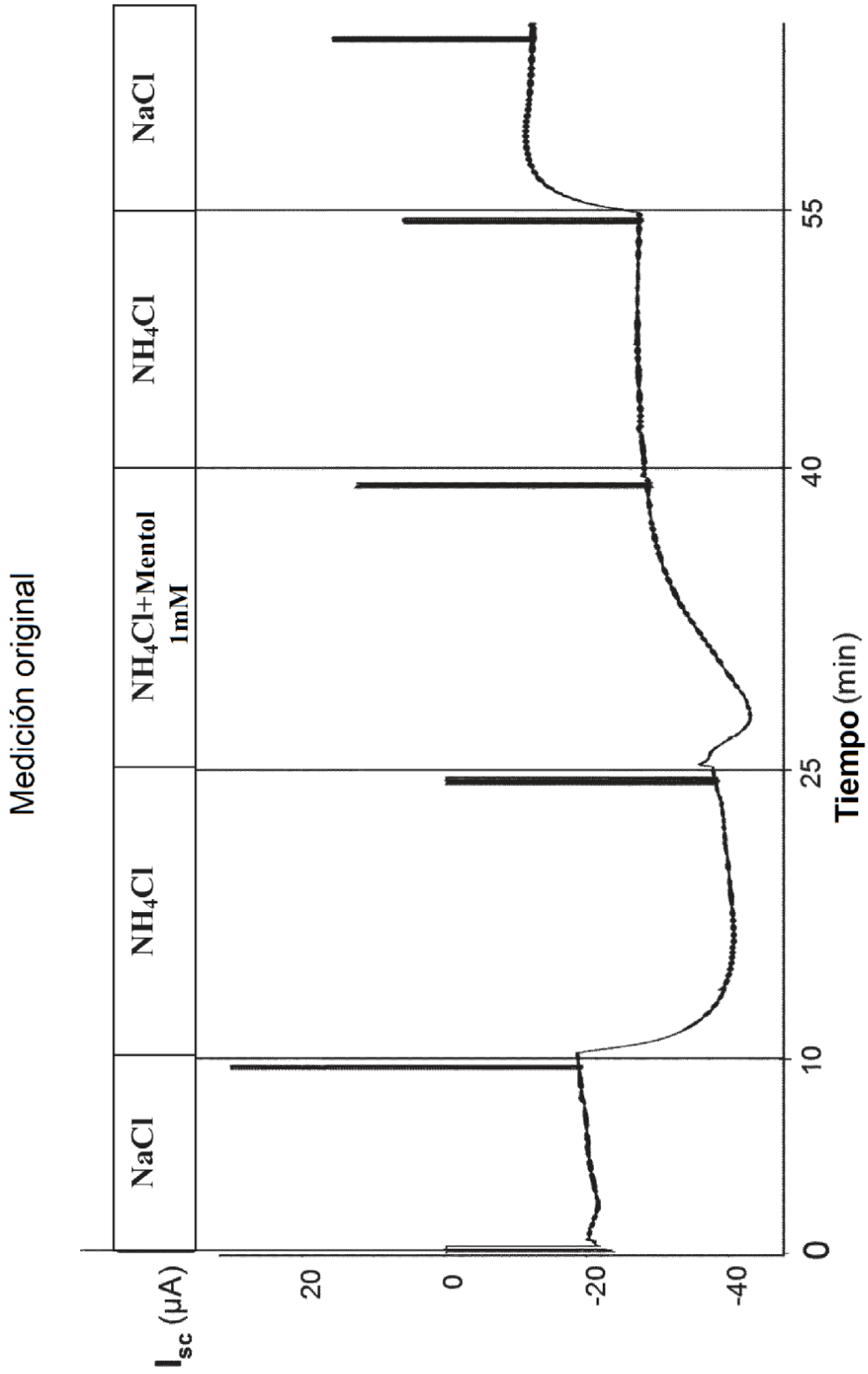
15 [6] McDonald IW: The absorption of ammonia from the rumen of the sheep. Biochem J 1948, 42(4): 584-587.

