

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 974**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12Q 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2013 PCT/EP2013/068202**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2013 E 13756897 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2893045**

54 Título: **Un método para la selección de agentes que influyen en trastornos de la motilidad intestinal y el dolor**

30 Prioridad:

**03.09.2012 US 201261696277 P**

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

**17.09.2018**

73 Titular/es:

**BIOGAIA AB (100.0%)  
Kungsbrogatan 3A P.O. Box 3242  
103 64 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**CONNOLLY, EAMONN;  
KUNZE, WOLFGANG y  
BIENENSTOCK, JOHN**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 681 974 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**

Un método para la selección de agentes que influyen en trastornos de la motilidad intestinal y el dolor

**5 Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

10 El término trastornos de la motilidad intestinal se aplica a contracciones intestinales anómalas que suelen estar asociadas con dolor, estreñimiento o diarrea. Esta frase se utiliza para describir varios trastornos en los que el intestino no se ha desarrollado correctamente o ha perdido su capacidad para coordinar la actividad muscular debido a diversas causas. Tales trastornos se pueden manifestar de varios modos, e incluyen pero no se limitan a los siguientes:

- 15 • Distensión abdominal
- Obstrucción recurrente
- Dolor cólico abdominal
- Estreñimiento
- Enfermedad por reflujo gastroesofágico
- Vómitos recurrentes, incoercibles
- 20 • Diarrea
- Síndrome del intestino irritable (IBS)
- Enfermedad intestinal inflamatoria
- Incontinencia fecal
- Cólicos del lactante
- 25 • Dolor abdominal recurrente frecuente (FRAP)
- Regurgitación
- Intolerancia alimentaria

30 En un sentido amplio, cualquier alteración significativa en el tránsito de alimentos y las secreciones en el tubo digestivo se puede considerar un trastorno de la motilidad intestinal.

35 Se requieren unos movimientos coordinados apropiados del estómago y los intestinos para digerir e impulsar los contenidos intestinales a lo largo del tubo digestivo. Los patrones de contracción y relajación necesarios para la motilidad apropiada del tubo gastrointestinal (GI) son complejos, y utilizan los nervios y músculos dentro de las paredes del GI. Cada día, en cualquier momento, muchos factores pueden influir en la motilidad del GI (por ejemplo, ejercicio físico, malestar psíquico). Los lactantes recién nacidos deben desarrollar el complejo sistema de motilidad en el tubo GI. La patogénesis de trastornos de la motilidad intestinal es en la mayoría de los casos multifactorial.

40 Aunque la organización estructural global de los nervios y la musculatura es similar a lo largo del intestino delgado y el intestino grueso, cada parte tiene actividades motoras distintas. Durante y después de alimentarse, se producen contracciones estacionarias o propagadas cortas con complejos peristálticos y antiperistálticos ocasionales, y esto permite descomponer el bolo alimenticio y mezclarlo con jugos gástricos para una absorción apropiada. Tras la digestión, el programa motor cambia a uno con contracciones propagadas más largas que mueven los productos digeridos en la dirección anal. Se produce otra actividad motora, que es más regular, creando las ondas peristálticas (es decir, contracciones de la musculatura circular del intestino delgado) que permiten el avance de alimentos no digeridos a través de los intestinos.

50 El envejecimiento, la demencia, un accidente cerebrovascular, la enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, desgarros rectales durante el parto, diabetes, complicaciones quirúrgicas y trastornos neuromusculares (por ejemplo, miastenia grave) pueden provocar trastornos de la motilidad.

55 El IBS, un trastorno de la motilidad intestinal diagnosticado frecuentemente, se ha considerado una enfermedad del colon durante décadas, pero la investigación sobre la motilidad del GI ha demostrado que también pueden producirse alteraciones de la motilidad subyacentes en el intestino delgado. El IBS puede ir acompañado por dolor abdominal.

Las causas del síndrome del intestino irritable (IBS) siguen sin conocerse. Según algunos informes, el intestino delgado y el colon de pacientes con IBS son más sensibles y reactivos a estímulos leves de lo habitual.

60 Ocasionalmente, se puede producir incontinencia fecal tras la ingestión de ciertos alimentos. Los azúcares, las fibras insolubles y los almidones (salvo el arroz) se descomponen normalmente en los intestinos, formando una cantidad variable de gas que debe ser expulsada. La mayoría de las personas que tienen deficiencia de lactasa no pueden digerir la lactosa, un azúcar común en varios alimentos (por ejemplo, leche, tartas). Las personas que tienen deficiencia de lactasa pueden experimentar diarrea líquida incontrolada después de la ingestión de lactosa.

65 El estreñimiento es el malestar digestivo más común en los Estados Unidos, pero, a pesar de su frecuencia, suele

permanecer inadvertido hasta que el paciente desarrolla trastornos secundarios, tales como trastornos anorrectales o enfermedad diverticular.

5 No existe una definición de estreñimiento útil desde un punto de vista clínico ampliamente aceptada. Los profesionales sanitarios habitualmente utilizan la frecuencia de defecaciones (es decir, menos de 3 defecaciones por semana) para definir el estreñimiento. Sin embargo, los criterios de Roma, introducidos inicialmente en 1988 y modificados subsiguientemente dos veces para proporcionar los criterios de Roma III, se han convertido en la definición de estreñimiento estándar para la investigación.

10 Según los criterios de Roma III para el estreñimiento, un paciente debe experimentar al menos 2 de los siguientes síntomas a lo largo de los 3 meses anteriores:

- Menos de 3 defecaciones por semana
- Esfuerzos
- Heces grumosas o duras
- 15 • Sensación de obstrucción anorrectal
- Sensación de defecación incompleta
- Maniobra manual requerida para defecar

20 El estreñimiento es frecuentemente crónico, puede afectar significativamente a la calidad de vida del individuo, y puede asociarse con unos gastos sanitarios significativos. Se considera crónico si se produce durante al menos 12 semanas (en total, no necesariamente consecutivas) durante el año anterior.

El estreñimiento normalmente tiene varias causas, ya sean primarias o secundarias. Las más frecuentes de éstas son las siguientes:

- 25 • Dieta que es pobre en fibra
- Embarazo
- Estreñimiento psicológico y depresión clínica relacionados con cambios de estilo de vida (por ejemplo, viaje, trabajo o divorcio), en los que el paciente ignora la necesidad de defecar
- Hipotiroidismo
- 30 • Desequilibrio hidroelectrolítico, especialmente si afecta al  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{K}^+$
- Tumores que producen compresión mecánica sobre un tubo intestinal, ya sea interna o externamente
- Lesiones del sistema nervioso
- Envejecimiento
- Enfermedad de Parkinson
- 35 • Intoxicación por plomo, mercurio, fósforo o arsénico

40 El estreñimiento es muy común durante el embarazo. Las contracciones musculares que normalmente mueven los alimentos a través de los intestinos se ralentizan debido a los niveles más altos de la hormona progesterona y posiblemente al hierro extra tomado como vitamina prenatal. Éste va en ocasiones acompañado también por dolor en la parte inferior del abdomen.

El estreñimiento también se asocia con una edad avanzada y el denominado “intestino envejecido” que normalmente se encuentra especialmente en personas mayores de 70 y en instituciones para enfermos crónicos. Esta afección va acompañada de:

- 45 • Número reducido de neuronas en la respuesta alterada del plexo mientérico a la estimulación directa que conduce a disfunción mientérica
- Deposición incrementada de colágeno en el colon izquierdo, que conduce a anomalías en la dismotilidad y distensibilidad colónica y rectal
- Reducción en la amplitud de la información de los nervios inhibidores a la capa muscular circular del colon, que da como resultado una falta de coordinación motora segmental
- 50 • Unión incrementada de endorfinas plasmáticas a receptores intestinales en personas de 60 años y mayores.

55 En el otro extremo de los trastornos de la motilidad intestinal del espectro de envejecimiento, el llanto persistente o excesivo de los cólicos del lactante es uno de los problemas más angustiosos de la lactancia. Es angustioso para el lactante, los padres y los profesionales sanitarios a los que concierne. Los padres del lactante irritable pueden ver el llanto como una crítica de su capacidad para cuidarlo o como indicio de que su hijo está enfermo. Los cólicos del lactante son una afección que desaparece con el tiempo.

60 La definición más ampliamente aceptada de cólico es el criterio de Wessel o la “regla de tres”: llanto que dura más de tres horas al día, se produce más de tres días por semana y persiste durante más de tres semanas. Esta definición también requiere que el lactante esté “por lo demás sano y bien alimentado”.

65 También se ha propuesto la hipermotilidad intestinal secundaria a un supuesto desequilibrio autónomo como una etiología para el cólico. Muchos de los mecanismos que regulan la actividad motora son inmaduros en los lactantes. La inmadurez de estos mecanismos puede dar como resultado una vulnerabilidad incrementada a la intolerancia a la alimentación. Por tanto, el cólico puede ser una manifestación clínica común en la subpoblación de lactantes que

tienen una disfunción maturacional en uno o más de los aspectos de regulación de la motilidad.

Según algunos informes epidemiológicos, unos 30 millones de estadounidenses padecen trastornos de la motilidad intestinal. Los datos disponibles en la bibliografía médica indican que, a nivel mundial, el 30-45% de todas las afecciones GI se pueden atribuir a trastornos de la motilidad intestinal.

Los tratamientos y recomendaciones actuales varían dependiendo del tipo de trastornos de la motilidad, para el estreñimiento algunos ejemplos son:

- Fibra o agentes de carga (no es útil para estreñimiento por tránsito lento)
- Laxantes emolientes
- Laxantes estimulantes
- Laxantes osmóticos (por ejemplo, polietilenglicol)
- Activador de canales de cloro (por ejemplo, Lubiproston)
- Agentes serotoninérgicos (agonistas de los receptores de 5-HT4)

Adicionalmente, se ha estudiado el uso de las bacterias del ácido láctico (LAB) en un ensayo clínico aleatorizado: Eficacia de alcachofas enriquecidas en *Lactobacillus paracasei* en el tratamiento de pacientes con estreñimiento funcional (Riezzo *et al.*; Aliment Pharmacol Ther. Feb. de 2012; 35(4):441-50)

Además, en un ensayo, se asignaron 90 lactantes alimentados por lactancia natural que padecían cólicos aleatoriamente a un tratamiento con *L. reuteri* o simeticona. Antes de iniciar el tratamiento, el tiempo de llanto diario medio era de 197 minutos en ambos grupos. Entre los 83 lactantes que finalizaron el estudio, el tiempo de llanto diario medio fue menor en el grupo tratado con *L. reuteri* que en el tratado con simeticona el día 7 (159 frente a 177 minutos) y el día 28 (51 frente a 145 minutos). (Savino F *et al.*, Pediatrics. 2007; 119(1):e124).

Trastornos de la motilidad intestinal se aplica a contracciones intestinales anómalas asociadas a menudo con dolor, hay muchos tipos diferentes de tratamientos y recomendaciones para los diferentes trastornos, algunos de los cuales funcionan mejor que otros.

Por tanto, existe una necesidad global y problemas específicos que resolver para diversos trastornos de la motilidad concretamente; ¿Cuál es el mejor modo de seleccionar agentes para normalizar o tratar trastornos de la motilidad intestinal y el dolor de barriga/intestinal?

R. Wu *et al.* (2012) dan a conocer que mapas espaciotemporales de peristalsis *ex vivo* revelaron detalles de los efectos probióticos sobre la motilidad del yeyuno de ratón (Canadian Digestive Diseases Week-Abstract ID: A291) y en una publicación subsiguiente R. Wu *et al.* (2013) dan a conocer que mapas espaciotemporales revelan diferencias regionales en los efectos sobre la motilidad del intestino para cepas de *Lactobacillus reuteri* y *rhamnosus* (Neurogastroenterology and Motility 25, e205-e214).

Pérez-Burgos A. *et al.* (2012) describen el análisis del efecto de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) sobre la activación de los nervios aferentes mesentéricos mediante la grabación de haces de nervios llevado a cabo en un segmento de yeyuno intestinal *ex vivo* (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304(2): G211-220).

### Sumario de la invención

Los inventores de la invención han desarrollado en el presente documento un nuevo método para evaluar agentes para el tratamiento de diferentes trastornos de la motilidad intestinal, utilizando distintas partes metodológicas relacionadas con la musculatura y los nervios del tubo GI, y su comunicación con el cerebro.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para la selección de un agente eficaz para el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal, en el que dicho método comprende:

a) una etapa de mapeo espaciotemporal (ST) llevada a cabo en un segmento gastrointestinal para analizar el efecto de un agente sobre la motilidad gastrointestinal; y

b) una etapa de grabación de haces de nervios *ex vivo* llevada a cabo en un segmento gastrointestinal para analizar el efecto de un agente sobre la activación de los nervios aferentes mesentéricos.

En realizaciones preferidas, el mapeo ST en la etapa a) se lleva a cabo mediante la grabación o la obtención de imágenes en video. En los métodos de la invención, la etapa a) comprende preferiblemente utilizar el mapa ST generado en la etapa a) para medir la frecuencia de complejo motor migratorio (CMM) y/o la velocidad de complejo motor migratorio (CMM) en dicho segmento gastrointestinal.

En los métodos de la invención, la etapa a) comprende además preferiblemente la medición de la presión intraluminal, por ejemplo, presión intraluminal máxima (PPr).

En los métodos de la invención, la etapa b) comprende preferiblemente medir las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos.

