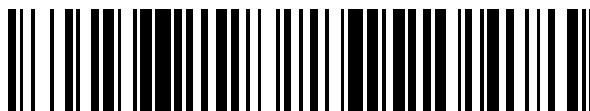


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 060**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015 PCT/SE2015/050064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015 E 15703840 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3097423**

54 Título: **Selección de agentes que modulan el dolor gastrointestinal**

30 Prioridad:

23.01.2014 SE 1450065
01.07.2014 SE 1450813

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2020

73 Titular/es:

BIOGAIAB (100.0%)
P.O. Box 3242
103 64 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

CONOLLY, EAMONN;
KUNZE, WOLFGANG y
BIENENSTOCK, JOHN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 767 060 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

Selección de agentes que modulan el dolor gastrointestinal

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere principalmente a la modulación del dolor gastrointestinal y, en particular, a la selección de agentes, tales como bacterias del ácido láctico, que pueden modular el dolor gastrointestinal y al uso de tales agentes.

10

Antecedentes

15 El dolor gastrointestinal es un síntoma de muchos estados, enfermedades y trastornos asociados con el tracto gastrointestinal. El dolor abdominal funcional se refiere a dolor abdominal recurrente. La gran mayoría de pacientes con dolor abdominal recurrente tienen dolor "funcional" o "no orgánico", lo que significa que el dolor no está provocado por anomalías físicas. Diversos trastornos de motilidad también se asocian con dolor y estreñimiento o diarrea. El término se usa para describir una variedad de trastornos en los que el intestino no ha desarrollado adecuadamente o ha perdido su capacidad para coordinar la actividad muscular debido a diversos motivos.

20 Tales trastornos pueden manifestarse en una variedad de maneras, e incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

- Distensión abdominal
- Obstrucción recurrente
- 25 • Dolor cólico abdominal
- Estreñimiento
- 30 • Enfermedad por reflujo gastroesofágico
- Vómitos recurrentes, incoercibles
- Diarrea
- 35 • Síndrome del intestino irritable (IBS, por sus siglas en inglés *Irritable Bowel Syndrome*)
- Enteropatía inflamatoria
- 40 • Incontinencia fecal
- Cólicos del lactante
- Dolor abdominal recurrente frecuente (FRAP, por sus siglas en inglés *Frequent Recurrent Abdominal Pain*)
- 45 • Regurgitación
- Intolerancia alimentaria

50 En un sentido amplio, cualquier alteración significativa en el tránsito de alimentos y secreciones en el tubo digestivo puede considerarse un trastorno de motilidad intestinal y este es el tipo de trastorno que a menudo se asocia con el dolor gastrointestinal.

55 Se requieren movimientos coordinados adecuados del estómago y los intestinos para digerir y propulsar el contenido intestinal a lo largo del tubo digestivo. Los patrones de contracción y relajación necesarios para la motilidad adecuada del tracto gastrointestinal (GI) son complejos y usan los nervios y músculos dentro de las paredes gastrointestinales. Cada día, en cualquier momento, pueden influir muchos factores en la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, el ejercicio físico y el malestar psíquico. Los recién nacidos tienen que desarrollar el complejo sistema de motilidad en el tracto gastrointestinal. La motilidad gastrointestinal disfuncional a menudo se asocia con el dolor gastrointestinal.

60

El envejecimiento, la demencia, el accidente cerebrovascular, la enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, el desgarro rectal durante el alumbramiento, la diabetes, complicaciones quirúrgicas y trastornos neuromusculares, por ejemplo, miastenia grave, pueden provocar trastornos de motilidad que se asocian con el dolor.

65

5 El síndrome de intestino irritable (IBS), un trastorno comúnmente diagnosticado de motilidad intestinal y dolor gastrointestinal, se ha considerado una enfermedad del colon durante décadas, pero la investigación en la motilidad gastrointestinal ha demostrado que también pueden producirse problemas de motilidad subyacentes en el intestino delgado. El IBS a menudo puede ir acompañado de dolor gastrointestinal y se ha mostrado que la inmunorreactividad de TRPV1 aumenta notablemente en pacientes con IBS (Akbar, Yiangou *et al.*, Gut 2008).

10 El estreñimiento, a menudo asociado con el dolor gastrointestinal, es la dolencia digestiva más común en los Estados Unidos, pero, a pesar de su frecuencia, a menudo permanece no reconocida hasta que el paciente desarrolla trastornos secundarios, tales como trastornos anorrectales o enfermedad diverticular. Tal como se mencionó anteriormente, el dolor gastrointestinal es un síntoma común de estreñimiento.