- [7] <http://www.bpb.de/gesellschaft/umwelt/dossier-umwelt/61246/luftverschmutzung>
- [8] Gärtner K, Decker P, Hili H: Untersuchungen über die Passage von Harnstoff und Ammoniak durch die Pansenwand von Ziegen. *Pflugers Arch* 1961, 274: 281-288.
- [9] Abdoun K, Stumpff F, Wolf K, Martens H: Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia. *Am J Physiol* 2005, 289(3): G508-520.
- [10] Stumpff F: Ionic Conductances of the Ruminal Epithelium. Freie Universität Berlin, Habil., Institut für Veterinär-Physiologie; 2010.
- Galfi, P., S. Neogrady, *et al.* (1981). "Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa." *Vet Res Commun* 4(4): 295-300.
- Stumpff, F., O. Strauss, *et al.* (1997). "Characterization of maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(9): 1883-1892.
- Schweigel, M., I. Lang, *et al.* (1999). "Mg(2+) transport in sheep rumen epithelium: evidence for an electrodiffusive uptake mechanism." *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): G976-982.
- Stumpff, F., Y. Que, *et al.* (1999). "Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(7): 1404-1417.
- Abdoun, K., F. Stumpff, *et al.* (2005). "Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia." *Am J Physiol* 289(3): G508-520.
- Leonhard-Marek, S., F. Stumpff, *et al.* (2005). "Basolateral Mg²⁺/Na⁺ exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg²⁺." *Am J Physiol* 288(4): G630-645.
- Stumpff, F., M. Boxberger, *et al.* (2005). "Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork." *Exp Eye Res* 80(5): 697-708.
- Stumpff, F. y H. Martens (2006). A role for magnesium in the regulation of ruminal sodium transport. Focus on signal transduction research. G. McAlpine. New York, New Nova Science Publishers, Inc. (ISBN 13 978-1-60021-376-2): 37-66.
- Stumpff, F., A. Bondzio, *et al.* (2007). "Effects of the Bacillus thuringiensis toxin CryIAb on membrane currents of isolated cells of the ruminal epithelium." *J Membr Biol* 219(1-3): 37-47.
- Vriens, J., B. Nilius, *et al.* (2008). "Herbal compounds and toxins modulating TRP channels." *Curr Neuropharmacol* 6(1): 79-96.
- Schweigel, M., J. Kuzinski, *et al.* (2009). "Rumen epithelial cells adapt magnesium transport to high and low extracellular magnesium conditions." *Magnes Res* 22(3): 133-150.
- Stumpff, F., H. Martens, *et al.* (2009). "Cultured ruminal epithelial cells express a largeconductance channel permeable to chloride, bicarbonate, and acetate." *Pflugers Arch* 457(5): 1003-1022.
- Abdoun, K., F. Stumpff, *et al.* (2010). "Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO₂." *Am J Physiol* 298(2): G190-202.
- Leonhard-Marek, S., F. Stumpff, *et al.* (2010). "Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from *in vitro* studies." *Animal* 4: 1037-1056.
- Nilius, B. y G. Owsianik (2011). "The transient receptor potential family of ion channels." *Genome Biol* 12(3): 218.
- Strecker, K. (2011). Untersuchungen zur pH-Regulation am Blättermagenepithel des Schafes mit H⁺-sensitiven Mikroelektroden. FB Veterinärmedizin. Berlin, FU Berlin. 178 páginas.
- Stumpff, F., M. I. Georgi, *et al.* (2011). "Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins." *J Exp Biol* 214(Pt 17): 2871-2882.
- Abdoun, K., F. Stumpff, *et al.* (2005). "Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia." *Am J Physiol* 289(3): G508-520.
- Allen WM, Davies DC (1981), "Milk fever, hypomagnesaemia and the "downer cow" syndrome." *Br. Vet. J.* 137, 435-441.
- Blum J W, Fischer JA (1974) "Ätiologie, Pathophysiologie und Prophylaxe der hypocalcämischen Gebärparese des Rindes - eine Übersicht." *Schweiz. Arch. Tierheik.* 116,603-628.
- Ducusin, R. J., Y. Uzuka, E. Satoh, M. Otani, M. Nishimura, S. Tanabe y T. Sarashina. (2003), "Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows." *Res Vet Sci.* 75(1):27-32
- Dirksen, G.; Gründer, H.D.; Stöber, M.; (2002), "Innere Medizin und Chirurgie des Rindes." Parey in Blackwell Verlag GmbH, Berlin-Wien.
- Enemark, J.M.; Jorgensen, R.J.; Kristensen, N.B.; (2004) "An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds." *Vet Res Commun* 28, 687-709.
- Fürll, M., Jäkel, L., Bauerfeld, J., Groppe, B. (1996): "Gebärpareseprophylaxe mit "Anionenrationen". *Prakt. Tierarzt, Coll. Vet.* XXVI, 31-34.
- Garrett, E.F.; Pereira, M.N.; Nordlund, K.V.; Armentano, L.E.; Goodger, W.J.; Oetzel, G.R.; (1999) "Diagnostic Methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows." *J Dairy Sci* 82, 1170-1178
- Gasteiner J, Fallast M, Rosenkranz S, Häusler J, Schneider K, Guggenberger T (2009): "Zum Einsatz einer intraruminalen pH-Datenmesseinheit mit kabelloser Datenübertragung bei Rindern unter verschiedenen Fütterungsbedingungen." *Wien Tierärztl Mschrift; Vet. Med. Austria* 96 (2009), 188 - 194.
- Gelfert CC, Loeffler LM, Frömer S, Engel M, Männer K, Staufenbergel R. (2010) "Comparison of the impact of different anionic salts on the acid-base status and calcium metabolism in non-lactating, non-pregnant dairy cows." *Vet J. Sep;* 185(3): 305-9. Epub 2009 ago 25.