5 En aspectos preferidos, la presente invención da a conocer un método de dos etapas para la selección de agentes eficaces en trastornos de la motilidad. En la primera etapa, los inventores combinaron grabaciones de la presión intraluminal con mapas espaciotemporales para analizar los efectos de diferentes agentes sobre la motilidad. En esta etapa, se mide preferiblemente la presión intraluminal máxima (PPr) y se realizan grabaciones en video tomadas en segmentos de yeyuno y colon de ratón *ex vivo* antes y después de aplicaciones intraluminales de los agentes. En la primera etapa del método, también se calculan la frecuencia y la velocidad de complejo motor migratorio. En la segunda etapa, se analiza la señalización de nervios intestinales y se miden las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos. Por tanto, la presente invención da a conocer un método para la selección de agentes eficaces en trastornos de la motilidad que comprende una primera etapa en la que se utiliza la grabación simultánea de cambios en la presión intraluminal además de una grabación en video y mapas espaciotemporales, y una segunda etapa que es un análisis de la señalización de los nervios, por ejemplo, realizando grabaciones de nervios mesentéricos, por ejemplo, mesentéricos extracelulares.

Por tanto, en una realización aún adicional, la presente invención proporciona un método para la selección de un agente eficaz para el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal, que comprende las etapas de:

- 20 (a) grabar la presión intraluminal, crear un mapa espaciotemporal (ST) para permitir un análisis de los efectos de diferentes agentes sobre la motilidad gastrointestinal en el que dicho mapa espaciotemporal se utiliza para medir la frecuencia y la velocidad de complejo motor migratorio, en una muestra intestinal en presencia y ausencia de un agente de prueba; y
- 25 (b) analizar la señalización de nervios intestinales midiendo las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos en una muestra intestinal en presencia y ausencia de un agente de prueba.

En realizaciones preferidas de este método, en la etapa (a) se mide la presión intraluminal máxima (PPr).

30 La presente invención se refiere al método de dos etapas descrito.

### Descripción de los dibujos

- 35 Figura 1 Grabaciones de motilidad de órganos
- Figura 2 Imagen y datos proporcionados a partir de grabaciones de la motilidad
- Figura 3 Imagen y datos proporcionados a partir de grabaciones de la motilidad
- 40 Figura 4 Grabación de nervios mesentéricos; inervación del intestino
- Figura 5 Grabaciones extracelulares
- 45 Figura 6 Detalles del plugin de software StMAP
- Figura 7 Gráficos que muestran los resultados de la etapa a). Los agentes sometidos a prueba son (A) *L. gasseri* 345A (DSM 27123), (B) *L. gasseri* 621A (DSM 27126), (C) *L. gasseri* T1, (D) *L. gasseri* T2, (E) *L. reuteri* ATCC PTA 6475, (F) *L. reuteri* DSM 17938 y (G) *L. rhamnosus* (JB-1).
- 50 Figura 8 Gráficos que muestran los resultados de la etapa b), los agentes sometidos a prueba son *L. rhamnosus* (JB-1), *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* ATCC PTA 6475, *L. gasseri* 345A (DSM 27123), *L. gasseri* 621A (DSM 27126), *L. gasseri* T1 y *L. gasseri* T2.

### Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

55 Para facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación varios términos.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “presión intraluminal máxima” (PPr) se basa en grabaciones de la presión intraluminal, en las que se miden cambios en la presión intraluminal en el punto medio del eje longitudinal del segmento de intestino. Se analiza la señal de presión, y se identifica y mide la presión intraluminal máxima (PPr).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “frecuencia de complejo motor migratorio” (frecuencia de CMM) se calcula contando el número de bandas de CM oscuras en los mapas espaciotemporales.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “velocidad de complejo motor migratorio” (velocidad de

CMM) se mide a partir de la(s) pendiente(s) de cada banda en el mapa espaciotemporal generado por complejos motores migratorios.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “frecuencia de activación” se utiliza para medir las series de disparos sensoriales al cerebro.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “agente” se utiliza para referirse a cualquier sustancia o material, incluyendo células enteras, microorganismos, proteínas, péptidos, enzimas, moléculas u otros materiales químicos o biológicos que se pueden utilizar para afectar a la motilidad y/o al dolor en el sistema gastrointestinal de un mamífero. Los agentes preferidos son cepas bacterianas, por ejemplo, cepas bacterianas probióticas.

15 El método de la invención del presente documento es un método de dos etapas, basado en un método de mapeo espaciotemporal (ST) (etapa 1) combinado con una tecnología mejorada para la grabación de haces de nervios *ex vivo* (etapa 2) en el que se extirpa un segmento gastrointestinal con o sin la arcada mesentérica que contiene el haz de nervios que suministra al segmento constituido por fibras tanto espinales como vagues.

En la primera etapa del método preferido en el presente documento, se combinan grabaciones de la presión intraluminal con mapas espaciotemporales (ST) para analizar los efectos de diferentes agentes sobre la motilidad.

20 Los mapas ST proporcionan una herramienta para visualizar un campo espacialmente variable y temporalmente evolutivo, que se puede utilizar en el análisis de la motilidad gastrointestinal incluyendo comportamientos de trastornos de la motilidad y salud. Utilizando la obtención de imágenes en video espaciotemporales, los inventores han desarrollado en el presente documento una parte del nuevo método en la que se utiliza el análisis informático de mapas espaciotemporales de cambios en el diámetro del intestino. Esto revela patrones motores que son muy difíciles de detectar con cualquier otra técnica. Los parámetros de estos patrones correlacionan directamente resultados obtenidos con segmentos intestinales de ratón *ex vivo* con la farmacología del intestino humano. Los complejos motores (CM) propagados peristálticos o movimientos de mezcla (CM estacionarios) se graban digitalmente a tiempo real y las imágenes se almacenan. El software de análisis, tal como se describe más adelante, detecta los bordes del intestino y es capaz de calcular de manera automática su diámetro a lo largo de la longitud del segmento con el tiempo. El programa utiliza estos datos para construir mapas espaciotemporales que son capaces de extraer información sumamente específica sobre patrones motores; por ejemplo, la frecuencia de complejo motor migratorio (CMM) (frecuencia de CMM con dependencia neuronal), velocidad de CMM y tasas de contracción miogénica (relacionadas con ondas lentas) de contracción.

35 Además, se está comenzado a aceptar que microorganismos intestinales envían señales al cerebro como parte del denominado eje microbiota-intestino-cerebro. Sin embargo, se sabe muy poco sobre el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo o el funcionamiento del sistema nervioso. En la actualidad, no se sabe nada sobre la naturaleza cuantitativa de la señal nerviosa transmitida desde el intestino hasta el sistema nervioso central.

40 Las neuronas sensoriales individuales, incluyendo aquellas entre las fibras vagas, representan estímulos físicos continuos como series de disparos que se ajustan a un patrón que codifican la naturaleza y la intensidad del estímulo. Además de esto, puede haber estímulos representados en un código de población determinado por el número de fibras activas en el haz. Toda la información que llega al cerebro a través de las aferentes primarias ha de ser codificada en el lenguaje de las series de disparos neuronales. Por tanto, saber cómo se ven afectadas las series de disparos sensoriales por comensales, cepas probióticas y sustancias diferentes permite identificar nuevos microorganismos intestinales beneficiosos y sus moléculas activas por sus efectos sobre la activación de las aferentes primarias así como nuevos fármacos y otros compuestos que pueden intervenir de diverso modo en el sistema de señalización.

50 El nuevo método de la invención del presente documento para evaluar agentes para el tratamiento de diferentes trastornos de la motilidad intestinal permite la distinción de efectos específicos de los agentes, por ejemplo, una cepa bacteriana probiótica, u otro agente biológico o químico, tanto en músculos como nervios. Los datos experimentales confirman que no es necesariamente el mismo agente el que puede modular, por ejemplo, el patrón de mezcla o el patrón de propulsión en una parte determinada del tubo GI que es además el más eficaz para modular el dolor asociado con el sistema nervioso entérico y/o el central.

60 Además, para investigar los efectos de ciertas moléculas en diferentes enfermedades, el método de la presente invención permite realizar diferentes estudios de la perfusión y difusión lumbales hasta y a través de la barrera epitelial.

El tubo digestivo realiza dos patrones de motilidad fundamentales:

65 Propulsión: los alimentos deben ser impulsados a lo largo de la longitud completa del tubo digestivo para que sean sometidos a la serie secuencial de procesamiento implicada en la disgregación y absorción. El principal tipo de motilidad propulsiva, observada particularmente en el esófago y el intestino delgado, es la peristalsis – un anillo de contracción muscular se desplaza desde el lado oral de un bolo de ingesta y hacia el ano, impulsando los contenidos

de la luz en esa dirección; a medida que se desplaza el anillo, el músculo al otro lado de la zona distendida se relaja, facilitando el paso fluido del bolo.

5 Mezcla: Si los materiales ingeridos fueran simplemente impulsados a lo largo del tubo digestivo, cabría esperar una digestión y absorción muy pobres, porque las enzimas digestivas no se mezclarían debidamente con la ingesta y la mayor parte de la ingesta no entraría en contacto con las células epiteliales que absorben los nutrientes, incluyendo el agua. Las contracciones de segmentación son un tipo común de motilidad de mezcla observado especialmente en el intestino delgado – anillos segmentales de contracción trocean y mezclan la ingesta. La contracción y relajación alternantes del músculo longitudinal en la pared del intestino también proporcionan una mezcla eficaz de sus contenidos.

15 Utilizando el nuevo método del presente documento, se puede detectar y grabar motilidad intestinal modificada, observada como ya sea el patrón de mezcla (posterior a la alimentación) o el patrón de propulsión, observada claramente utilizando el método de mapas ST, combinado con cambios en el dolor provocado por diferentes trastornos de la motilidad, y manifestado central o periféricamente.

20 Un tipo de dolor es el dolor visceral que es el resultado de la activación de nociceptores de las vísceras (órganos) abdominales. Las estructuras viscerales son sumamente sensibles a la distensión (estrechamiento), isquemia e inflamación, pero relativamente insensibles a otros estímulos que normalmente provocan dolor. El dolor visceral es difuso, difícil de localizar y normalmente se refiere a una estructura, habitualmente superficial, distante. Puede ir acompañado por síntomas tales como náusea, vómitos, cambios en las constantes vitales así como manifestaciones emocionales. El dolor se puede describir como as nauseabundo, profundo, constrictivo y sordo. Distintas lesiones estructurales o anomalías bioquímicas explican este tipo de dolor en solamente una proporción de pacientes. Estas enfermedades a veces se agrupan como enfermedades neuromusculares gastrointestinales (GINMD). Las personas también pueden experimentar dolores viscerales, a menudo muy intensos en naturaleza, sin ninguna evidencia de razón estructural, bioquímica o histopatológica para tales síntomas.

30 Un nociceptor es un receptor sensorial que responde a estímulos potencialmente dañinos enviando potenciales de acción a neuronas nociceptivas específicas (Aδ o C) que transmiten a los tractos anterolaterales de la médula espinal (más una proyección vagal menor), y entonces hasta el tálamo y el prosencéfalo incluyendo las cortezas insular y cingulada. La activación de mensajes de dolor desde el intestino hasta el sistema nervioso central a través de fibras aferentes primarias extrínsecas que viajan en haces de nervios aferentes mesentéricos es crítica para la percepción del dolor debido a la patología intestinal.

35 En el sistema de la invención del presente documento, se leen los cambios en la motilidad y el dolor como alteraciones en patrones de motilidad (por ejemplo, PPr, velocidad de CMM y/o frecuencia de CMM) o amplitudes de contracción o tráfico espinal de nervios mesentéricos aferentes incrementado para partes específicas y seleccionadas del intestino. Ha resultado sorprendente descubrir que diferentes agentes pueden fomentar la mezcla en una parte del tubo GI y la propulsión en otra parte, o no ejercer ningún efecto en absoluto, y afectar a sistemas de señalización de dolor en una parte, pero no en otra parte del tubo GI, y a través de vías nerviosas diferentes tales como vagales o, para el dolor visceral, a través de los ganglios de las raíces dorsales. Tal especificidad regional precisa resalta la potencia y especificidad de la estrategia de la presente invención para evaluar los efectos de moléculas de prueba.

45 Por tanto, un objetivo de la presente invención es encontrar agentes adecuados para el tratamiento, la prevención o la modulación de trastornos de la motilidad específicos, utilizando el modelo del presente documento.

50 Las dos etapas en el método presentado proporcionarán datos sobre la motilidad gastrointestinal y la activación de los nervios aferentes mesentéricos. El análisis de estos parámetros dará como resultado un método de selección para agentes eficaces en el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal. Por tanto, se utiliza el análisis del efecto de un agente en la etapa a) y la etapa b) de los métodos proporcionados para determinar si el agente es eficaz para el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal.

55 Los parámetros preferidos que se van a medir en la etapa a) son la frecuencia de CMM y/o la velocidad de CMM, y esto se realiza convenientemente mediante un mapa ST que se genera preferiblemente mediante la obtención de imágenes en video, por ejemplo, utilizando una grabación en video, y preferiblemente comprende un patrón de bandas alternantes de tonos claros y oscuros que contiene 3 clases de información: posición a lo largo del intestino (ordenada), tiempo (abscisa) y diámetro intestinal (cota o eje z). Utilizando estas variables, el mapa espaciotemporal puede convertirse en una "huella dactilar" de motilidad cuya sensibilidad es importante a la hora de definir los efectos detallados y matizados que cepas probióticas específicas y otros agentes tienen sobre la motilidad, y la capacidad de distinguirlos.