15 El estreñimiento es bastante común durante el embarazo. Las contracciones musculares que normalmente mueven el alimento a través de los intestinos se ralentizan debido a los mayores niveles de la hormona progesterona y posiblemente al hierro adicional tomado como vitamina prenatal. A menudo, esto también va acompañado de dolor de la parte inferior del abdomen.

El estreñimiento también se asocia con la edad aumentada y el denominado "intestino envejecido" comúnmente encontrado especialmente en personas mayores de 70 y en instituciones para enfermos crónicos.

20 En el otro extremo de los trastornos de motilidad intestinal del espectro de envejecimiento, el llanto persistente o excesivo de cólicos del lactante es uno de los problemas más angustiosos de la infancia. Es angustioso para el lactante, los padres y los profesionales asistenciales involucrados. El dolor cólico a menudo comienza y se detiene de manera brusca.

25 La hipermotilidad intestinal secundaria a un presunto desequilibrio autónomo también se ha propuesto como una causa de cólico. Muchos de los mecanismos que regulan la actividad motora son inmaduros en los lactantes. La inmadurez de estos mecanismos puede dar como resultado vulnerabilidad aumentada a la intolerancia alimentaria. Por tanto, el cólico puede ser una manifestación clínica común en la subpoblación de lactantes que tienen disfunción madurativa en uno o más de los aspectos de regulación de la motilidad y a menudo que conducen a dolor gastrointestinal para el lactante.

30 Los trastornos de motilidad intestinal se aplican a las contracciones intestinales anómalas a menudo asociadas con el dolor gastrointestinal, existen muchos tipos diferentes de tratamientos y recomendaciones para los diferentes trastornos, algunos de los cuales funcionan mejor que muchos otros.

35 Por tanto, existe una necesidad general y problemas específicos para resolver diversos trastornos de motilidad y trastornos del dolor concretamente; ¿Cómo seleccionar mejor agentes para evitar o reducir el dolor gastrointestinal?

40 El receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) es un canal catiónico permeable para Ca^{2+} expresado en, por ejemplo, el sistema nervioso periférico (SNP), el sistema nervioso central (SNC), el aparato respiratorio y el tracto gastrointestinal. El TRPV1 se activa mediante estímulos físicos y químicos, por ejemplo, temperatura, cambio de pH y capsaicina, y es crítico para la detección de dolor inflamatorio nocisensible y térmico. En el tracto gastrointestinal, la inmunorreactividad de TRPV1 puede, por ejemplo, encontrarse en aferentes sensoriales viscerales y las células de TRPV1 transmiten, por ejemplo, sensación de dolor gástrico a los centros superiores del cerebro. Se cree que el TRPV1 está involucrado en varios estados gastrointestinales que se asocian con sensaciones de dolor y se ha demostrado que la inmunorreactividad de TRPV1 aumenta de manera notable en, por ejemplo, IBS (Akbar, Yiangou *et al.*, Gut 2008). Como un ejemplo de estos, pacientes diagnosticados con enteropatía inflamatoria activa demuestran una inmunorreactividad de TRPV1 aumentada en gran medida en fibras nerviosas del colon (Wang, Miyares y Ahern, 2005 J. Physiol.).

50 Aunque se considera que el TRPV1 es una posible diana para el desarrollo de fármacos para tratar diferentes modalidades de dolor, la expresión generalizada del receptor puede dar como resultado acontecimientos adversos que limitan el uso de antagonistas de TRPV1 sistémicos en el tratamiento de dolor gastrointestinal. En particular, antagonizar el receptor podría conducir posiblemente a complicaciones cardiovasculares como resultado de la liberación de péptido vasoactivo disminuida.

55 El documento WO 2009/155932 se refiere al uso de un agente que puede unirse e inhibir la formación de un receptor binario del dominio Vps10p:complejo del receptor TrpV y/o la formación de un receptor ternario del dominio Vps10p:TrkA:complejo del receptor TrpV adicional para la preparación de un medicamento para la inhibición del dolor y la señalización del dolor.

60 Pharmacology & Therapeutics, 2011, 131: 142-170 da a conocer que cambios en la expresión o función del canal de TRP se asocian con una variedad de enfermedades/trastornos del aparato digestivo. Por consiguiente, los canales de TRP se identifican como dianas farmacológicas prometedoras para el manejo de varias patologías gastrointestinales.