- Goff, J.P., Horst, R.L., (1993), "Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle." *J. Dairy Sci.* 76, 101-108.
- Goff, J.P., Brown, T.R., Stokes, S.R., Brawley, C.L., Valdez, F.R., (2002), "Titration of the proper dose of calcium propionate (NutroCAL) to be included in an oral drench for fresh cows." *J. Dairy Sci.* 85 (Supl. 1), 189
- 5 Goff JP, Ruiz R, Horst RL. (2004) Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. *J Dairy Sci.* May; 87(5): 1245-55.
- Horst, R.L. (1986), "Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow", *Journal of Dairy Science* 69, 604-616
- Horst, R.L., Goff, J.P. y Reinhardt, T.A., (1994), 'Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow', *Journal of Dairy Science* 77, pág. 1936-1951
- 10 Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA, Buxton DR (1997), "Strategies for preventing milk fever in dairy cattle." *J. Dairy Sci.* 80, 1269-1280.
- Houe, H., S. Ostergaard, T. Thilising-Hansen, R. J. Jorgensen, T. Larsen, J. T. Sorensen, J. F. Agger y J. Y. Blom. (2001) "Milk fever and subclinical hypocalcaemia--an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control." *Acta Vet Scand.* 42(1): 1-29
- 15 Joris Vriens, Bernd Nilius y Rudi Vennekens, (2008), "Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels" *Current Neuropharmacology* 6, 79-96 79
- Kimura, K., T. A. Reinhardt y J. P. Goff. (2006) "Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle" *J Dairy Sci.* 89(7): 2588-2595
- 20 Kraft W, Dürr UM (2005) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Lang, I. y H. Martens (1999). "Na transport in sheep rumen is modulated by voltage-dependent cation conductance in apical membrane." *Am J Physiol* 277(3 Pt 1): G609-618.
- Littlelike, E. T., G. W. Engstrom y M. Sachs. (1986), "Methods for sequential sampling and analysis of renal 25-hydroxyvitamin D3 1-, 24, and 23-hydroxylase activities of dairy cows and calves injected with 1 α -hydroxyvitamin D3." *J. Dairy Sci.* 69:990-997.
- 25 Malz, C., Meyer, C. (1992), "Neue Aspekte zur Pathogenese und Therapie der hypocalcämischen Gebärdparese." *Prakt. Tierarzt* 73, 507-515.
- Martens, H. y J. Harmeyer (1978). "Magnesium transport by isolated rumen epithelium of sheep." *Res Vet Sci* 24(2): 161-168.
- 30 Martig J (2002), "Hypokalzämische Gebärdlähmung" In: G. Dirksen; H. D. Gründer y M. Stöber (ed.): "Innere Medizin und Chirurgie des Rindes", 4^a ed. Blackwell Verlag Berlin, Wien, 1245-1254.
- Nordlund KV y Garrett EF: "Rumenocentesis: a technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds." *Bovine Practitioner* 1994, 28, 109-112.
- 35 Nordlund KV, Garrett EF, Oetzel GR: "Herd-based rumenocentesis - a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis." *Compend. contin. Educ. pract. Vet.* 1995, 17, pág. 48-56.
- Oetzel GR (1988), "Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock." *Vet. Clinics of North America: Food Anim. Pract.* 4, 351-364.
- Radostits OM, Gay CG, Blood DC, Hinchcliff KW (2000) Parturient paresis (milk fever).. en: Radostits. O. M., Gay, C. G., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* 9^a Ed. W.B. Saunders, Londres, 1420-1435.
- 40 Ramsey, I. S., M. Delling, *et al.* (2006). "An introduction to TRP channels." *Annual Review of Physiology* 68: 619-647.
- Schweigel, M., I. Lang, *et al.* (1999). "Mg(2+) transport in sheep rumen epithelium: evidence for an electrodiffusive uptake mechanism." *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): G976-982.
- 45 Smith, P. L., K. N. Maloney, *et al.* (2006). "Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels." *Journal of Biological Chemistry* 281(40): 29897-29904.
- Leonhard-Marek, S., F. Stumpff, *et al.* (2005). "Basolateral Mg²⁺/Na⁺ exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg²⁺." *Am J Physiol* 288(4): G630-645.
- 50 Xu, H., M. Delling, *et al.* (2006). "Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels." *Nat Neurosci* 9(5): 628-635.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complemento alimenticio para su uso en el alivio de trastornos del tracto gastrointestinal o de trastornos sistémicos asociados a los mismos mediante modulación de un canal receptor de potencial transitorio (*Transient Receptor Potential*) (TRP) en un animal del suborden de los rumiantes (*Ruminantia*) o de los tilópodos (*Tylopoda*) (rumiantes) que contiene al menos una agonista y/o un antagonista de TRP, quedando comprendido preferentemente un vehículo de alimento para animales compatible.
- 10 2. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** contiene al menos un agonista y/o un antagonista de TRP para influir en la reabsorción de cationes en el rumen.
3. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** los cationes comprenden amonio y/o calcio.
- 15 4. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el agonista de TRP y/o el antagonista de TRP están presentes como principio activo aislado.
- 20 5. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el agonista de TRP y/o el antagonista de TRP se seleccionan del grupo que comprende mentol, mentona, eucaliptol, timol, carvacrol, eugenol, geraniol, salicilato de metilo y aldehído cinámico.
6. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el agonista de TRP y/o el antagonista de TRP comprenden mentol y timol.
- 25 7. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el agonista de TRP y/o el antagonista de TRP se emplea en un intervalo de concentración de 0,01 a 10 g/kg de alimento.
- 30 8. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** el complemento alimenticio contiene al menos dos o más agonistas de TRP y/o antagonistas de TRP.
9. Complemento alimenticio para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** el trastorno del tracto gastrointestinal o el trastorno sistémico asociado comprenden acidosis ruminal y/o paresia puerperal.
- 35 10. Agonista de TRP y/o antagonista de TRP, definidos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como medicamento en el tratamiento de trastornos del tracto gastrointestinal o de trastornos sistémicos asociados a los mismos.