65 Otros parámetros preferidos que se van a medir en la etapa a) son la presión intraluminal, en particular la presión intraluminal máxima (PPr). Opcionalmente, tal como se describen en los ejemplos, se pueden medir otros parámetros, por ejemplo, a partir del mapa ST y en la etapa a) del método.

Un parámetro preferido que se va a medir en la etapa b) es las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos. Esta técnica se puede utilizar para determinar cambios en la excitabilidad de las fibras nerviosas mesentéricas inducidos por diferentes tratamientos.

5 El análisis de uno o más de estos parámetros dará como resultado un método de selección de agentes eficaces en trastornos de la motilidad. En los ejemplos experimentales y las figuras se describen métodos y aparatos apropiados para generar el mapa ST y medir estos parámetros.

10 Por tanto, en métodos preferidos, las dos etapas en el método presentado proporcionarán datos sobre la presión intraluminal máxima (PPr), la frecuencia de CMM, la velocidad de CMM y las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos. El análisis de estos parámetros dará como resultado un método preferido de selección de agentes eficaces en trastornos de la motilidad.

15 Los métodos de la invención se pueden utilizar para encontrar agentes adecuados para diferentes trastornos de la motilidad. Los agentes se seleccionan para afectar a la velocidad de CMM y/o la frecuencia de CMM y/o la PPr y la frecuencia de activación nerviosa del paciente de un modo beneficioso con el fin de influir en, prevenir o tratar el trastorno de la motilidad.

20 La etapa a) del método utiliza el mapeo ST (análisis de ST) de un segmento gastrointestinal para analizar el efecto de un agente sobre la motilidad gastrointestinal. Con este fin, se miden preferiblemente la frecuencia de CMM y/o la velocidad de CMM utilizando el mapa ST. Convenientemente, el mapa ST muestra imágenes de bandas de CM a partir de las cuales se pueden medir la frecuencia y la velocidad, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos experimentales. Además, se mide preferiblemente la presión intraluminal y, más preferiblemente, la presión intraluminal máxima (PPr) dentro del segmento gastrointestinal.

25 El segmento gastrointestinal para su uso en los métodos de la presente invención puede provenir de cualquier parte del tubo gastrointestinal, por ejemplo, puede ser un segmento del intestino delgado (por ejemplo, yeyuno) o del intestino grueso (por ejemplo, colon). Los segmentos apropiados para la etapa b) del método requerirán la presencia de un haz de nervios apropiado para permitir la medición de la activación de los nervios aferentes mesentéricos.  
 30 Esto se puede proporcionar convenientemente disponiendo de un segmento gastrointestinal con tejido mesentérico adherido, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos experimentales. Por tanto, los métodos de la invención se llevan a cabo convenientemente en segmentos *ex vivo* de un animal experimental apropiado, por ejemplo, en segmentos gastrointestinales de ratón (por ejemplo, segmentos de colon o yeyuno de ratón). Sorprendentemente, los métodos de la presente invención pueden detectar diferencias en la acción del mismo agente sobre ambos tipos  
 35 de sección intestinal. La capacidad para llevar a cabo una comparación del efecto de un agente sobre el intestino delgado frente al grueso podría ser ventajosa, particularmente ya que, dependiendo del trastorno de la motilidad intestinal que se va a tratar, y la etapa clínica y síntomas del mismo, puede ser beneficioso un tratamiento que sea específico para una región, por ejemplo, específico para ya sea el intestino delgado o grueso.

40 Se pueden detectar cambios en la motilidad gastrointestinal inducidos por un agente como una lectura en la etapa a) del método, por ejemplo, como una alteración en el patrón de motilidad o las amplitudes de contracción. Algunos agentes no ejercerán ningún efecto en absoluto. Un agente que pueda incrementar la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, incrementando la frecuencia de CMM y/o la velocidad de CMM y/o la presión intraluminal, tal como la PPr, será probable que sea útil para tratar trastornos en los que sería ventajoso incrementar la motilidad propulsiva a lo  
 45 largo del tubo digestivo tales como el estreñimiento y cólicos. Si se demuestra que un agente reduce o modifica de manera no significativa la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, reduciendo o modificando de manera no significativa la frecuencia de CMM y/o la velocidad de CMM y/o la presión intraluminal, tal como la PPr, entonces sería poco probable que un agente de este tipo fuera útil para tratar tales trastornos y no se seleccionaría, particularmente si existe una reducción o un cambio no significativo en todos parámetros medidos. Sin embargo, un  
 50 agente que puede dar como resultado una reducción en la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, reduciendo una o más de la frecuencia de CMM y/o la velocidad de CMM y/o la presión intraluminal, tal como la PPr, será probable que sea útil para tratar trastornos en los que sería ventajoso disminuir la motilidad propulsiva a lo largo del tubo digestivo, tal como el IBS o la diarrea.

55 Para seleccionar un agente para su uso en el tratamiento del estreñimiento o cólicos, se prefiere particularmente un aumento en la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, un aumento en la frecuencia de CMM y/o la velocidad de CMM y/o la presión intraluminal, tal como la PPr, en un segmento de intestino grueso, por acción de un agente en los métodos de la invención.

60 La etapa b) de los métodos de la invención analiza el efecto de un agente sobre la activación de los nervios aferentes mesentéricos (señalización del dolor) y se puede utilizar, por tanto, como lectura para el dolor, es decir, si es probable o no que un agente ejerza un efecto sobre dolor, por ejemplo, el dolor visceral. Un aumento o ningún efecto significativo sobre la activación de nervios aferentes es indicativo de un agente que es probable que dé como resultado un aumento en el dolor o ningún efecto significativo sobre el dolor, respectivamente, mientras que una  
 65 disminución en la activación de nervios aferentes es indicativa de un agente que reducirá el dolor. Los agentes preferidos son, por tanto, aquellos que dan como resultado una disminución en la activación de nervios aferentes,

por ejemplo, una disminución en la frecuencia de activación espontánea de haces de nervios aferentes. Como alternativa, se puede seleccionar un agente que da como resultado un cambio no significativo en la activación de nervios si la cepa muestra propiedades ventajosas tal como se mide mediante la etapa a) del método.

5 El agente que se va a someter a prueba se añade al segmento gastrointestinal elegido de cualquier modo apropiado. Convenientemente, los agentes se añaden al espacio intraluminal del segmento, es decir, se aplican por vía intraluminal. Con el fin de analizar el efecto del agente sobre la motilidad (en la etapa a) o la señalización del dolor (en la etapa b), las etapas se llevan a cabo convenientemente en presencia y ausencia del agente. Por ejemplo, las etapas a) y b) se llevan a cabo antes y después de aplicar el agente. Por tanto, en tales métodos, el efecto del agente se compara con un control apropiado, por ejemplo, los resultados en presencia del agente de prueba se comparan con los resultados en ausencia de un agente de prueba, por ejemplo, resultados con tampón solamente en lugar de tampón más agente (por ejemplo, tampón más una cepa bacteriana).

15 Por tanto, en el presente documento también se da a conocer un agente seleccionado mediante los métodos de la invención. Un agente preferido es un microorganismo, más preferiblemente una cepa bacteriana, preferiblemente una cepa bacteriana probiótica. Los agentes seleccionados mediante los métodos de la invención pueden adoptar la forma de un compuesto o una composición farmacéutica, o un compuesto o una composición nutricional.

20 Tal como se ha descrito anteriormente, dependiendo del trastorno de la motilidad que se desee tratar, variarán los criterios de selección. Por ejemplo, si el trastorno de la motilidad intestinal es uno en el que se desea reducir el tiempo de tránsito de material por el intestino (o incrementar la motilidad propulsiva a lo largo del tubo digestivo), por ejemplo, el estreñimiento, la regurgitación o cólicos, entonces en la etapa a) del método, actuará un agente de interés para incrementar la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, incrementando la frecuencia de CMM o la velocidad de CMM o la presión intraluminal (por ejemplo, la PPr). Los agentes preferidos incrementarán dos o más de estos parámetros, por ejemplo, incrementarán la frecuencia de CMM y la velocidad de CMM o incrementarán la frecuencia de CMM y la presión intraluminal (por ejemplo, la PPr), o incrementarán la velocidad de CMM y la presión intraluminal (por ejemplo, la PPr). Los agentes más preferidos incrementarán todos estos parámetros, por ejemplo, incrementarán la frecuencia de CMM, la velocidad de CMM y la presión intraluminal (por ejemplo, la PPr). El etapa a) del método se puede evaluar en un segmento gastrointestinal apropiado del intestino delgado o grueso, por ejemplo, un segmento de yeyuno para el intestino delgado o un segmento de colon para el intestino grueso. En algunas realizaciones, se prefiere el uso de segmentos del intestino grueso, por ejemplo, de colon.

35 Para el tratamiento de tales trastornos, se seleccionará un agente que no afecta a o no incrementa la señalización del dolor, o preferiblemente actúa para disminuir la señalización del dolor. En la etapa b) del método tales agentes no ejercerán ningún efecto o actuarán preferiblemente para reducir o disminuir la activación de los nervios aferentes mesentéricos. Preferiblemente, dicho agente no ejercerá ningún efecto sobre o actuará preferiblemente para reducir las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos. Le etapa b) del método se puede evaluar en cualquier segmento gastrointestinal apropiado del intestino delgado o grueso, por ejemplo, un segmento de yeyuno para el intestino delgado o un segmento de colon para el intestino grueso. En algunas realizaciones, se prefiere el uso de segmentos del intestino delgado, por ejemplo, de yeyuno.

45 Utilizando el método de la presente invención, los inventores han seleccionado una nueva cepa bacteriana, *Lactobacillus gasseri* 345A (LG345A), que se ha demostrado que incrementa la motilidad gastrointestinal demostrando que incrementa la frecuencia de CMM, la velocidad de CMM y la presión intraluminal máxima. También se ha demostrado que esta cepa disminuye la señalización del dolor disminuyendo la activación de los nervios aferentes mesentéricos (al disminuir la frecuencia de activación de haces de nervios aferentes mesentéricos). Esta cepa bacteriana aislada (y otras cepas, por ejemplo, cepas de *L. gasseri*, con las características, por ejemplo, la capacidad para inducir los efectos mencionados anteriormente sobre la motilidad gastrointestinal y la señalización del dolor, de esta cepa depositada) también se dan a conocer en el presente documento y se pueden utilizar para tratar trastornos de la motilidad intestinal, particularmente aquellos en los que se desea reducir el tiempo de tránsito de material por el intestino. Por tanto, las afecciones preferidas para su tratamiento con esta cepa son el estreñimiento o cólicos. En el presente documento también se dan a conocer cepas, por ejemplo, cepas de *L. gasseri*, que pueden incrementar la motilidad gastrointestinal al tener la capacidad de incrementar cada una de la frecuencia de CMM, la velocidad de CMM y la presión intraluminal máxima, y que pueden disminuir la señalización del dolor, por ejemplo, al tener la capacidad de disminuir la activación de los nervios aferentes mesentéricos (por ejemplo, disminuyendo la frecuencia de activación de haces de nervios aferentes mesentéricos).

60 Como alternativa, si por ejemplo, el trastorno de la motilidad intestinal que se va a tratar es uno en el que se desea incrementar el tiempo de tránsito de material por el intestino (por ejemplo, trastornos que implican el tránsito de paso rápido), por ejemplo, el IBS o la diarrea, entonces en la etapa a) del método, actuará un agente de interés para disminuir la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, disminuyendo la frecuencia de CMM o la velocidad de CMM o la presión intraluminal, por ejemplo, la PPr. Los agentes preferidos disminuirán al menos la velocidad de CMM. Los agentes preferidos disminuirán dos o más de estos parámetros, por ejemplo, disminuirán la velocidad de CMM y la frecuencia de CMM, o disminuirán la frecuencia de CMM y la presión intraluminal (por ejemplo, la PPr), o disminuirán la velocidad de CMM y la presión intraluminal (por ejemplo, la PPr). Los agentes más preferidos disminuirán todos estos parámetros, por ejemplo, disminuirán la frecuencia de CMM, la velocidad de CMM y la presión intraluminal (por

ejemplo, la PPr). La etapa a) del método se puede evaluar en un segmento gastrointestinal apropiado del intestino delgado o grueso, por ejemplo, un segmento de yeyuno para el intestino delgado o un segmento de colon para el intestino grueso. En algunas realizaciones, se prefiere el uso de segmentos del intestino grueso, por ejemplo, de colon.

5 Para el tratamiento de tales trastornos, se seleccionará un agente que no afecta a o no incrementa la señalización del dolor, o preferiblemente actúa para disminuir señalización del dolor. En la etapa b) del método, tales agentes no ejercerán ningún efecto o actuarán preferiblemente para reducir o disminuir la activación de los nervios aferentes mesentéricos. Preferiblemente, dicho agente no ejercerá ningún efecto sobre o actuará preferiblemente para reducir las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos. La etapa b) del método se puede evaluar en un segmento gastrointestinal apropiado del intestino delgado o grueso, por ejemplo, un segmento de yeyuno para el intestino delgado o un segmento de colon para el intestino grueso. En algunas realizaciones, se prefiere el uso de segmentos del intestino delgado, por ejemplo, de yeyuno.