European Journal of Pharmacology, 2004, 500: 231-241 da a conocer que TRPV1 se activa no sólo por vaniloideas sino también por calor, acidosis y mediadores lipídicos intracelulares nocivos. TRPV1 se identifica como una diana atractiva de terapias novedosas para el dolor abdominal crónico.

5 Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1822: 74-84 da a conocer la participación de mediadores de mastocitos en la sensibilización de canales de TRP.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296: G868-G875 da a conocer que la ingesta de *Lactobacillus reuteri* evita la hiperexcitabilidad de neuronas de DRG de colon inducidas por estímulos nocivos.

10 Gut, 2006, 55: 191-196 da a conocer que la administración oral de bacterias probióticas o bien vivas o bien muertas o medio acondicionado inhibió la respuesta cardio-autónoma constitutiva a la distensión colorrectal en ratas a través de efectos sobre los nervios entéricos. El hallazgo puede proporcionar una explicación novedosa para los efectos probióticos beneficiosos sobre el dolor visceral.

15 Journal of Paediatrics and Child Health, 2014, 50: E68-E71 da a conocer que la complementación con *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 en niños con dolor abdominal funcional redujo significativamente la intensidad del dolor.

20 Zdravniski Vestnik, 2013, 82, suplemento 1: I-83-93 revisa estudios clínicos sobre la eficacia de *Lactobacillus reuteri* en la terapia de trastornos gastrointestinales funcionales en lactantes, niños y adolescentes. Los estudios sugieren que la posible utilidad de cepas de *L. reuteri* específicas para el alivio del estreñimiento y el dolor abdominal funcional.

Sumario de la invención

25 Es un objetivo general encontrar agentes adecuados para reducir o evitar el dolor gastrointestinal.

Es un objetivo particular proporcionar un método para seleccionar agentes, preferiblemente cepas bacterianas y más preferiblemente bacterias del ácido láctico, eficaces en reducir o evitar el dolor gastrointestinal.

30 Estos y otros objetivos se cumplen mediante las realizaciones tal como se da a conocer en el presente documento.

Un aspecto de las realizaciones se refiere a un método para seleccionar un agente eficaz en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto. El método comprende seleccionar un agente que puede reducir la activación espontánea y/o inducida del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1).

35 Las presentes realizaciones proporcionan una tecnología eficiente que puede usarse para seleccionar o identificar agentes, en particular cepas bacterianas, tales como bacterias del ácido láctico, que pueden usarse para reducir o evitar el dolor gastrointestinal en sujetos, preferiblemente sujetos humanos, que padecen un trastorno o una enfermedad que provoca o se asocia con dolor gastrointestinal.

Breve descripción de las figuras

45 Las realizaciones, junto con objetos y ventajas adicionales de las mismas, pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra la descarga espontánea de unidades múltiples mesentéricas después de la adición de 1×10^8 unidades de DSM 17938 (ufc)/ml (A), 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 (B), diluidas con medio acondicionado con DSM 17938 (1:5) (C), 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 irradiadas con \square (D) y medio diluido solo (1:5) (E) (pruebas de Wilcoxon).

La figura 2 muestra efectos de DSM 17938 sobre la tasa de descarga espontánea de aferentes espinales. A) La tasa de descarga de unidades múltiples disminuyó cuando se añadieron 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 a la luz (prueba de Wilcoxon). B) Panel izquierdo, la descarga de la unidad individual espinal se redujo por DSM 17938 (prueba de Wilcoxon). C) Paneles superiores, trazas representativas de descarga espontánea de unidades múltiples antes y después de añadir DSM 17938; paneles inferiores, formas de onda superpuestas de una unidad individual que se produjo en los momentos marcados por "o" en los perfiles superiores.

La figura 3 muestra que DSM 17938 antagonizó la respuesta excitadora de fibras espinales al añadir capsaicina al superfusato seroso. A) La curva dosis-respuesta de capsaicina de 113 unidades individuales espinales se representó gráficamente (\bullet) y se ajustó con una ecuación logística de tres parámetros, $CE_{50} = 200$ nM. $Máx = 238 \pm 27\%$; con 116 fibras adicionales se representó gráficamente de manera adicional una curva dosis-respuesta para la capsaicina en presencia de 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 (\blacksquare) y se ajustó con la misma ecuación logística, para la cual $CE_{50} = 500$ nM y $Máx = 129 \pm 17\%$ ($P = 0,7$ y $P = 0,004$ para las diferencias en CE_{50} y $Máx$, respectivamente, prueba F de suma de cuadrados extra). B) Gráficos de dispersión a modo de resumen con medias y EEM que muestran cómo variaron las respuestas de unidades individuales con las dosis crecientes de capsaicina en ausencia

o presencia de 1×10^9 ufc/ml de DSM. (*n*) indica la proporción de unidades individuales para cada grupo.