14.3.12RdPa1.adicht

Fig.1

Resumen de los resultados

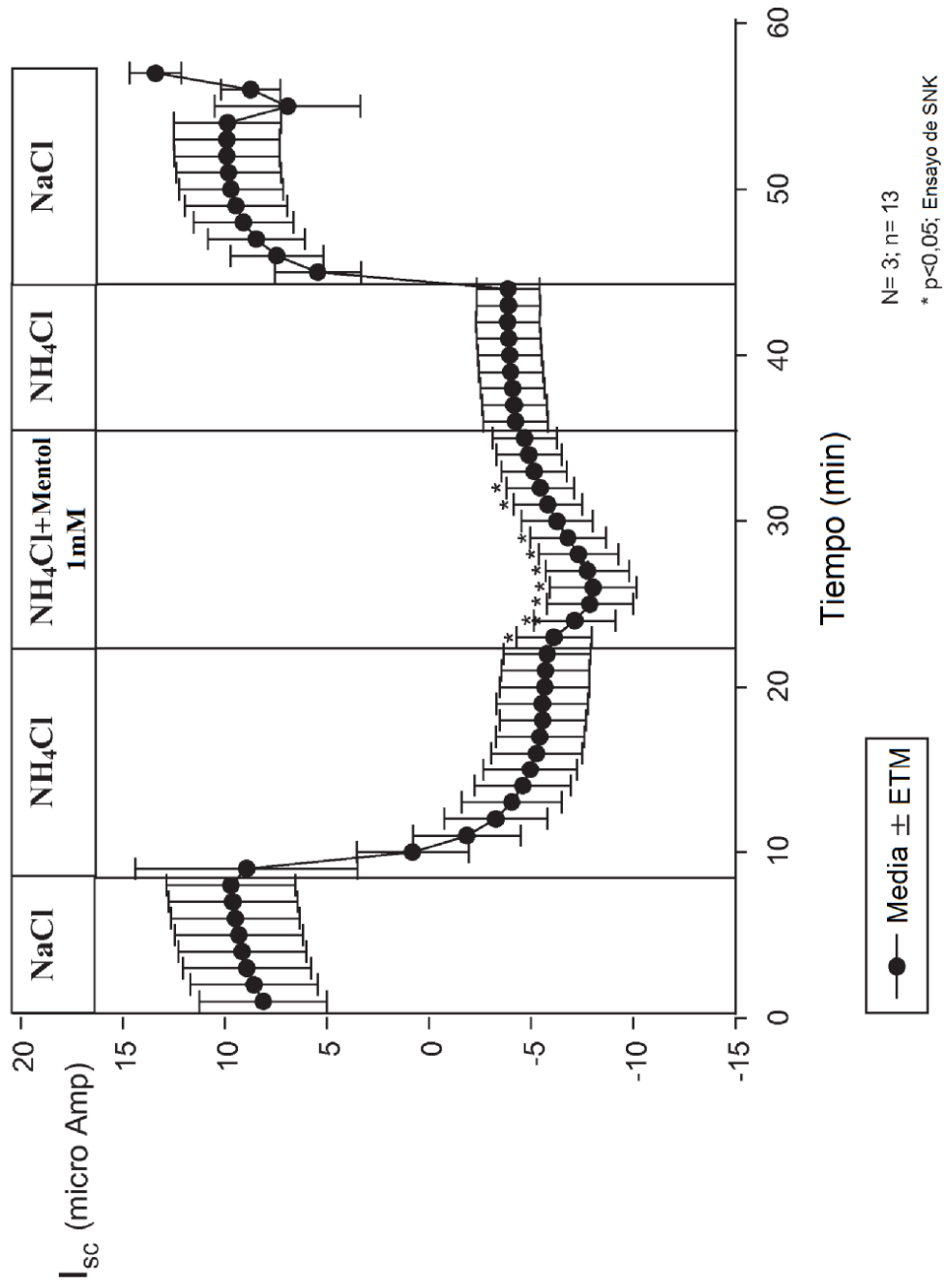


Fig.2

Problemas del rumiante

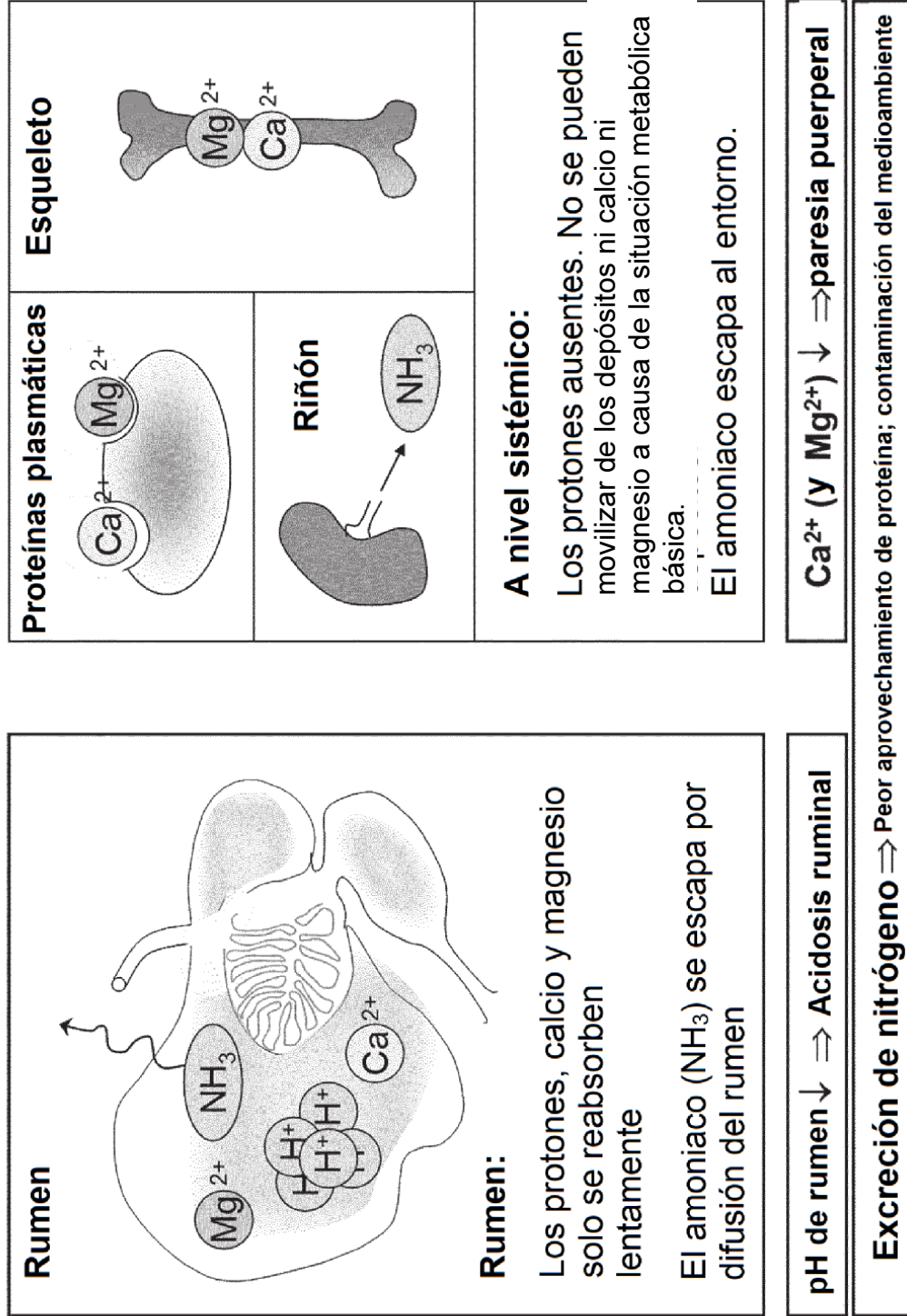