15 Utilizando el método de la presente invención, los inventores han seleccionado una nueva cepa, *Lactobacillus gasseri* 621A (LG621A), que se ha demostrado que disminuye la motilidad gastrointestinal que se ha demostrado que disminuye la velocidad de CMM y no ejerce ningún efecto sobre la frecuencia de CMM o la presión intraluminal máxima. También se ha demostrado que esta cepa disminuye la señalización del dolor disminuyendo la activación de los nervios aferentes mesentéricos (al disminuir la frecuencia de activación de haces de nervios aferentes mesentéricos). Esta cepa bacteriana aislada (y otras cepas, por ejemplo, cepas de *L. gasseri*, con las características, por ejemplo, la capacidad para inducir los efectos mencionados anteriormente sobre la motilidad gastrointestinal y la señalización del dolor, de esta cepa depositada) también se dan a conocer en el presente documento y se pueden utilizar para tratar trastornos de la motilidad intestinal, particularmente aquellos en los que se desea incrementar el tiempo de tránsito de material por el intestino (por ejemplo, trastornos que implican el tránsito de paso rápido). Por tanto, las afecciones preferidas para su tratamiento con esta cepa son el IBS o la diarrea. En el presente documento también se dan a conocer cepas, por ejemplo, cepas de *L. gasseri*, que pueden disminuir la motilidad gastrointestinal al tener la capacidad de disminuir una o más de la frecuencia de CMM, la velocidad de CMM y la presión intraluminal máxima (preferiblemente la velocidad de CMM), y que pueden disminuir la señalización del dolor, por ejemplo, al tener la capacidad de disminuir la activación de los nervios aferentes mesentéricos (por ejemplo, disminuyendo la frecuencia de activación de haces de nervios aferentes mesentéricos).

Es obvio a partir de lo anterior que los métodos de la invención también se pueden utilizar para seleccionar o identificar agentes que no son apropiados para el tratamiento de trastornos de la motilidad intestinal, por ejemplo, los agentes que no muestran ningún efecto sobre una o más, o dos o más, o las tres de la velocidad de CMM o la frecuencia de CMM o la presión intraluminal pueden que no sean adecuados para su uso en el tratamiento de trastornos de la motilidad intestinal, especialmente si tales agentes no ejercen ningún efecto beneficioso en la reducción de la señalización del dolor. En particular, es improbable que aquellos agentes que no muestran ningún efecto sobre ninguno de estos parámetros sean adecuados para el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal. Además, es improbable que aquellos agentes que ejercen el efecto de incrementar la señalización del dolor, tal como se mide por un aumento en la activación de los nervios aferentes mesentéricos en la etapa b) del método, sean adecuados para el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal.

Por tanto, en el presente documento también se da a conocer un agente, preferiblemente una cepa bacteriana, seleccionado mediante el método de la invención para su uso en terapia, más particularmente para su uso en el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal tal como aquellos descritos en el presente documento. Los trastornos de la motilidad intestinal apropiados para ser tratados se describen en otras partes en el presente documento. Los trastornos de la motilidad intestinal preferidos para ser tratados mediante los agentes o cepas bacterianas que se dan a conocer en el presente documento son aquellos en los que se desea reducir el tiempo de tránsito de material por el intestino, por ejemplo, cólicos, la regurgitación o el estreñimiento. Otros trastornos de la motilidad intestinal preferidos con aquellos en los que se desea incrementar el tiempo de tránsito de material por el intestino, por ejemplo, el IBS o la diarrea.

En el presente documento también se dan a conocer métodos de tratamiento de un sujeto con un trastorno de la motilidad intestinal, comprendiendo dichos métodos la administración de un agente, preferiblemente una cepa bacteriana, seleccionado mediante el método de la invención, a dicho sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicho trastorno de la motilidad intestinal.

En el presente documento también se dan a conocer métodos de tratamiento de un sujeto con un trastorno de la motilidad intestinal, comprendiendo dichos métodos la administración de una cepa bacteriana que se da a conocer en el presente documento a dicho sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicho trastorno de la motilidad intestinal. Las cepas preferidas son LG345A o LG621A para el tratamiento de trastornos de la motilidad intestinal tal como se describe en otras partes en el presente documento.

Los trastornos de la motilidad intestinal preferidos y otras características preferidas son tal como se describen en otras partes en el presente documento.

En el presente documento también se da a conocer el uso de un agente, preferiblemente una cepa bacteriana, seleccionado mediante el método de la invención, en la fabricación de una composición o un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal.

5 En el presente documento también se da a conocer el uso de una cepa bacteriana que se da a conocer en el presente documento, en la fabricación de una composición o un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal. Las cepas preferidas son LG345A o LG621A para el tratamiento de trastornos de la motilidad intestinal tal como se describe en otras partes en el presente documento.

10 Los trastornos de la motilidad intestinal preferidos y otras características preferidas son tal como se describen en otras partes en el presente documento.

15 En los métodos de la presente invención descritos en el presente documento, los términos “incrementar”, “disminuir”, “reducir”, etc., se refieren a un cambio medible en niveles, preferiblemente un cambio significativo en niveles, más preferiblemente un cambio estadísticamente significativo, preferiblemente con un valor de probabilidad de  $\leq 0,05$ .

20 Los sujetos preferidos para el tratamiento utilizando los métodos que se dan a conocer en el presente documento son mamíferos, más preferiblemente seres humanos. Cuando el trastorno de la motilidad intestinal que se va a tratar es el estreñimiento, entonces los sujetos preferidos son pacientes ancianos o embarazadas. Un paciente anciano se entenderá generalmente como un paciente con una edad de 70 años o mayor. Cuando el trastorno de la motilidad intestinal que se va a tratar son cólicos, preferiblemente son cólicos del lactante.

25 En el presente documento también se da a conocer un producto que comprende los agentes o cepas que se dan a conocer en el presente documento (por ejemplo, agentes o cepas seleccionados mediante los métodos de la invención) para los usos terapéuticos tal como se define en otras partes en el presente documento, en el que dicho uso comprende además la administración de al menos un agente terapéutico o nutricional adicional. En tales ejemplos, el agente terapéutico adicional puede ser cualquier agente adicional que sea útil en el tratamiento del trastorno de la motilidad intestinal en cuestión. El agente nutricional adicional puede ser cualquier componente nutricional apropiado, por ejemplo, un alimento o suplemento alimenticio.

30 Dichos agentes adicionales se pueden administrar junto con el agente o cepa seleccionado mediante los métodos de la invención (por ejemplo, como una composición) o se pueden administrar por separado. Además, dichos agentes adicionales se pueden administrar a la vez que el agente o cepas que se dan a conocer en el presente documento o en diferentes puntos temporales. Un experto puede determinar fácilmente los regímenes y los momentos adecuados de administración dependiendo del agente adicional en cuestión.

35 En el presente documento también se da a conocer a composición que comprende:

40 (i) un agente, preferiblemente una cepa bacteriana, obtenible mediante el método de selección de la invención, o una cepa bacteriana tal como se define de otro modo en el presente documento; y

45 (ii) al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, un alimento o suplemento alimenticio, o un agente terapéutico o nutricional adicional. Por tanto, dichas composiciones se pueden formular como composiciones farmacéuticas o como composiciones nutricionales, por ejemplo, como un producto alimenticio.

50 Los usos terapéuticos de los agentes, cepas y composiciones tal como se da a conocer en el presente documento incluyen la reducción, prevención o mitigación del trastorno o síntomas del trastorno relevantes (por ejemplo, pueden dar como resultado la modulación de síntomas de la enfermedad). Tal reducción, prevención o mitigación de un trastorno o sus síntomas se pueden medir mediante un ensayo apropiado. Preferiblemente la reducción o mitigación de un trastorno o síntomas es estadísticamente significativa, preferiblemente con un valor de probabilidad de  $< 0,05$ . Tal reducción o mitigación de un trastorno o síntomas se determinan generalmente por comparación con un individuo o población de control, por ejemplo, un sujeto sano o un sujeto sin tratar o tratado con placebo.

55 Un modo apropiado de administración y formulación de los agentes, cepas, composiciones, etc., se elige dependiendo del lugar en que se encuentre la enfermedad. Un modo de administración preferido es el oral, sin embargo, igualmente para otros tratamientos será apropiada la inyección intravenosa o intramuscular.

60 Un experto puede elegir o determinar fácilmente las dosis apropiadas de los agentes, cepas y composiciones tal como se define en el presente documento, dependiendo del trastorno que se va a tratar, el modo de administración y la formulación en cuestión.

65 Tal como se ha descrito anteriormente, utilizando la invención del presente documento los inventores han obtenido dos nuevas cepas, *Lactobacillus gasseri* 345A y *Lactobacillus gasseri* 621A. Estas cepas se han depositado en DSMZ (Leibniz Institute DSMZ – Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 18 de abril de 2013 y se les han designado los números DSM 27123 y DSM

27126, respectivamente.

El método de la invención se basó en el descubrimiento por parte de los inventores en el presente documento de que los efectos de un agente que afecta a trastornos de la motilidad son en la mayoría de los casos multifactoriales y son diferentes en diferentes partes del tubo GI y, por consiguiente, han de ser estudiados de ese modo para encontrar el mejor agente para el trastorno específico.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención encontrar agentes adecuados para el tratamiento, la prevención o la modulación de trastornos específicos de la motilidad, utilizando el modelo del presente documento.

En una realización de la invención, el objetivo es seleccionar un compuesto u otro agente, con usos potenciales ya sea como compuesto nutricional o fármaco, que sea eficaz en la prevención de o para tratar el estreñimiento en los seres humanos, especialmente ancianos.

En una realización de la invención, el objetivo es seleccionar una cepa bacteriana probiótica que puede ser eficaz en la prevención o el tratamiento del estreñimiento en los seres humanos, especialmente sujetos ancianos o embarazadas.

En otra realización, el objetivo de la invención es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa probiótica, que puede ser eficaz en la prevención o el tratamiento de los cólicos del lactante.

En otra realización, el objetivo de la invención es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa probiótica, que puede ser eficaz en la prevención o el tratamiento de la diarrea u otros trastornos de la motilidad en los que es beneficioso disminuir la velocidad e incrementar de ese modo el tiempo de tránsito.

En una realización de la invención, el objetivo es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa probiótica, que puede ser eficaz en el tratamiento o la modulación de síntomas del síndrome del intestino irritable (IBS). Un agente de este tipo se selecciona para incrementar el tiempo de tránsito, preferiblemente sin provocar ningún dolor y preferiblemente para reducir el dolor.

En aún otra realización, el objetivo de la invención es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa probiótica, que puede ser eficaz en la prevención de la incontinencia fecal.

En aún otra realización, el objetivo de la invención es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa probiótica, que puede ser eficaz para incrementar la mezcla en el intestino delgado y grueso sin provocar ningún dolor y preferiblemente reduciendo el dolor, para facilitar o dar como resultado una mejor capacidad nutricional en un sujeto, especialmente en ancianos.

Los siguientes son algunos ejemplos de la invención, que no se pretende que sean limitativos del uso de la invención en el presente documento sino para mostrar en detalle ejemplos prácticos sobre cómo se puede utilizar la invención. El ejemplo 1 se refiere a la descripción del plugin de software de mapeo espaciotemporal (StMap), y el ejemplo 2 se refiere a las etapas de la selección de agentes eficaces, y el ejemplo 3 a una selección de agentes para un trastorno de la motilidad específico.

#### EJEMPLO 1

Descripción del plugin StMap para el software ImageJ de NIH;

ImageJ es un programa Java de procesamiento de imágenes de dominio público inspirado por el Image de NIH para el Macintosh. Funciona, ya sea como una applet en línea o como una aplicación descargable, en cualquier ordenador con de Java 1.4 o una máquina virtual posterior. Hay disponibles distribuciones descargables para Windows, Mac OS, Mac OS X y Linux.

ImageJ se diseñó con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad a través de plugins de Java. Se pueden desarrollar plugins de adquisición, análisis y procesamiento personalizados utilizando el editor de ImageJ y el compilador de Java integrados. Los plugins escritos por el usuario permiten resolver prácticamente cualquier problema de procesamiento o análisis de imágenes.

Los inventores han desarrollado el plugin siguiendo la descripción del software disponible en (<http://rsbweb.nih.gov>) (National Institutes of Health (NIH), 9000 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, EE. UU.) según los detalles de la figura 6. RDI significa "Región de Interés".

#### EJEMPLO 2

Selección de agentes eficaces en trastornos de la motilidad.

Esta selección comprende un método de dos etapas. La primera etapa utiliza una grabación simultánea de cambios en la presión intraluminal además de grabación en video y mapas espaciotemporales. La segunda etapa es un análisis de la señalización de nervios.

- 5 Todos los agentes se comparan con un control y los agentes no se comparan entre sí, esto dará como resultado un gráfico por agente sometido a prueba.

*Primera etapa, análisis espaciotemporal*

- 10 Se utilizaron ratones Swiss-Webster (20-30 g) adquiridos en Charles River Laboratories (Wilmington, MA, EE. UU.). Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, de acuerdo con las directrices de McMaster para el uso y el cuidado de animales. Todos los procedimientos subsiguientes fueron *ex vivo*.