5 La figura 4 muestra que DSM 17938 o un antagonista de TRPV1 reduce la respuesta excitadora provocada por la distensión en unidades individuales espinales. A) Gráficos de dispersión que muestran que la adición de 1×10^9 de DSM 17938 a la luz redujo el aumento en la tasa de descarga de la unidad individual espinal provocada al elevar la presión intraluminal hasta 48 hPa. B) Adición de 10 μ M del antagonista de TRPV1 6-yodonordihidrocapsaicina al lumen que imitaba el efecto de la adición de DSM 17938 (pruebas de Wilcoxon).

10 La figura 5 muestra que DSM 17938 redujo el aumento de Ca^{2+} provocado por la capsaicina en somas de ganglios nerviosos de la raíz posterior. A) Capsaicina 1 μ M provocó un aumento en la entrada de Ca^{2+} en neuronas de DRG que disminuyó de manera dependiente de la dosis por DSM 17938 intraluminal y no se vio afectada por 1×10^9 ufc/ml de JB-1. B) Gráfico a modo de resumen que muestra cómo la razón (F/F_0) de la fluorescencia de Ca^{2+} máxima (F) provocada por capsaicina con respecto a la fluorescencia de Ca^{2+} inicial (F_0) varió con la concentración de DSM 17938 o de JB-1. (Valores de P , prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni).

15 La figura 6 muestra que la alimentación de 9 días con DSM 17938 redujo la bradicardia provocada por distensión gástrica. A) Valores a modo de resumen para las disminuciones en porcentaje en la frecuencia cardiaca en reposo provocada por una distensión gástrica de 40 y 60 mmHg (valores de P , pruebas de la t para datos independientes). B) Gráficos a modo de resumen que muestran cómo cambió la frecuencia cardiaca en reposo a lo largo del tiempo en respuesta a una distensión gástrica de 60 mmHg. ($P = 0,01$, prueba ANOVA de dos vías).

20 La figura 7 muestra que la disminución inducida por DSM 17938 de las acciones excitadoras de la capsaicina sobre los aferentes espinales se imitó mediante medio acondicionado con DSM 17938. Gráfico a modo de resumen que muestra que el aumento de la frecuencia de descarga de fibras espinales de unidades individuales inducido por capsaicina 1 μ M en condiciones de control, con medio acondicionado con DSM 17938 (1:5) o con 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 ($P = 0,02$, prueba ANOVA de una vía; valores de P *a posteriori*, prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

30 Descripción detallada

Para facilitar el entendimiento de la invención, se define a continuación un número de términos.

35 “Dolor gastrointestinal”, también denominado dolor GI, indica el dolor en el aparato digestivo de un sujeto. Tal dolor gastrointestinal a menudo está provocado por o asociado con, es decir es un síntoma de o un componente de dolencia de, diversas enfermedades y trastornos, normalmente del aparato digestivo. El dolor gastrointestinal incluye dolor general en el aparato digestivo, a menudo indicado como dolor gastrointestinal general en la técnica, dolor asociado con trastornos de motilidad intestinal, dolor de enteropatías inflamatorias y síndrome del intestino irritable, dolor gástrico, dolor abdominal general, dolor visceral, dolor abdominal funcional, dolor abdominal recurrente frecuente y dolor en otros trastornos gastrointestinales funcionales.

40 “Dolor abdominal funcional” se refiere a dolor abdominal recurrente. La gran mayoría de pacientes con dolor abdominal recurrente tienen dolor “funcional” o “no orgánico”, lo que significa que el dolor no está provocado por anomalías físicas.

45 “Trastornos de motilidad intestinal” se usa para describir una variedad de trastornos en los que el intestino no se ha desarrollado adecuadamente o ha perdido su capacidad para coordinar la actividad muscular debido a diversas causas. Tales trastornos pueden manifestarse en una variedad de maneras, e incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

- 50 • Distensión abdominal
- Obstrucción recurrente
- Dolor cólico abdominal
- 55 • Estreñimiento
- Enfermedad por reflujo gastroesofágico
- 60 • Vómitos recurrentes, incoercibles
- Diarrea
- Síndrome del intestino irritable (IBS)
- 65 • Enteropatía inflamatoria

- Incontinencia fecal
- Cólicos del lactante
- Dolor abdominal recurrente frecuente (FRAP)
- Regurgitación
- Intolerancia alimentaria

En un sentido amplio, cualquier alteración significativa en el tránsito de alimentos y secreciones en el tubo digestivo puede considerarse un trastorno de motilidad intestinal y este a menudo se asocia con dolor gastrointestinal.