Fig.3

La reabsorción de amoniaco/amonio del rumen

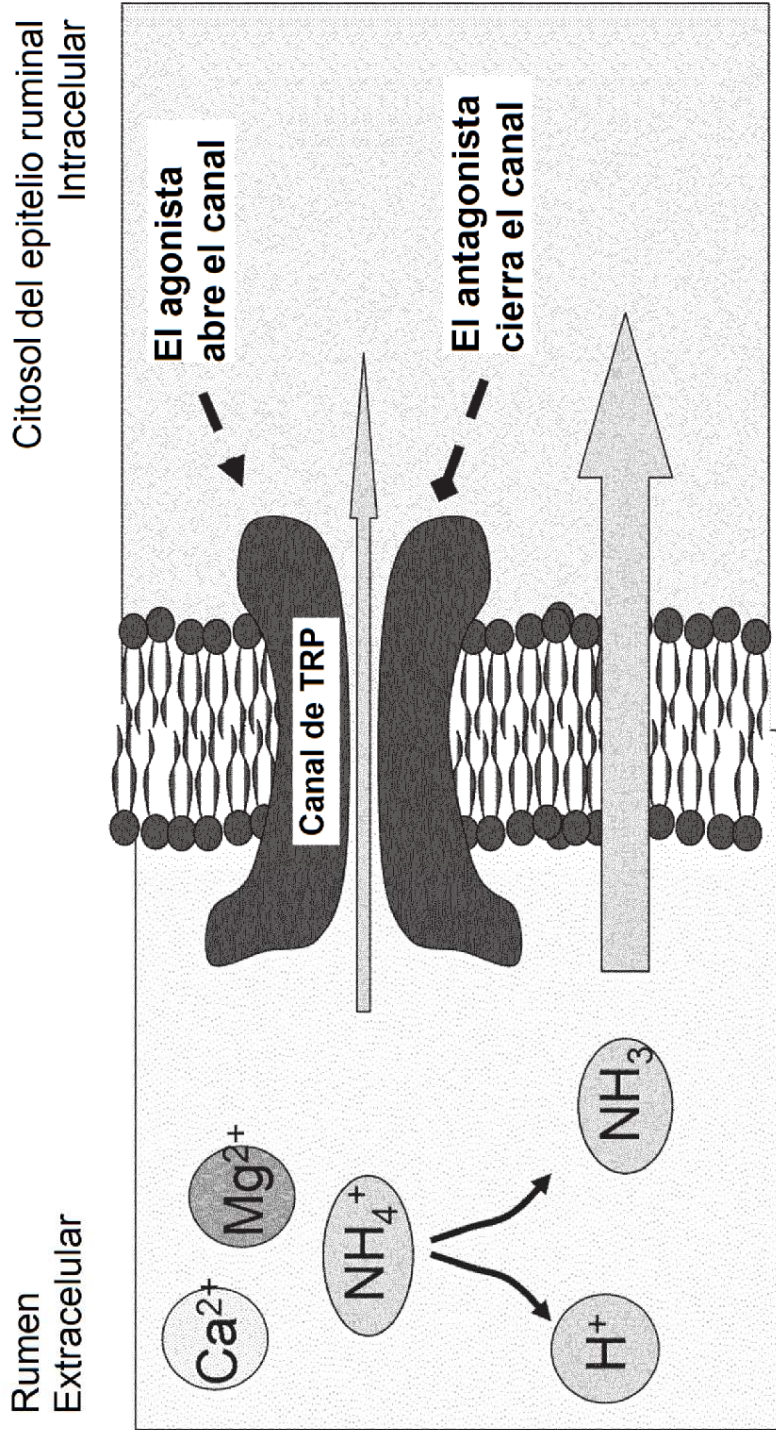


Fig.4

Agonista: Aumento de la conductividad catiónica