*Grabaciones de motilidad en un baño de órganos*

- 15 Se extirparon segmentos con una longitud de 4 cm de yeyuno o colon distal y se dejó que los contenidos se vaciaran irrigando el segmento con disolución salina de Krebs con una carga de presión por gravedad de 2 hPa. Cada segmento se montó en una cámara de baño de órganos de 20 ml y se sumergió en Krebs oxigenado (figura 1A). Se insertó una cánula en los extremos oral y anal, y la luz se perfundió por gravedad con Krebs gasificada (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) utilizando varios frascos de Mariotte. El compartimento intraluminal se perfundió a 0,5 ml/min con tampón a temperatura ambiente (de 19 a 22°C). La cámara de órganos (compartimento serosal) se perfundió con disolución de Krebs precalentada (34°C), gasificada con carbógeno, en una velocidad de 5 ml/min). El tampón de Krebs oxigenado tenía la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 4,8, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0, MgSO<sub>4</sub> 1,2, glucosa 11,1 y CaCl<sub>2</sub> 2,5 burbujeada con carbógeno gaseoso (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>). Al principio del experimento, se ajustó la presión intraluminal a 3 hPa y las grabaciones se realizaron a esta presión de llenado. Se aplicaron bacterias intercambiando el flujo de entrada luminal oral de frascos de Mariotte que contenían Krebs a unos que contenían Krebs más bacterias cerrando y abriendo las llaves de paso apropiadas, tal como se ilustra en la figura 1A. Se midieron los cambios en la presión intraluminal en el punto medio del eje longitudinal del segmento intestinal. La señal de presión se amplificó, digitalizó y almacenó en un ordenador personal y se analizaron sin conexión a Internet utilizando el software PClamp 9 (Molecular Devices, Sunny Vale, CA, EE. UU.).

- 35 Se grabaron imágenes utilizando una videocámara (videocámara de disco duro Everio de JVC, modelo GZ-MG155U) que se colocó 10 cm por encima de un segmento intestinal (figura 1A). La grabación comenzó en sincronía con la grabación de presión utilizando un campo de visión de 8 a 12 cm durante el tiempo que duró el experimento. La salida de la cámara estaba en formato de video en bruto (MOD) produciendo 30 fotogramas por segundo (fps). Se extrajeron clips de video con una duración de 10 min del archivo MOD utilizando el software de edición de video (Avidemux, versión 2.5.0, software de código abierto disponible en [www.avidemux.org](http://www.avidemux.org)). Los clips se convirtieron entonces al formato MOV utilizando un conversor de video (conversor Zune, versión 1.1, software de código abierto disponible en <http://ffmpeg.mplayerhq.hu>). Los clips de video finales se remuestrearon con una resolución de 384 x 256 píxeles y 25 fps. Las grabaciones en video se analizaron utilizando el software de procesamiento de imágenes interno (StMap, véase el ejemplo 1) desarrollado como un plugin para ImageJ de NIH (versión 1.43c, software de código abierto disponible en <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). El software convierte la imagen (1B) en cada fotograma del video en una silueta en blanco y negro (1C) y genera un mapa espaciotemporal utilizando una rutina de detección de bordes. La rutina mide primero el diámetro en cada posición a lo largo del intestino y entonces representa el diámetro físico en cada posición como un valor de tono (varía de 0-255, de negro a blanco). Como el diámetro del intestino disminuye durante las contracciones, el valor de tono se reduce hacia 0 y se mostrará como hacia los valores más oscuros. A medida que el software realiza lecturas a lo largo de cada clip de 10 minutos, genera un mapa espaciotemporal – un patrón de bandas alternantes de tonos claros y oscuros que contiene 3 clases de información: posición a lo largo del intestino (ordenada), tiempo (abscisa) y diámetro del intestino (cota o eje z) (figura 1D). Utilizando estas variables, el mapa espaciotemporal se convierte en una “huella dactilar” de motilidad cuya sensibilidad es de crítica importancia a la hora de definir los efectos detallados y matizados que cepas probióticas específicas y otros agentes ejercen sobre la motilidad, y la capacidad de distinguirlos.

- 55 Debido a que StMap mide los cambios de diámetro en cada posición, StMap se puede interpretar como una acumulación de numerosos gráficos de diámetros en 2D frente al tiempo. De hecho, para el mapa, si se identificase la localización del transductor de presión (línea de puntos en la figura 2A) y se mostrase como un gráfico en escala de grises frente al tiempo (figura 2B), este gráfico estaría en concordancia con la grabación de la presión grabada simultáneamente frente al tiempo en ese lugar (figura 2C).

- 60 Los parámetros de motilidad se midieron directamente a partir del mapa espaciotemporal utilizando el plugin StMap. En este sistema se pudo comprobar (utilizando el silenciador de neuronas tetrodotóxica) si las contracciones dependen del sistema nervioso entérico o son miogénicas (dirigidas por contracciones musculares rítmicas pero independientes de las neuronas). Los complejos motores migratorios CM generados neuralmente, que se propagan analmente generaron bandas oscuras anchas que se inclinan diagonalmente de izquierda a derecha; la velocidad de propagación (mm s<sup>-1</sup>) se mide a partir de la(s) pendiente(s) de cada banda (figura 3). Para cada tratamiento, se

calculó el promedio de pendientes de 3-5 CM sucesivos para calcular la velocidad de propagación. La frecuencia de CM (mHz) se determinó contando el número de bandas oscuras de CM durante un segmento de 10 min. La amplitud de CM se midió directamente desde el diámetro (figura 2B) o presión (figura 2C) inicial hasta el siguiente pico, calculando el promedio de 3 valores para cada tratamiento. La tasa de cambio de diámetro (cm/s) se calculó a partir del tiempo necesario para que el diámetro se estrechara lo máximo posible respecto a la situación inicial (retroceso de CM en la (figura 2B).

#### *Agentes que se van a someter a prueba*

En la primera etapa de los métodos de la invención, se sometieron a prueba *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1), *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, *Lactobacillus gasseri* 345A (DSM 27123), *Lactobacillus gasseri* 621A (DSM 27126), *Lactobacillus gasseri* T1 y *Lactobacillus gasseri* T2.

Se determinaron los números de células ópticamente y la viabilidad se comprobó siempre por la capacidad de crecer después de la siembra en placas de agar de medio de crecimiento. Se descongelaron células de reservas congeladas y se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min, y el sedimento se suspendió en el mismo volumen de tampón de Krebs. Entonces, la suspensión se centrifugó de nuevo, y las células se retiraron y resuspendieron en Krebs en la concentración original. Justo antes de su uso, las bacterias se diluyeron hasta concentraciones de trabajo con tampón de Krebs nuevo.

El Krebs que contenía bacterias se introdujo en el compartimento intraluminal mientras se añadían fármacos moduladores de canales iónicos al tampón de Krebs perfundiendo el compartimento serosal. El tiempo requerido para que la disolución de los fármacos fluyera desde la llave hasta la cámara de grabación fue de 30 s. El bloqueador de canales iónicos  $IK_{Ca}$  1-[(2-clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazol (TRAM- 34) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EE. UU.) se disolvió con sulfóxido de dimetilo (DMSO) puro para preparar disoluciones madre de 10 mM, y éstas se diluyeron en Krebs oxigenado para preparar concentraciones de trabajo 30 min antes de su uso. El agente abridor de canales  $IK_{Ca}$ , 5,6-dicloro-1-etil-2-bencimidazolinona (DCEBIO) (Tocris) se disolvió en DMSO para preparar una disolución madre de 10 mM; la concentración de trabajo final en tampón de Krebs fue de 0,1 o 1  $\mu$ M.

Los agentes se analizaron según la etapa 1 presentada anteriormente y los resultados se muestran en la Figura 7.

#### *Datos estadísticos*

Los datos estadísticos se calcularon utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos estadísticos descriptivos se proporcionan como medias  $\pm$  SD, pero en representaciones gráficas de concentración-respuesta, los errores de muestreo se indican utilizando SEM; el tamaño de la muestra se denota por  $n$ . La diferencia discernible desde un punto de vista estadístico para pruebas de significancia se fijó en  $P = 0,05$ ; todas las pruebas fueron bilaterales.

#### *Segunda etapa, el análisis de la señalización de nervios*

Todos los procedimientos se ajustaron a las directrices sobre el cuidado de animales del Consejo Canadiense y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad McMaster (Permiso #08-08- 35).

#### *Grabaciones extracelulares*

Se adquirieron ratones Swiss-Webster adultos macho (20-30 g) en Charles River Laboratories (Wilmington, MA, EE. UU.). Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Todos los procedimientos subsiguientes fueron *ex vivo*. Se extrajeron segmentos de yeyuno distal extirpado (~2.5 cm) con tejido mesentérico adherido de ratones sacrificados (figura 4) y se colocaron inmediatamente en una placa de Petri de grabación recubierta con Silgard llena de tampón de Krebs de la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 4,8, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0, MgSO<sub>4</sub> 1,2, glucosa 11,1 y CaCl<sub>2</sub> 2,5 burbujeado con carbógeno (95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub>). Se insertó una cánula en los extremos oral y anal del segmento intestinal con tubos de plástico y se vaciaron cuidadosamente utilizando una jeringa acoplada llena de tampón de Krebs oxigenado; entonces, el segmento y el tejido mesentérico se fijaron y se aisló el haz de nervios mesentéricos mediante disección cuidadosa bajo un estereomicroscopio (figura 5) tal como se describe en Barbara *et al.* (Gastroenterology, tomo 132, edición 1, páginas 26-37, enero de 2007). El preparado se transfirió a un microscopio invertido y la luz se perfundió por gravedad a 0,5-1ml/min con Krebs oxigenado a temperatura ambiente (~22°C) y/o aditivos utilizando varios frascos de Mariotte. El compartimento serosal se perfundió por separado con disolución de Krebs calentada previamente (34°C) a 3-5 ml/min. El haz de nervios se extrajo cuidadosamente mediante succión al interior de una pipeta de vidrio acoplada a un soporte de electrodo de pinzamiento zonal (CV-7B; Molecular Devices, Sunnyvale, California, EE. UU.) y se realizaron grabaciones de nervios extracelulares utilizando un amplificador Multi-Clamp 700B y el convertido de señales Digidata 1440A (Molecular Devices). Se filtraron las señales eléctricas según el paso de banda a 0,1-2 kHz, se muestrearon a 20 kHz y se almacenaron en un ordenador personal con el software pClamp 10 (Molecular Devices) para el análisis a posteriori.

*Vagotomía*

Para algunos experimentos, se llevó a cabo una vagotomía subdiafragmática tal como se ha descrito previamente (van der Kleij H., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:1131-1137, 2008)). Se dejó que los animales se recuperaran durante 10-14 días antes de extraer el yeyuno y tejido mesentérico para experimentos electrofisiológicos. Se realizó una vagotomía de simulación en 3 animales. Posoperatoriamente, se midió el peso corporal y la salud general de los ratones a diario. No se encontraron evidencias de diferencias significativas en ganancia de peso 1 semana después de la operación en los animales sometidos a vagotomía ni en los tratados por simulación. Todos los ratones sometidos a vagotomía se sometieron a prueba para comprobar la exhaustividad del procedimiento mediante la grabación, posterior a cada experimento, de las respuestas a la aplicación serosal de colecistocinina (CCK).

Se consideró que la vagotomía había sido eficaz cuando se comprobó que la CCK no incrementaba la tasa de activación de nervios mesentéricos.

*Integridad de los segmentos de yeyuno*

Para someter a prueba la integridad de los segmentos de yeyuno con respecto a la translocación de bacterias a lo largo del epitelio durante un experimento, se marcaron JB-1 con éster succinimidílico de 5-(6)-carboxifluoresceína (CFSE), colocándolas en esta concentración de  $10^9$ /ml de Krebs en la luz y tras incubación durante 75 min, se fijó el tejido en paraformaldehído, y se examinaron secciones para determinar su presencia por debajo del epitelio en microscopía confocal (microscopía de láser dual, LSM 510, Carl Zeiss, Alemania). Se lavaron las JB-1 dos veces en PBS y se suspendieron en una concentración final de CFSE de  $5\mu\text{M}$  en PBS suplementado con suero fetal bovino al 5% y se incubaron durante 25 min a  $37^\circ\text{C}$ . Los tejidos ( $n=3$ ) se fijaron en paraformaldehído al 4% a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche, entonces se lavaron 3 veces en PBS durante 10 min cada vez, se seccionaron en secciones de 10 y  $30\mu\text{m}$ , y las secciones transversales se transfirieron a portaobjetos de microscopio y se montaron. Entonces, estas se revisaron en cortes ópticos mediante la metodología de apilamiento Z.

*Agentes que se van a someter a prueba*

En la segunda etapa de los métodos de la presente invención, se sometieron a prueba *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1), *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, *Lactobacillus gasseri* 345A (DSM 27123), *Lactobacillus gasseri* 621A (DSM 27126), *Lactobacillus gasseri* T1 y *Lactobacillus gasseri* T2.

Se determinaron los números de células ópticamente y la viabilidad se comprobó siempre por la capacidad de crecer después de la siembra en placas de agar de medio de crecimiento. Se hicieron crecer *L. rhamnosus* vivas a partir de alícuotas de 1 ml congeladas ( $-80^\circ\text{C}$ ), que consistían en  $5 \times 10^9$  células en caldo de Man-Rogosa Sharpe (Difco Laboratories, Sparks, MD, EE. UU.). Se descongelaron células de reservas congeladas y se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min, y el sedimento se suspendió en el mismo volumen de tampón de Krebs. Entonces, la suspensión se centrifugó de nuevo, y las células se retiraron y resuspendieron en Krebs en la concentración original. Justo antes de su uso, las bacterias se diluyeron hasta concentraciones de trabajo con tampón de Krebs. Para algunos experimentos, las bacterias se diluyeron directamente hasta concentraciones de trabajo tras descongelar (en caldo); las bacterias siempre se aplicaron en la luz del segmento de yeyuno. Se disolvió colecistocinina (25-33) sulfatada (CCK; AnaSpec, Fremont, CA) en DMSO para preparar una disolución madre 1 mM. Las alícuotas se diluyeron el día del experimento hasta la concentración de trabajo en tampón de Krebs, con unas concentraciones finales en DMSO  $\leq 0,0001\%$ .