“Dolor gástrico” es un término colectivo usado para describir dolor o molestia en la parte superior del abdomen.

En una realización, el motivo del dolor gástrico se selecciona del grupo que comprende, tal como que consiste en, dispepsia no ulcerosa, úlcera péptica, enfermedad por reflujo gastroesofágico y gastritis.

En una realización particular, el motivo del dolor gástrico es dispepsia no ulcerosa y/o gastritis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “frecuencia de descarga” se usa para medir los trenes de espigas sensoriales al cerebro.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “frecuencia del complejo motor migratorio” (frecuencia de MMC) se calcula contando el número de bandas de MC oscuras en mapas espaciotemporales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “velocidad del complejo motor migratorio” (velocidad de MMC) se mide a partir de la(s) pendiente(s) de cada banda en el mapa espaciotemporal generado por los complejos motores migratorios.

Tal como se usa en el presente documento, el término “agente” se usa para referirse a cualquier sustancia o material incluyendo células completas; microorganismos; medio acondicionado; proteínas, péptidos, enzimas y/o moléculas derivadas de un medio acondicionado de este tipo; proteínas, péptidos, enzimas y/o moléculas secretadas o derivadas de células completas o microorganismos; u otro material biológico o químico que puede usarse para modular el dolor gastrointestinal en el aparato digestivo de un mamífero. Un ejemplo de agentes preferidos son cepas bacterianas, por ejemplo, cepas bacterianas probióticas, y en particular cepas de bacterias del ácido láctico. Otro ejemplo de agente preferido es un medio acondicionado de cepas bacterianas, por ejemplo, cepas bacterianas probióticas, y en particular cepas de bacterias del ácido láctico.

Un medio acondicionado, a veces también denominado medio de cultivo acondicionado, es un medio (de cultivo) en el que las células se han cultivado durante un periodo de tiempo. Las células cultivadas en el medio “acondicionan” el medio liberando o secretando diversos componentes o moléculas, tales como proteínas, péptidos, enzimas, citocinas, quimiocinas, sustancias químicas, etc.

Está empezándose a aceptar que los microorganismos intestinales envían señales al cerebro como parte del así denominado eje microbioma-intestino-cerebro. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el papel del microbioma del intestino en el desarrollo o la función del sistema nervioso. Actualmente, se conoce poco sobre la naturaleza cuantitativa de la señal nerviosa transmitida desde el intestino hasta el sistema nervioso central.

Las neuronas sensoriales individuales, incluyendo aquellas entre las fibras del vago, representan estímulos físicos continuos como trenes de espigas con patrones que codifican la naturaleza y la intensidad del estímulo. Además de esto, los estímulos pueden representarse 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 aferentes primarios debe codificarse en el lenguaje de trenes de espigas neuronales. Por tanto, saber cómo los trenes de espigas sensoriales se ven afectados por diversos agentes, tales como comensales, cepas probióticas y diferentes sustancias, permite identificar nuevos microorganismos del intestino beneficiosos y sus moléculas activas por sus efectos sobre la descarga aferente primaria, así como nuevos fármacos y otros compuestos que pueden intervenir de diversas maneras en este sistema de señalización, particularmente modulando la activación de TRPV1.

El método de las realizaciones en el presente documento se emplea para seleccionar un agente para su uso en la

reducción o prevención del dolor gastrointestinal inhibiendo la señalización a través del receptor TRPV1. Por tanto, el método de las realizaciones puede usarse para evaluar agentes que pueden ser potencialmente eficaces en la prevención del dolor gastrointestinal y/o eficaces en reducir, inhibir o tratar el dolor gastrointestinal. Por tanto, el método puede usarse para identificar agentes eficaces que pueden modular el dolor gastrointestinal asociado con el sistema nervioso periférico (entérico) y/o central.

Por tanto, un aspecto de las realizaciones se refiere a un método para seleccionar un agente eficaz en, es decir para su uso en, reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto. El método comprende seleccionar un agente que puede reducir la activación espontánea y/o inducida del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1).

Por tanto, las realizaciones se basan en usar la ruta de señalización de TRPV1 como una herramienta de selección en la identificación de agentes que son eficaces en modular, en particular evitar o reducir, tal como inhibir o tratar, el dolor gastrointestinal en sujetos que padecen enfermedades o trastornos que implican o que provocan tal dolor gastrointestinal y que pueden indicarse como enfermedades o trastornos del dolor gastrointestinal.