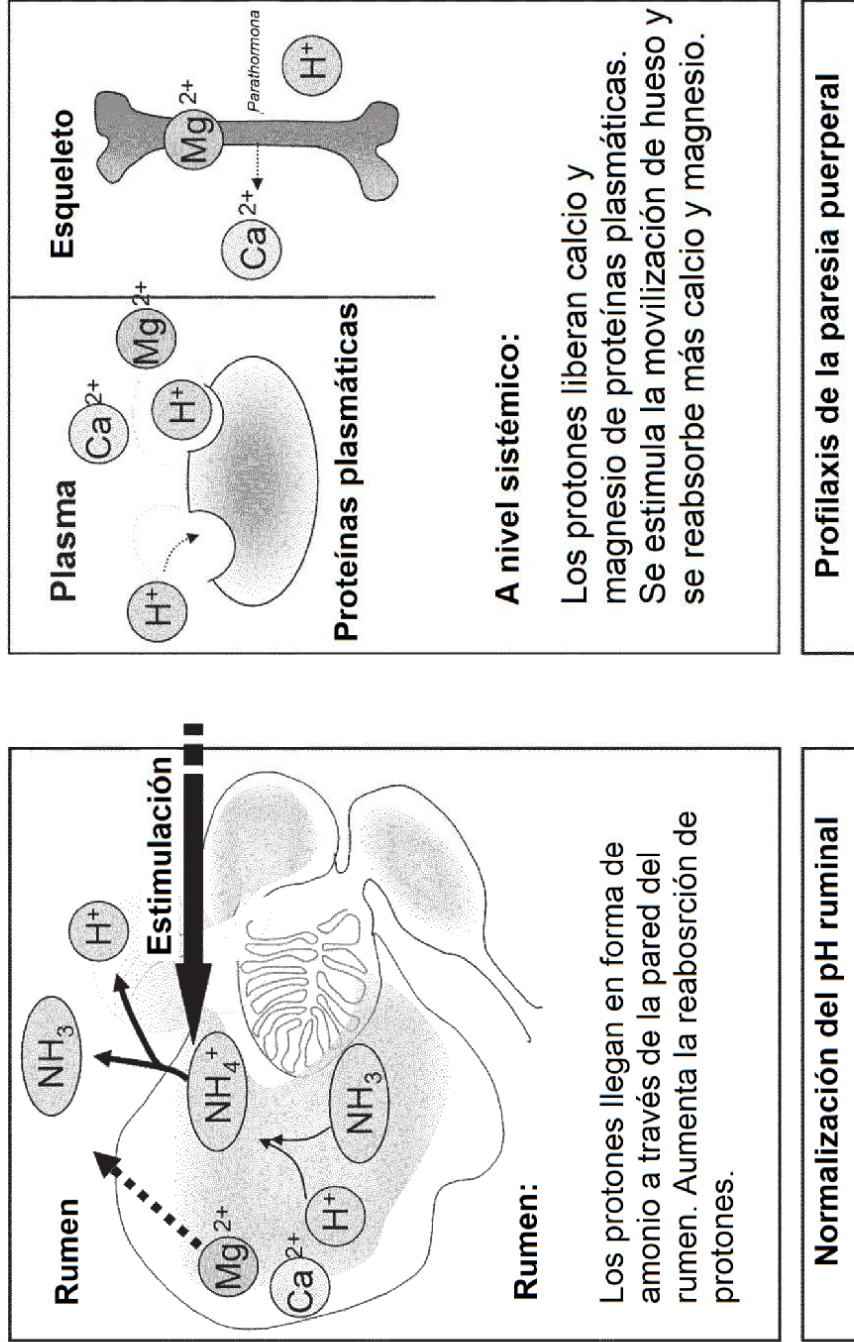


Fig.5

Antagonista: Reducción de la conductividad de amonio

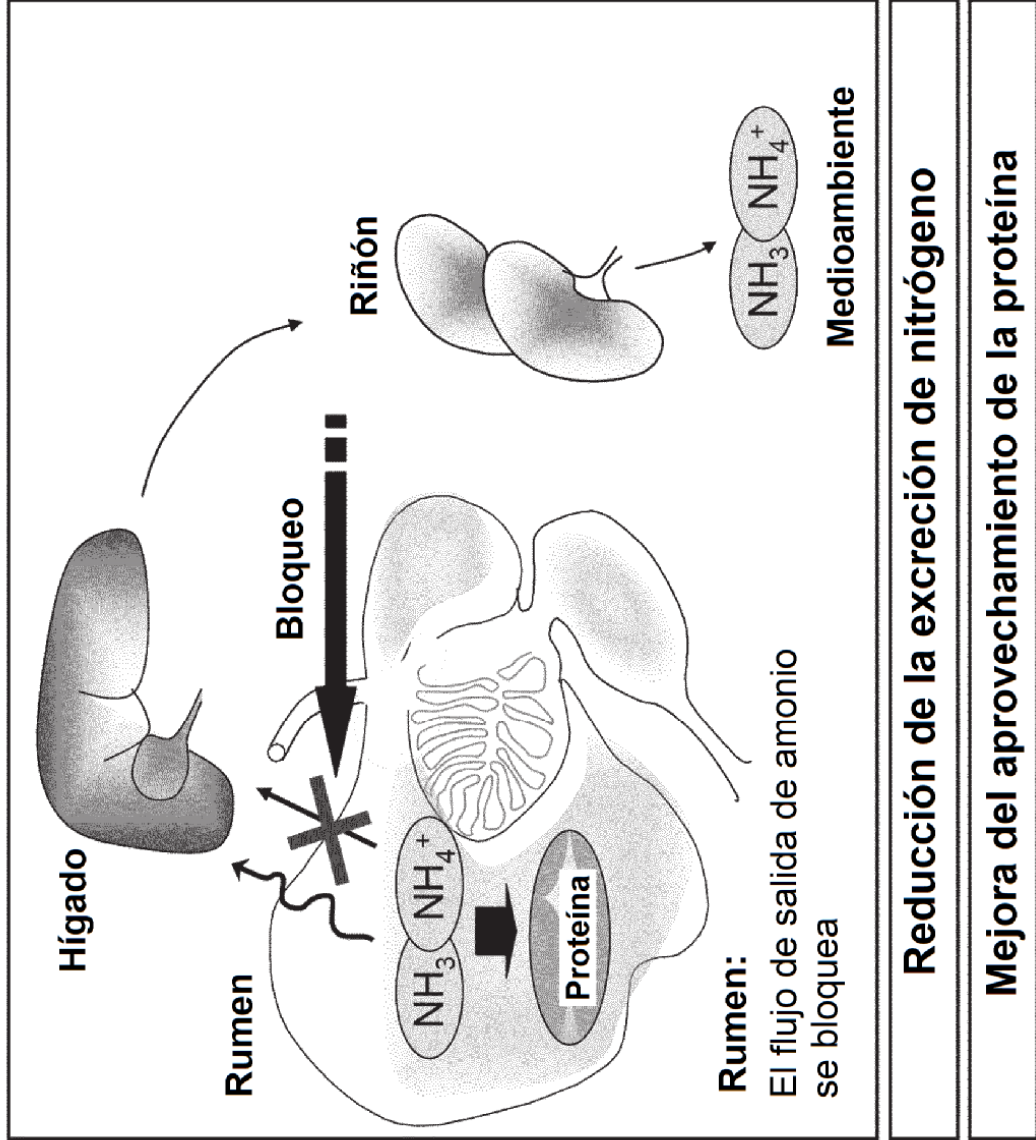