*Análisis de datos sin conexión a Internet*

Se midieron frecuencias de activación espontánea multi- y monounitaria de haces de nervios aferentes mesentéricos utilizando Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Ambos métodos (análisis de forma de onda y descarga de disparos multiunitarios) de medición se utilizan de manera rutinaria para determinar cambios en la excitabilidad de las fibras de nervios mesentéricos inducidos por diferentes tratamientos. El momento en el que se produjeron los disparos multiunitarios se determinó utilizando el módulo de detección de picos de Clampfit, y la frecuencia promedio se calculó a partir de intervalos de disparos. La actividad monounitaria se aisló de la actividad multiunitaria utilizando la herramienta para la detección modelo automática de forma de disparo de Clampfit (análisis de forma de onda computarizado). Tras la detección modelo, la discriminación se comprobó siempre mediante inspección visual y se descartaron los eventos que no tenían forma de disparo visualmente ( $<0,2\%$ ). Los resultados se presentan en la figura 8.

*Datos estadísticos*

Los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM con  $n$  refiriéndose al número total de segmentos de yeyuno grabados; el número máximo de segmentos grabados para el mismo animal era de dos. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparaciones de datos emparejados y se realizaron la prueba de Friedman con la prueba de Dunn a posteriori para el análisis de varianza de medidas repetidas utilizando el software Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San

Diego, CA). Debido a que puede haber grandes variaciones en la actividad espontánea entre un preparado y otro en la actividad neural multiunitaria, todas las comparaciones se emparejaron con grabaciones de antes y después del tratamiento realizadas cuando cada haz de nervios servía como su propio control. Las diferencias se consideraron significativas si  $P \leq 0,05$ .

**EJEMPLO 3**

A. Selección de agentes probióticos óptimos para ayudar a tratar trastornos de la motilidad (por ejemplo, el estreñimiento en los ancianos) utilizando las etapas definidas de la presente invención:

Se analizan *L. rhamnosus* (JB-1), *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, *Lactobacillus gasseri* 345A (DSM 27123), *Lactobacillus gasseri* 621A (DSM 27126), *Lactobacillus gasseri* T1 y *Lactobacillus gasseri* T2 según el ejemplo 2. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Agente	Motilidad		Señalización del dolor
	Yeyuno	Colon	
JB-1	Frecuencia de CMM	↓	↑
	Velocidad de CMM	↑	
	PPr	↓	
DSM 17938	Frecuencia de CMM	↓	↓
	Velocidad de CMM	↓	
	PPr	o	
ATCC PTA 6475	Frecuencia de CMM	-	o
	Velocidad de CMM	-	
	PPr	-	
LG345A	Frecuencia de CMM	-	↓
	Velocidad de CMM	-	
	PPr	-	
LG621A	Frecuencia de CMM	-	↓
	Velocidad de CMM	-	
	PPr	-	
T1	Frecuencia de CMM	-	o
	Velocidad de CMM	-	
	PPr	-	
T2	Frecuencia de CMM	-	o
	Velocidad de CMM	-	
	PPr	-	

Tabla 1

*L. reuteri* DSM 17938 y *L. gasseri* 345A incrementan la velocidad de CMM en el colon y también incrementa al menos uno de los parámetros PPr o frecuencia de CMM en el colon (*L. reuteri* DSM 17938 incrementa la frecuencia de CMM y *L. gasseri* 345A incrementa la PPr). Ambas de estas cepas disminuyen la frecuencia de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos. Por tanto, estas cepas se seleccionan para el tratamiento de cólicos, por ejemplo, cólicos del lactante, ya que estas cepas incrementan la velocidad del flujo de propagación de CM y al mismo tiempo disminuyen la frecuencia de activación de haces de nervios aferentes mesentéricos.

El aumento de la velocidad de CMM y la disminución de la frecuencia de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos provocados por *L. reuteri* DSM 17938 y *L. gasseri* 345A hacen que sean adecuadas para el tratamiento del estreñimiento, especialmente en embarazadas en las que se desea una reducción o en los ancianos.

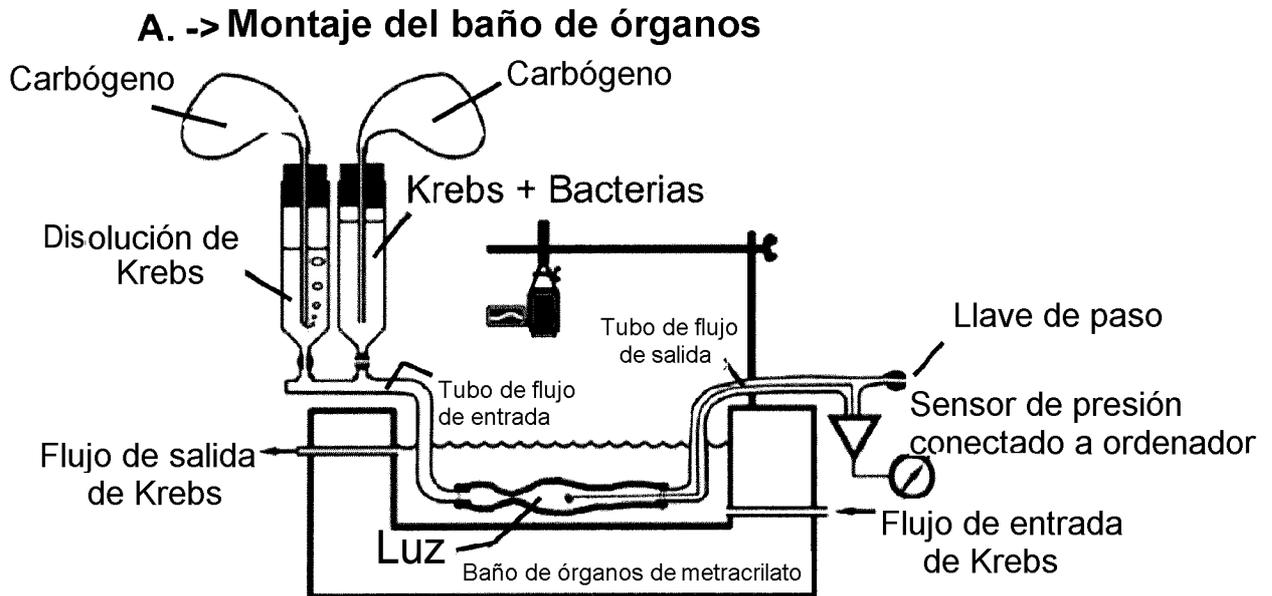
*L. rhamnosus* JB-1 y *L. gasseri* 621 disminuyen la velocidad de CMM. *L. gasseri* 621A también disminuye la frecuencia de la activación de haces de nervios aferentes mesentéricos y se puede utilizar, por tanto, para tratar trastornos que implican un tránsito de paso rápido, por ejemplo, el SII. *L. rhamnosus* JB-1 no ejerce ningún efecto sobre la frecuencia de activación de haces de nervios aferentes mesentéricos y, por tanto, no es aplicable para el tratamiento de trastornos de la motilidad.

*L. reuteri* ATCC PTA 6475, *L. gasseri* T1 y *L. gasseri* T2 no muestran ningún efecto sobre la velocidad de CMM ni sobre la frecuencia de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos y, por tanto, no se recomiendan para su uso en trastornos de la motilidad.

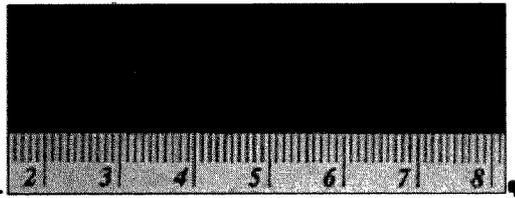
**REIVINDICACIONES**

1. Método para la selección de un agente eficaz para el tratamiento de un trastorno de la motilidad intestinal, en el que dicho método comprende:
  - a) una etapa de mapeo espaciotemporal (ST) llevada a cabo en un segmento gastrointestinal para analizar el efecto de dicho agente sobre la motilidad gastrointestinal; y
  - b) una etapa de grabación de haces de nervios *ex vivo* llevada a cabo en un segmento gastrointestinal para analizar el efecto de dicho agente sobre la activación de los nervios aferentes mesentéricos.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el mapeo ST en la etapa a) se lleva a cabo mediante la obtención de imágenes en video; y/o en el que la etapa a) comprende utilizar un mapa ST para medir la frecuencia de complejo motor migratorio (CMM) y/o la velocidad de complejo motor migratorio (CMM) en dicho segmento gastrointestinal.
3. Método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la etapa a) comprende además la medición de la presión intraluminal, preferiblemente en el que dicha medición de la presión intraluminal es la presión intraluminal máxima (PPr).
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa b) comprende medir las frecuencias de activación espontánea de haces de nervios aferentes mesentéricos.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho segmento gastrointestinal es un segmento *ex vivo* de yeyuno o colon; y/o en el que dicho segmento gastrointestinal es de un ratón.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las etapas a) y b) se llevan a cabo antes y después de la aplicación intraluminal del agente.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho agente es una célula entera, un microorganismo, una proteína, un péptido, una enzima, u otro material biológico o químico, preferiblemente en el que dicho agente es un microorganismo, más preferiblemente una cepa bacteriana.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el trastorno de la motilidad intestinal es uno en el que se desea reducir el tiempo de tránsito de material por el tubo gastrointestinal y en el que en la etapa a) dicho agente muestra capacidad para incrementar la motilidad gastrointestinal y en la etapa b) dicho agente muestra capacidad para disminuir la activación de los nervios aferentes mesentéricos, preferiblemente en el que en la etapa a) dicho agente muestra capacidad para incrementar la frecuencia de CMM o incrementar la velocidad de CMM o incrementar la presión intraluminal y en la etapa b) dicho agente muestra capacidad para disminuir la señalización del dolor.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho agente es una cepa bacteriana y dicha cepa es LG345A, que tiene el número de registro DSM 27123.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el trastorno de la motilidad intestinal es uno en el que se desea incrementar el tiempo de tránsito de material por el tubo gastrointestinal y en el que en la etapa a) dicho agente muestra capacidad para disminuir la motilidad gastrointestinal y en la etapa b) dicho agente muestra capacidad para disminuir la activación de los nervios aferentes mesentéricos, preferiblemente en el que en la etapa a) dicho agente muestra capacidad para disminuir la frecuencia de CMM o disminuir la velocidad de CMM o disminuir la presión intraluminal y en la etapa b) dicho agente muestra capacidad para disminuir la señalización del dolor.
11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho agente es una cepa bacteriana y dicha cepa es LG62 1A, que tiene el número de registro DSM 27126.