El método de las realizaciones se realiza normalmente *in vitro* o *ex vivo* tal como se da a conocer adicionalmente en el presente documento. Sin embargo, el agente preferiblemente puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 en el sujeto cuando se administra al sujeto.

Por tanto, el método de las realizaciones puede usarse para encontrar agentes adecuados para reducir o evitar el dolor gastrointestinal en diferentes trastornos y enfermedades del dolor gastrointestinal. Los agentes se eligen para afectar a la activación de TRPV1 del sujeto de una manera beneficiosa con el fin de modular, es decir, preferiblemente evitar, reducir o tratar, el dolor gastrointestinal.

En una realización, el trastorno o la enfermedad asociada con el dolor gastrointestinal que va a evitarse o tratarse con un agente seleccionado mediante el método es un trastorno o una enfermedad del dolor gastrointestinal.

En una realización, el dolor gastrointestinal es dolor gástrico.

En una realización, el dolor gastrointestinal es dolor visceral.

En una realización, el dolor gastrointestinal puede estar presente en un sujeto que padece cólico.

En una realización, el dolor gastrointestinal puede estar presente en un sujeto que padece síndrome del intestino irritable (IBS).

En una realización, el dolor gastrointestinal puede estar presente en un sujeto que padece estreñimiento. El dolor gastrointestinal puede estar presente en sujetos que padecen trastornos de motilidad intestinal tal como se definió anteriormente.

Por tanto, en una realización el sujeto padece un trastorno de motilidad intestinal con dolor gastrointestinal asociado.

El método de las realizaciones se basa en el descubrimiento inesperado de que el dolor gastrointestinal, incluyendo dolor asociado con diferentes estados y trastornos tales como trastornos de motilidad, y manifestado de manera central o periférica, está conectado con la activación de TRPV1, que puede modularse por agentes previamente desconocidos, tales como bacterias del ácido láctico.

Una clase de dolor gastrointestinal es dolor visceral que da como resultado la activación de nociceptores de las vísceras abdominales (órganos). Las estructuras viscerales son altamente sensibles a la distensión (estiramiento), isquemia e inflamación, pero relativamente insensibles a otros estímulos que normalmente provocan dolor. El dolor visceral es difuso, difícil de localizar y a menudo se refiere a una estructura distante, normalmente superficial. Puede estar acompañado por síntomas tales como náuseas, vómitos, cambios en las constantes vitales, así como manifestaciones emocionales. El dolor puede describirse como repugnante, profundo, opresivo y sordo. Distintas lesiones estructurales o anomalías bioquímicas explican este tipo de dolor en sólo una proporción de pacientes. A veces, estas enfermedades se agrupan en enfermedades neuromusculares gastrointestinales (GINMD). Las personas también pueden experimentar dolores viscerales, a menudo muy intensos en naturaleza, sin ninguna evidencia de motivo estructural, bioquímico o histopatológico para tales síntomas.

Un nociceptor es un receptor sensorial que responde a estímulos potencialmente dañinos enviando potenciales de acción a neuronas nociceptoras específicas (A δ o C) que transmiten a los tractos anterolaterales de la médula espinal (más una proyección vagal menor) y luego al tálamo, y al prosencéfalo incluyendo las cortezas insular y cingulada. Es fundamental para la percepción del dolor que se origina en la enteropatía 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 nerviosos aferentes mesentéricos.

El método puede usarse para detectar agentes con el fin de seleccionar agentes con propiedades deseadas, por

ejemplo, reducción en la activación de TRPV1, para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal. El parámetro que va a medirse en el método, es decir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1, puede monitorizarse y determinarse en diferentes modelos y sistemas. Usando esta información, puede obtenerse un perfil útil para definir los efectos detallados y potencialmente matizados que tienen agentes específicos sobre la señalización del dolor en el dolor gastrointestinal.

Otros parámetros que pueden medirse en el método incluyen señalización del dolor general, actividad de descarga nerviosa, por ejemplo, análisis del haz nervioso mesentérico, y posiblemente usando diferentes modelos *in vivo* de dolor gastrointestinal.

En una realización, la activación de TRPV1 se mide en células que expresan TRPV1, tal como neuronas de los ganglios nerviosos de la raíz posterior (DRG), células CaCo2 u otra línea celular epitelial intestinal humana convencional. Puede medirse tanto la activación espontánea de TRPV1 como la activación de TRPV1 después de la inducción mediante, por ejemplo, capsaicina, cambio de pH o temperatura. Generalmente, cualquier célula o tejido que expresa TRPV1 puede usarse para medir la activación de TRPV1 según las realizaciones.