Fig.6

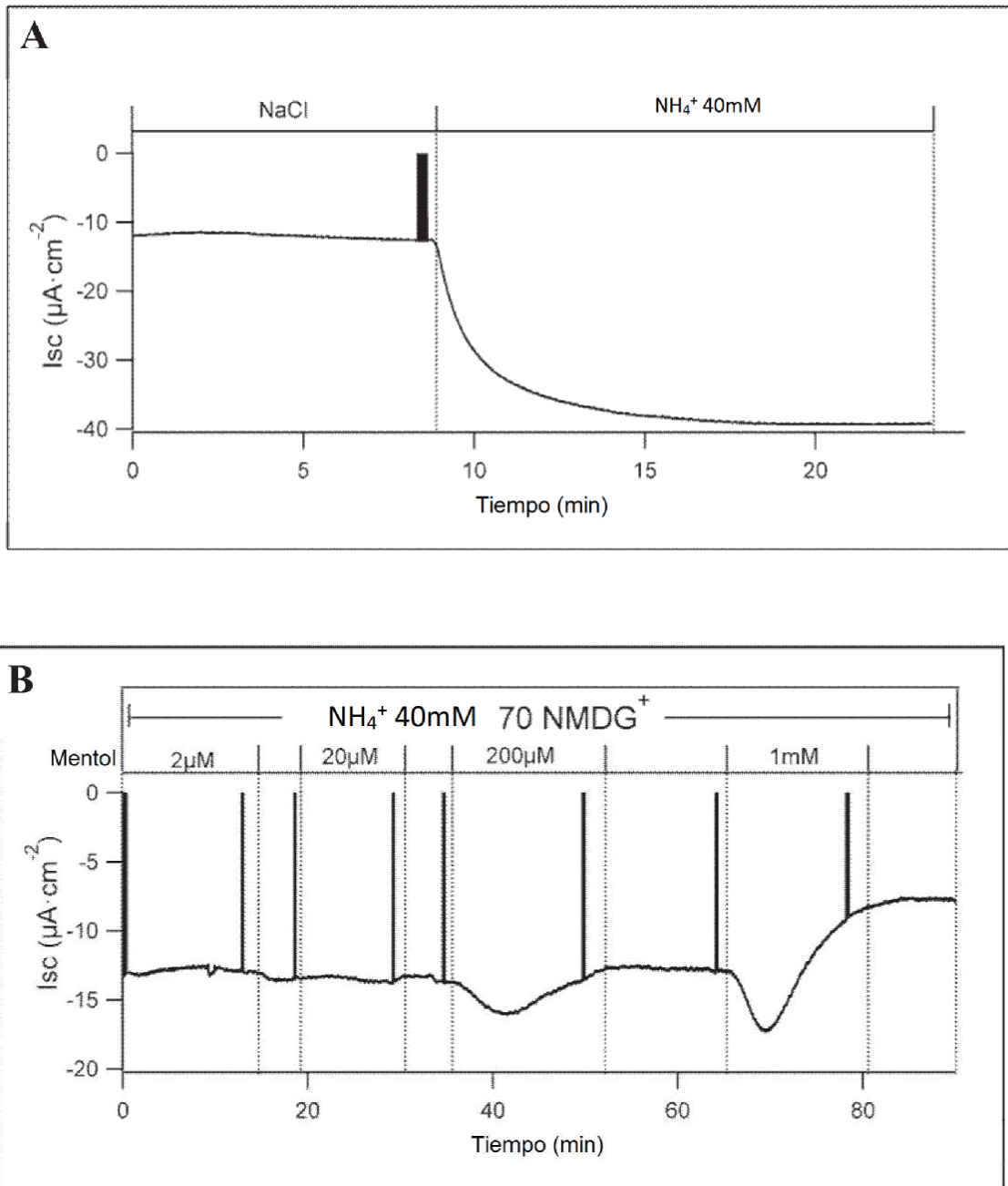


Fig.7

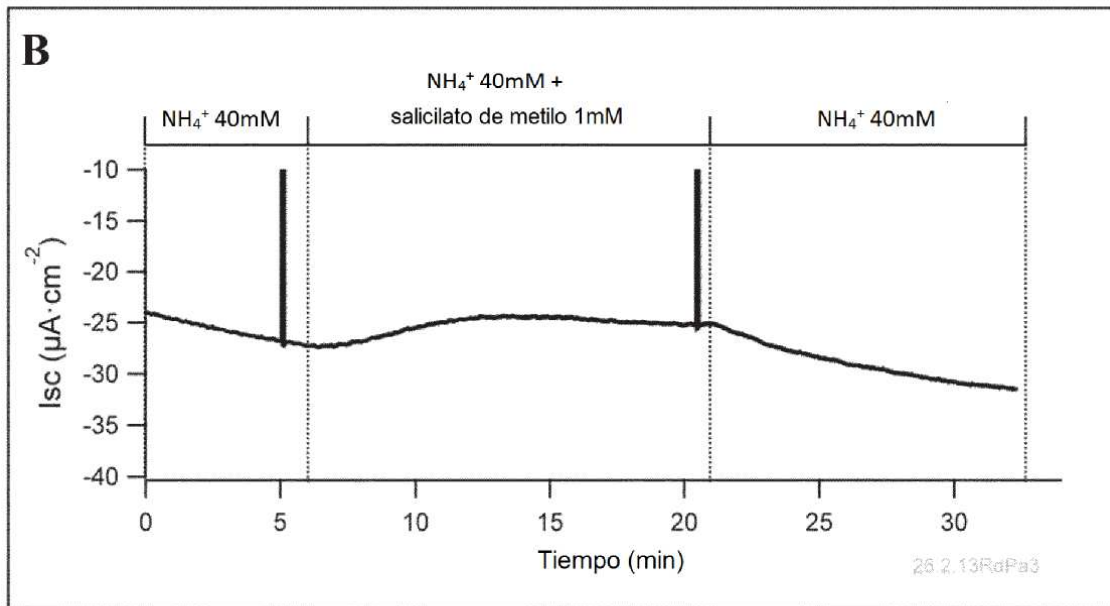
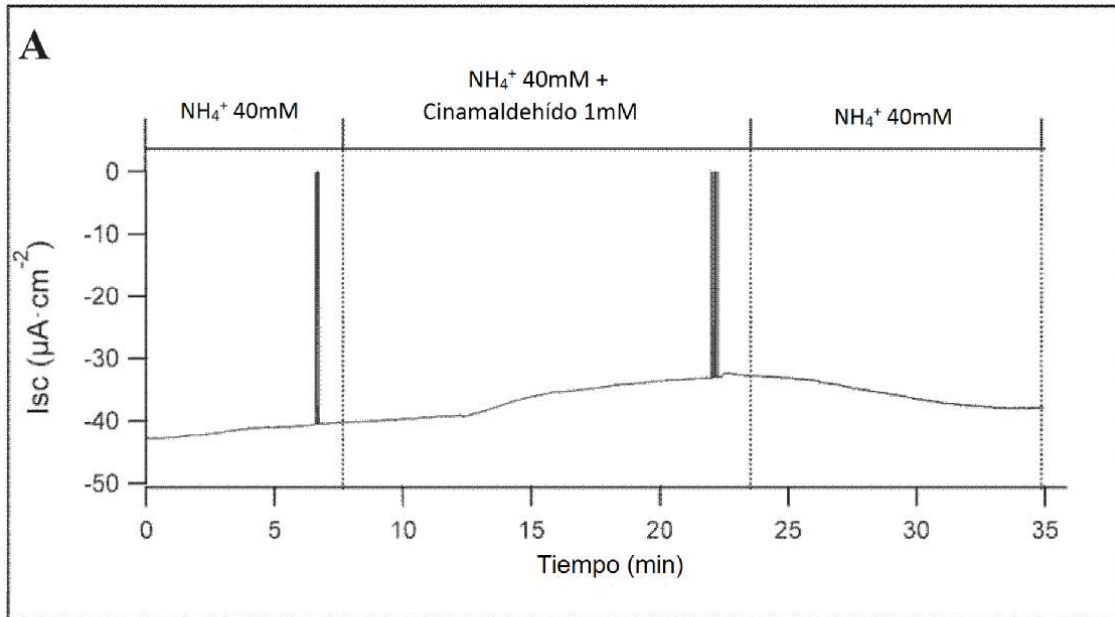