Figura 1



**B. -> Adquisición de imágenes**



**C. -> Conversión a ByN para la detección de bordes**



**D. -> Generación de mapa espaciotemporal**

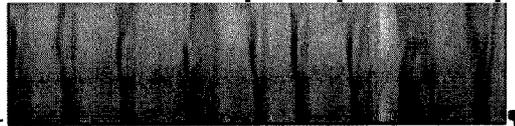


Figura 2

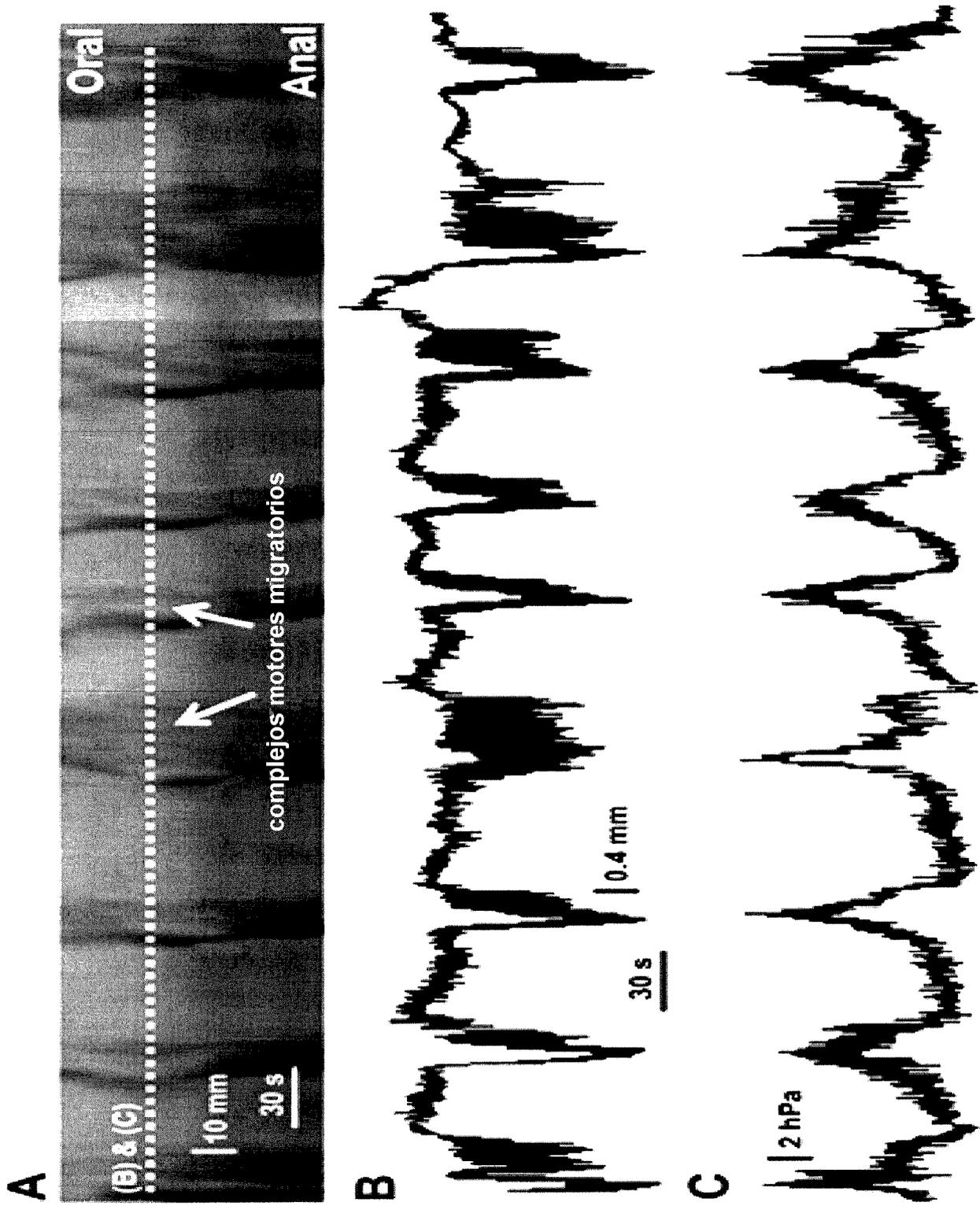


Figura 3

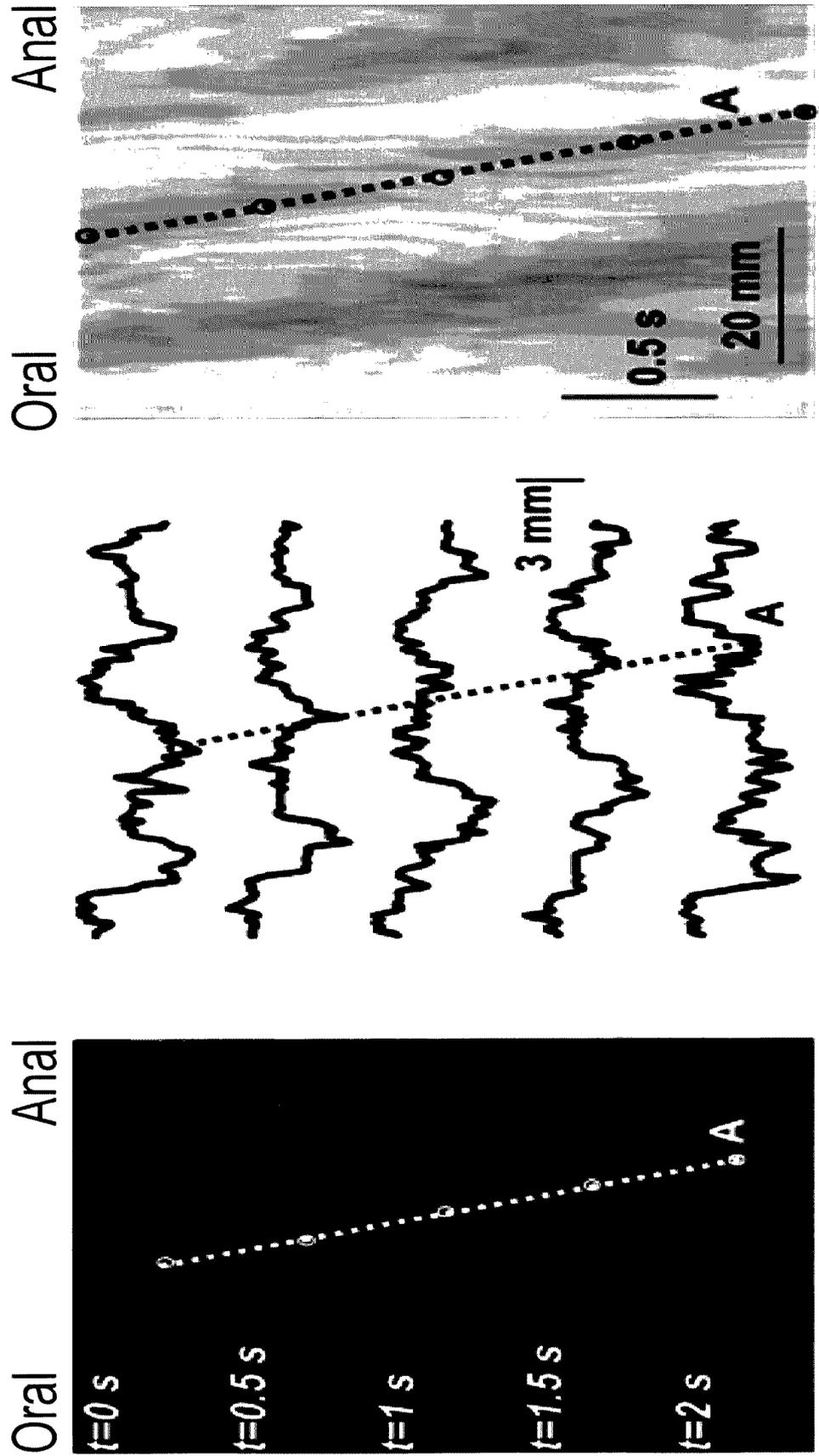


Figura 4

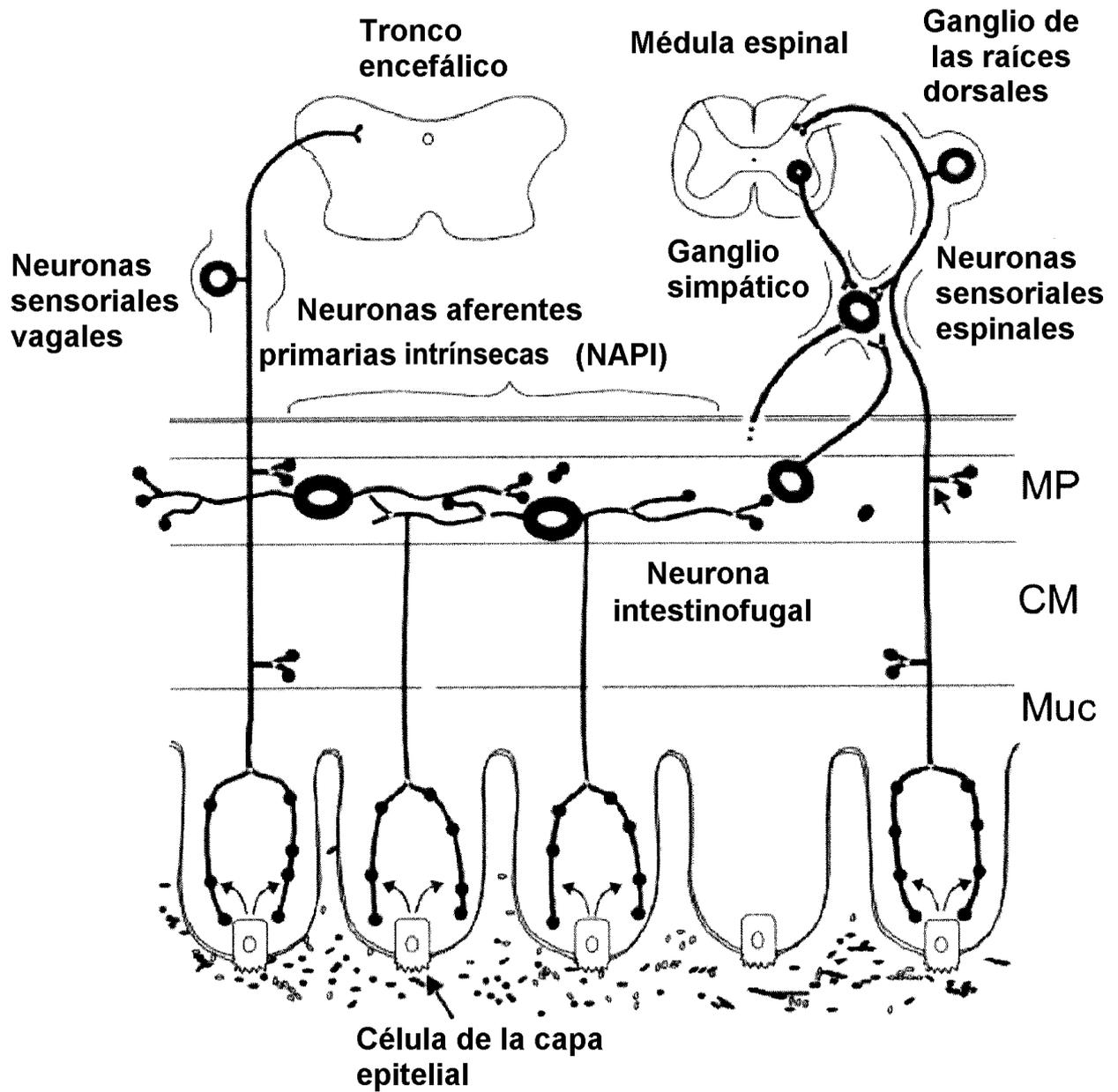


Figura 5

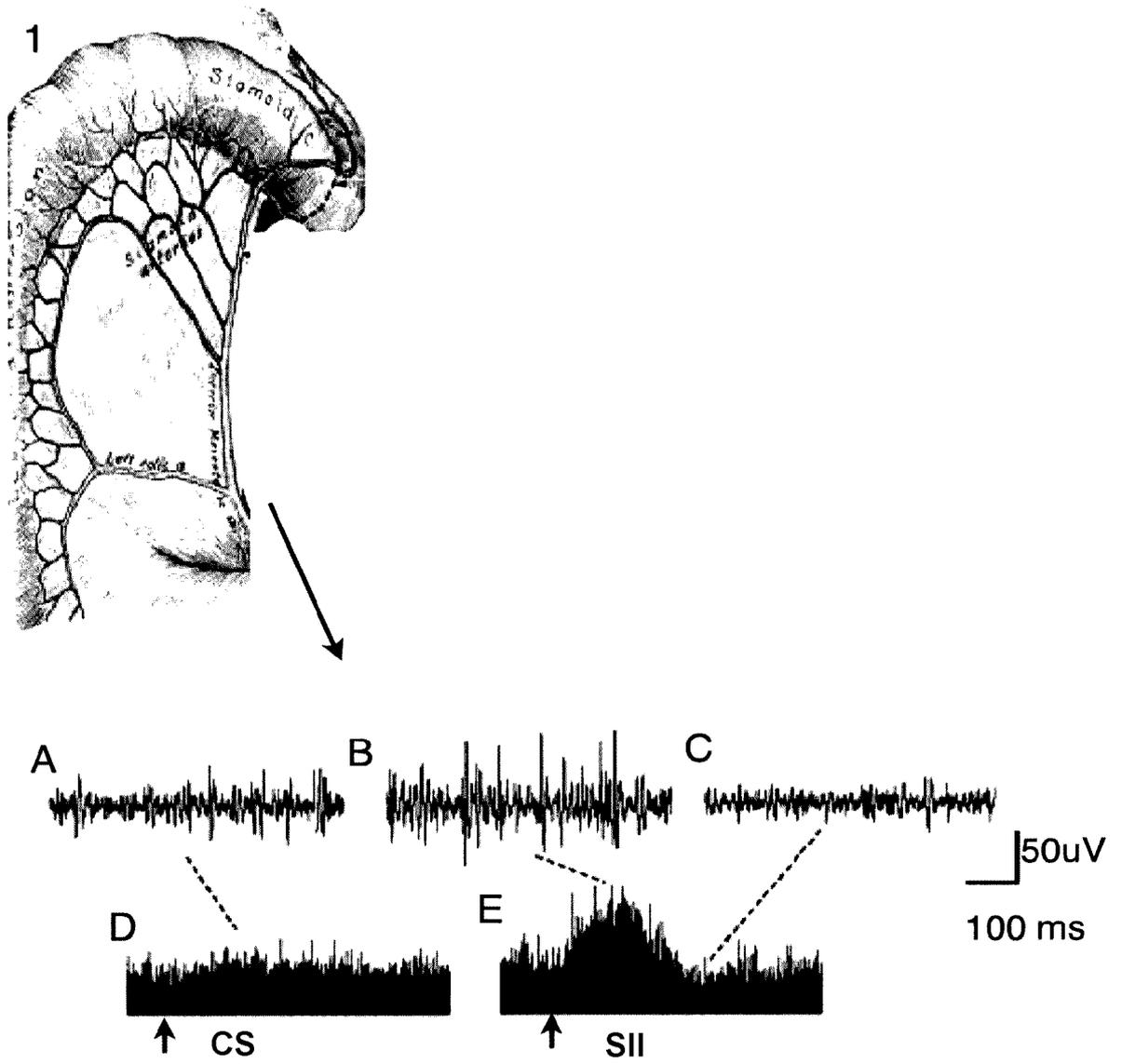


Figura 6

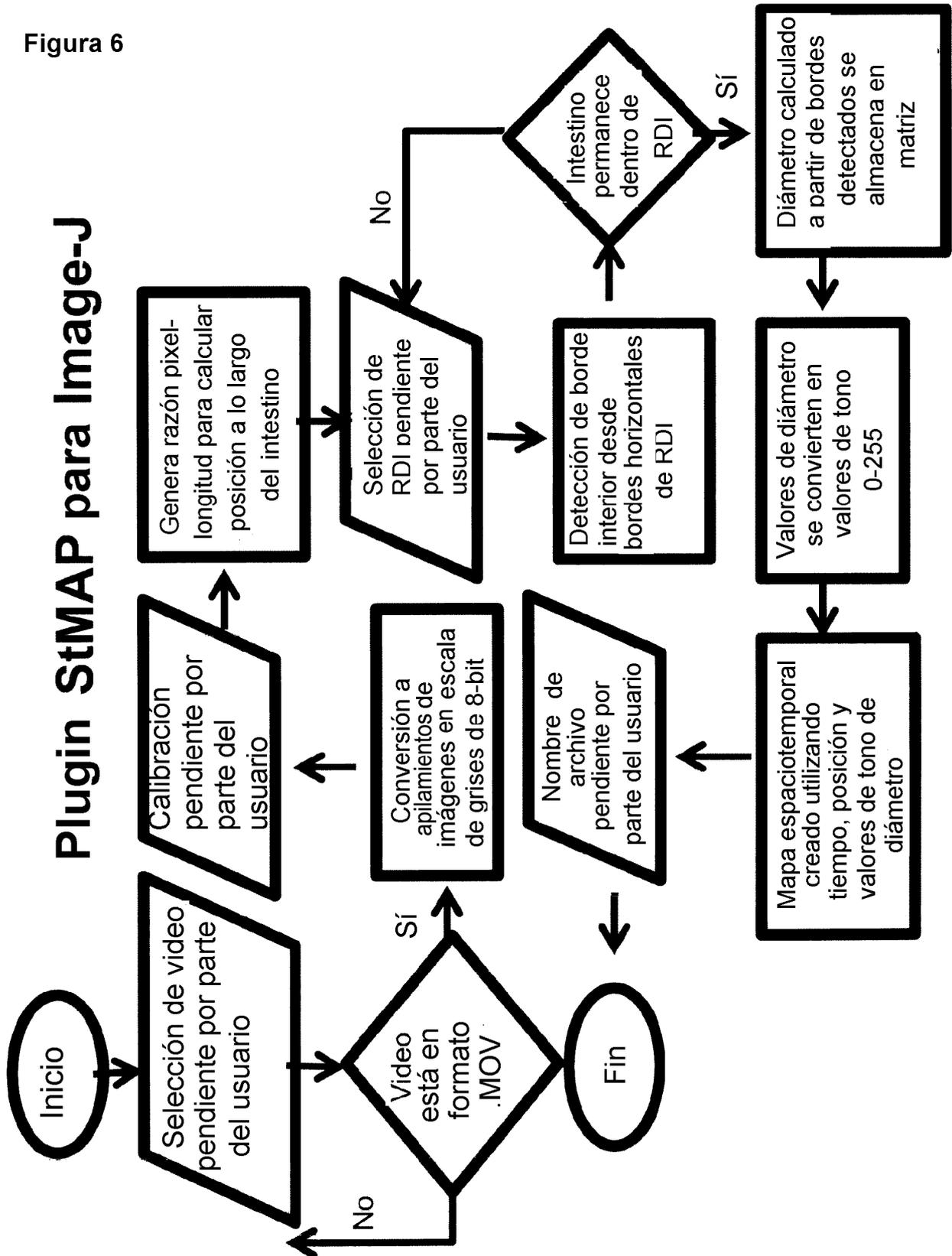


Figura 7

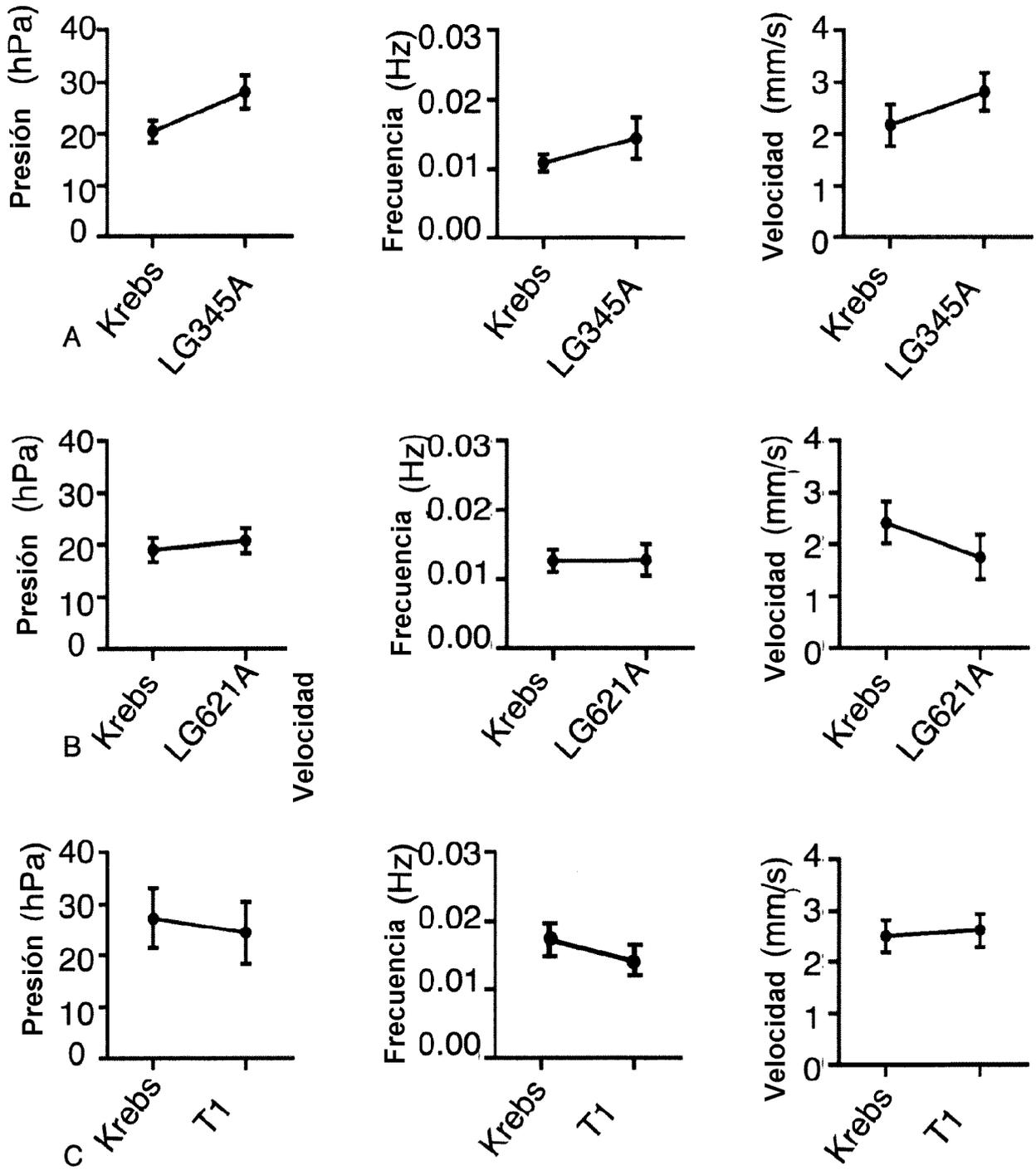