Por tanto, en una realización, el método comprende poner en contacto una célula que expresa TRPV1 con un agente que va a someterse a prueba. El método también comprende medir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 en la célula tras, es decir después de, poner en contacto la célula con el agente que va a someterse a prueba. El método comprende además comparar la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 medida con una activación de TRPV1 de control. En esta realización, el método comprende además seleccionar el agente que va a someterse a prueba como agente eficaz en reducir o evitar el dolor gastrointestinal si la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 medida es menor que la activación de TRPV1 de control.

La activación de TRPV1 de control puede determinarse según diversas realizaciones. Por ejemplo, la activación de TRPV1 puede definirse previamente y determinarse a partir de células que expresan TRPV1 con un nivel de activación que representa la activación normal o inicial correspondiente a, por ejemplo, dolor sustancialmente no gastrointestinal.

Sin embargo, una realización preferida de la determinación de la activación de TRPV1 de control es usar la célula que expresa TRPV1 como control interno. Por tanto, en una realización el método comprende medir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 en la célula antes de poner en contacto la célula con el agente que va a someterse a prueba. El método también comprende determinar la activación de TRPV1 de control basándose en la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 medida en la célula antes de poner en contacto la célula con el agente que va a someterse a prueba.

En este enfoque, las mediciones de activación espontánea y/o inducida de TRPV1, por tanto, se realizan preferiblemente dos veces: antes de poner en contacto la célula con el agente que va a someterse a prueba y tras poner en contacto la célula con el agente que va a someterse a prueba.

Alternativamente, las mediciones de activación espontánea y/o inducida de TRPV1 pueden realizarse en dos experimentos en paralelo: un experimento en el que una célula se pone en contacto con el agente que va a someterse a prueba y un experimento de control en el que una célula no se pone en contacto con el agente. Por tanto, las células usadas en los dos experimentos son del mismo tipo, tal como ambas neuronas de DRG, células CaCo2 u otra línea celular epitelial intestinal humana convencional. La activación espontánea y/o inducida de TRPV1 se mide en ambos experimentos y después se comparan entre sí.

La célula que va a usarse en el método puede ser cualquier célula que expresa TRPV1 incluyendo, pero sin limitarse a, preparaciones *ex vivo*, líneas celulares que expresan TRPV1, tales como líneas celulares epiteliales intestinales humanas que expresan TRPV1, y células primarias que expresan TRPV1.

La activación espontánea y/o inducida de TRPV1 medida y la activación de TRPV1 de control pueden expresarse generalmente como un valor o una métrica del parámetro respectivo, incluyendo un valor que representa el nivel de activación espontánea y/o inducida de TRPV1.

En una realización, se usan células primarias tales como, por ejemplo, neuronas de los ganglios nerviosos de la raíz posterior (DRG) para analizar la activación de TRPV1.

En otra realización, se usan líneas celulares que expresan TRPV1 tal como CaCo2 u otra línea celular epitelial intestinal humana convencional para analizar la activación de TRPV1.

En otras realizaciones, se usan líneas celulares que expresan TRPV1 comercialmente disponibles para analizar la activación de TRPV1, véase por ejemplo n.º de cat. CT6105 de Chantest.

También es posible usar células de gen indicador, también denominadas células indicadoras en la técnica, que pueden usarse para monitorizar y medir la expresión de TRPV1 y/o la activación espontánea y/o inducida de TRPV1.

Pueden usarse varios métodos diferentes para estudiar la activación de TRPV1, incluyendo, pero sin limitarse a, análisis funcional usando, por ejemplo, flujo de entrada de calcio inducido por, por ejemplo, capsaicina y/o su prevención mediante un agente en células que expresan TRPV1 y frecuencias de descarga de haces nerviosos mesentéricos, espontáneas y/o inducidas por, por ejemplo, capsaicina. En otra realización, puede usarse la evaluación funcional de la actividad de canales iónicos regulados por temperatura usando una máquina de PCR en tiempo real, tal como se describe en Reubish, Emerling *et al.*, BioTechniques 2009, para analizar la activación de TRPV1. En otra realización, pueden usarse ratones indicadores para el canal de TRPV1 para investigar la activación de TRPV1. También pueden usarse diversos paradigmas *in vivo* para analizar los efectos sobre el dolor en la invención. Estos métodos incluyen, por ejemplo, distensión gástrica y efectos sobre la frecuencia cardíaca (véase el ejemplo 3) y modelos de distensión colorrectal.