Fig.8

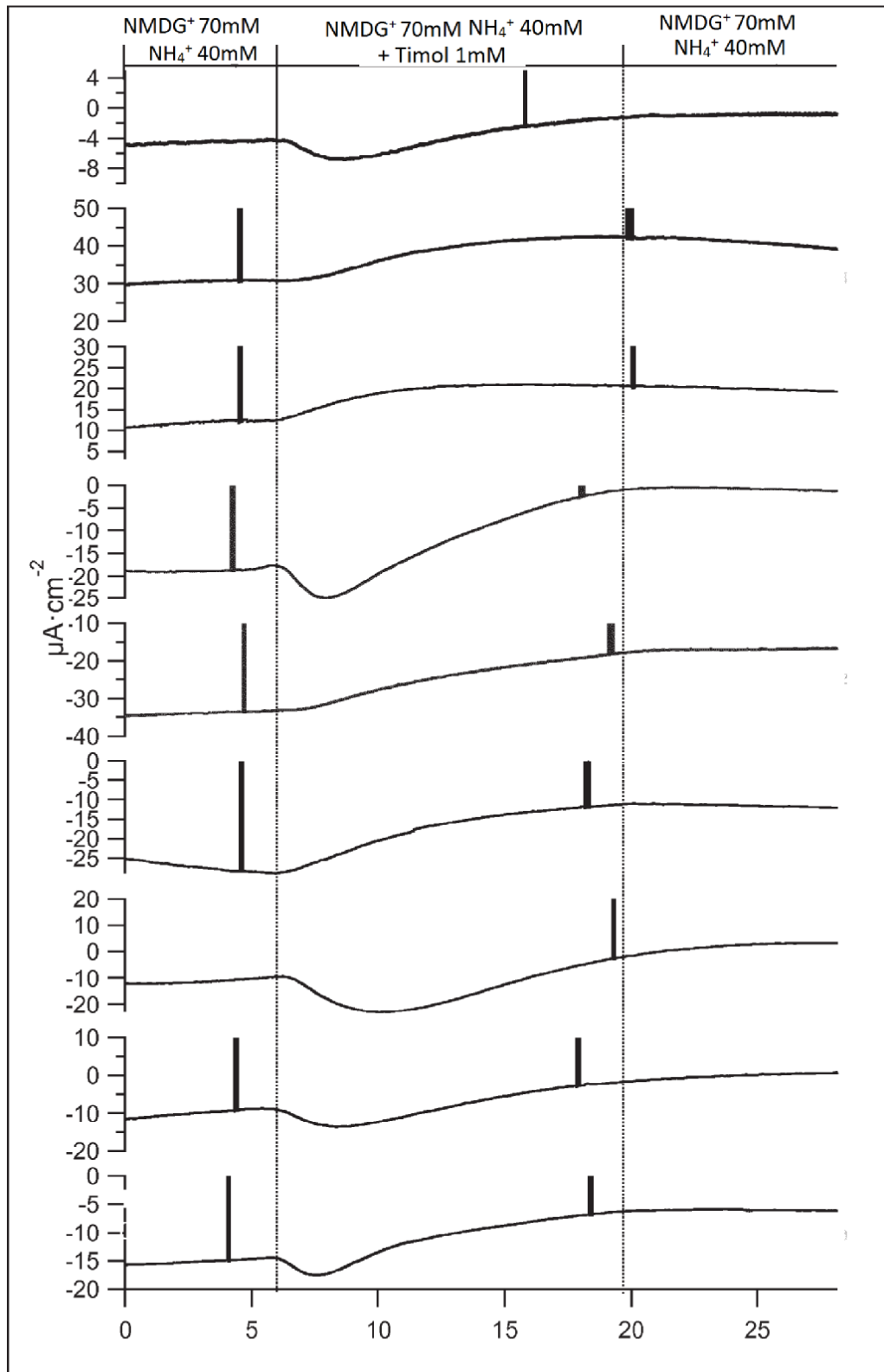


Fig.9

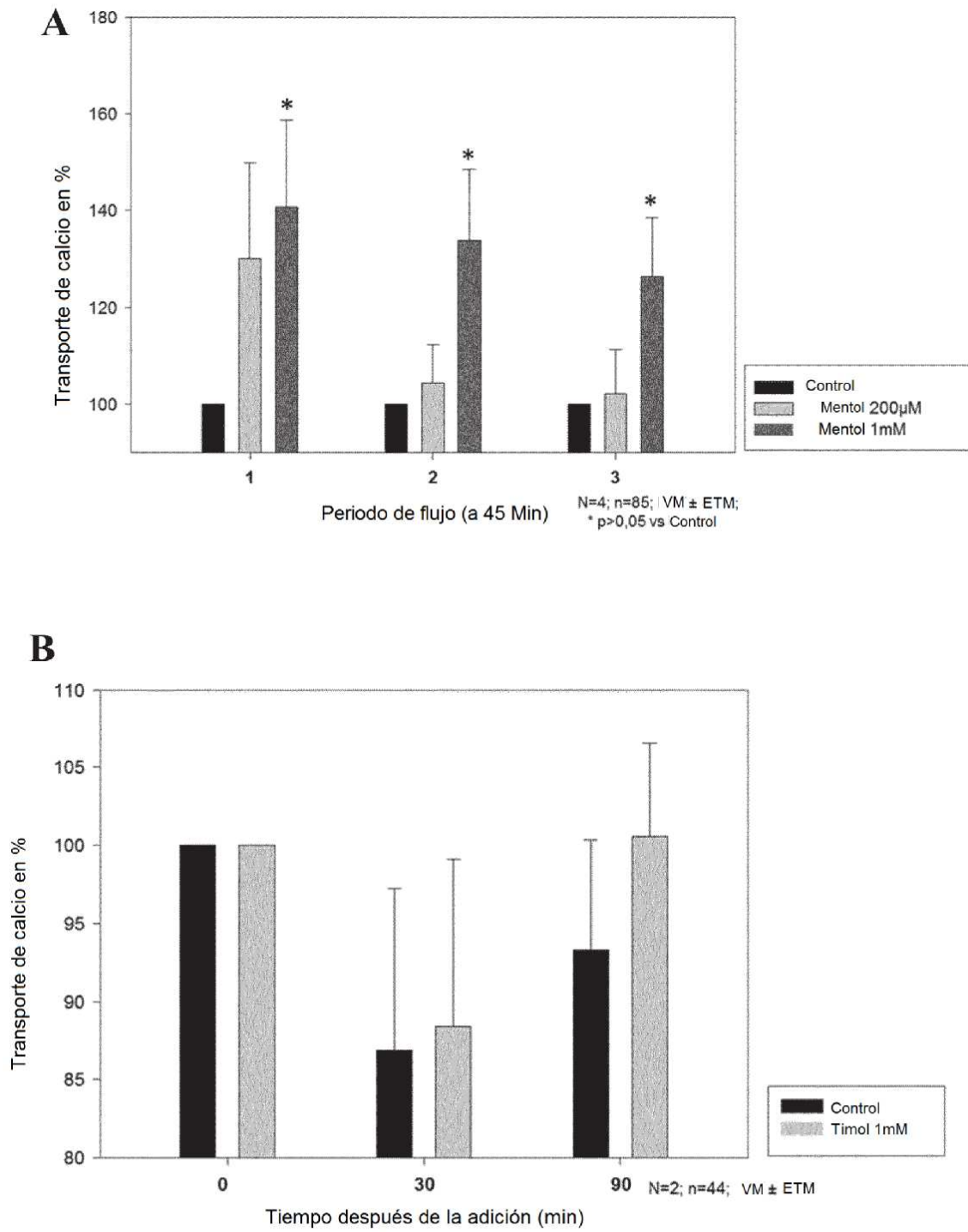


Fig.10