Figura 7 (continuación)

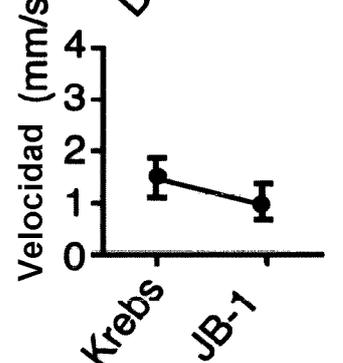
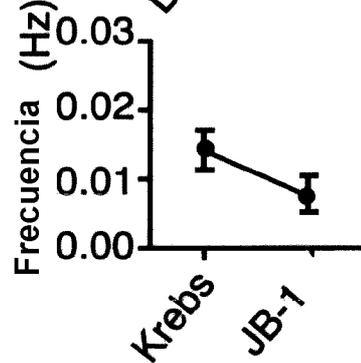
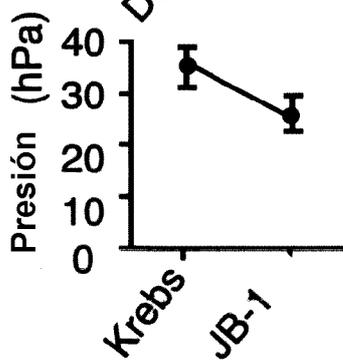
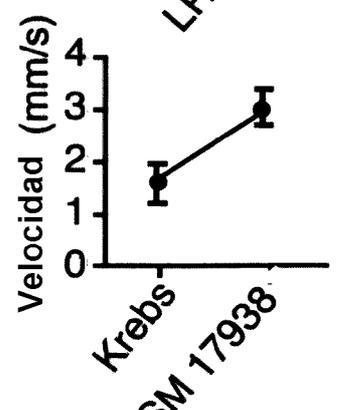
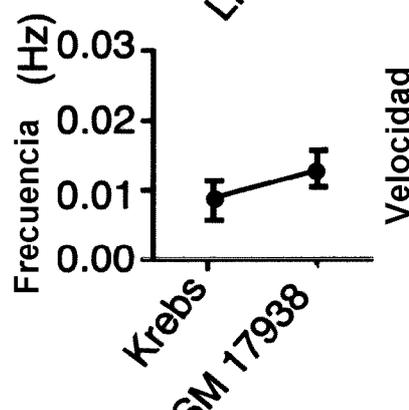
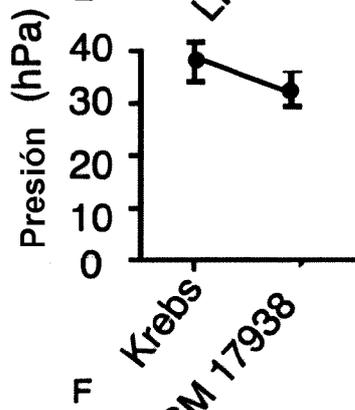
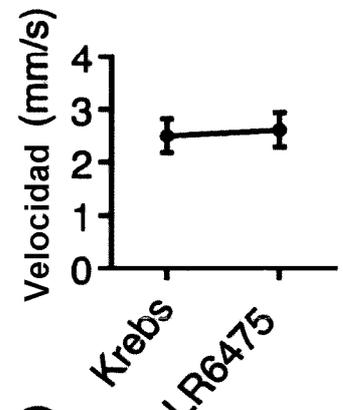
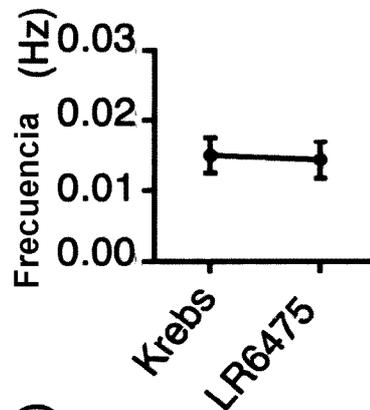
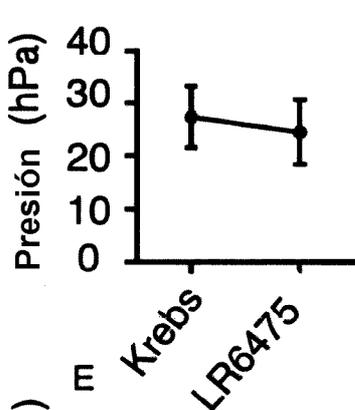
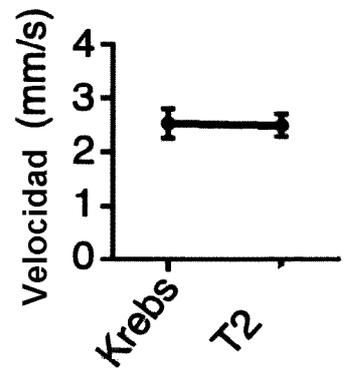
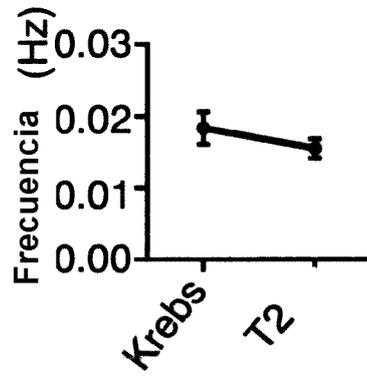
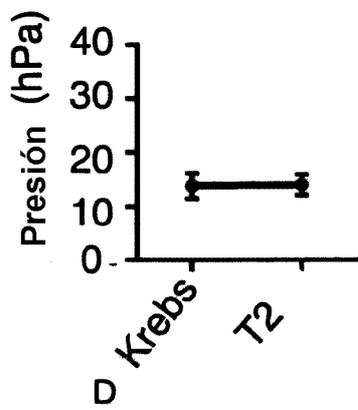


Figura 8