Por tanto, en una realización, el método comprende medir el flujo de entrada de Ca^{2+} en la célula inducido por capsaicina u otra sustancia que puede inducir la activación de TRPV1, por ejemplo, un análogo de capsaicina u otras sustancias que pueden activar a TRPV1. También puede usarse la exposición de la célula a condiciones físicas seleccionadas para inducir la activación de TRPV1, incluyendo cambio de pH o de temperatura. Por tanto, la exposición de la célula a pH ácido, pH básico y/o calor (temperaturas elevadas, normalmente por encima de aproximadamente 42°C) pueden inducir la activación de TRPV1. Por tanto, en esta realización, el flujo de entrada de Ca^{2+} en la célula que expresa TRPV1 se usa como un parámetro que representa la activación de TRPV1. A continuación, puede medirse una reducción en la activación de TRPV1, y en particular una reducción en la activación de TRPV1 inducida por pH, inducida por calor y/o inducida por capsaicina, como una reducción en el flujo de entrada de Ca^{2+} . En otra realización, el método comprende medir la actividad de canales iónicos regulados por temperatura en la célula. En esta realización, la actividad de canales iónicos regulados por temperatura en la célula que expresa TRPV1 se usa como un parámetro que representa la activación de TRPV1. La actividad de canales iónicos regulados por temperatura puede ser espontánea o inducida, tal como inducida por temperatura aumentada. A continuación, puede medirse una reducción en la activación de TRPV1 como una reducción en la actividad de canales iónicos regulados por temperatura en la célula.

En una realización, la activación de TRPV1 se mide usando experimentos de haces nerviosos aferentes mesentéricos. Por tanto, otro parámetro que puede medirse es la frecuencia de descarga espontánea y/o inducida, por ejemplo, por capsaicina, cambio de pH o calor, de los haces nerviosos aferentes mesentéricos. Esta técnica puede usarse para determinar cambios en la excitabilidad de las fibras nerviosas mesentéricas inducida por diferentes agentes que van a someterse a prueba. En una realización, se corta un segmento gastrointestinal con o sin la arcada mesentérica que contiene el haz nervioso que suministra el segmento compuesto por fibras tanto espinales como vagales para los registros de haces nerviosos *ex vivo* (véase el ejemplo 1).

En algunas realizaciones, la especificidad regional del tracto gastrointestinal es de importancia. Los segmentos apropiados para el análisis de nervios mesentéricos del método comprenden preferiblemente un haz nervioso apropiado para permitir la medición de la descarga de los nervios aferentes mesentéricos. Esto puede proporcionarse de manera conveniente teniendo un segmento gastrointestinal con tejido mesentérico unido (véase el ejemplo 1). Por tanto, esta realización se lleva a cabo de manera conveniente 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). La capacidad para llevar a cabo una comparación del efecto de un agente sobre el intestino delgado frente al grueso puede ser ventajosa, particularmente como, dependiendo del trastorno de motilidad intestinal que va a tratarse y el estadio clínico y los síntomas del mismo, un tratamiento que es específico de región, por ejemplo, específico para el intestino o bien delgado o bien grueso puede ser beneficioso.

En una realización, se analiza el tráfico espinal de los nervios mesentéricos para determinar las partes del intestino específicas y seleccionadas. Ha sido sorprendente encontrar que diferentes agentes, tales como bacterias del ácido láctico, pueden influir en o modular los sistemas de señalización del dolor gastrointestinal en una parte, pero no en otra parte del tracto gastrointestinal, y por medio de diferentes rutas nerviosas tales como vagal o para dolor visceral a través del ganglio nervioso de la raíz posterior.

Por tanto, en una realización, el método comprende poner en contacto un segmento gastrointestinal *ex vivo* con tejido mesentérico unido con un agente que va a someterse a prueba. El método también comprende medir la descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida en el segmento gastrointestinal *ex vivo* tras poner en contacto el segmento gastrointestinal *ex vivo* con el agente que va a someterse a prueba. El método comprende además comparar la descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida medida con una descarga aferente mesentérica de control. En esta realización, el método comprende además seleccionar el agente que va a someterse a prueba como agente eficaz en reducir o evitar el dolor gastrointestinal si la descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida medida es menor que la descarga aferente mesentérica de control.

La descarga aferente mesentérica de control puede determinarse tal como se comentó anteriormente usando el segmento gastrointestinal *ex vivo* como control interno. En un caso de este tipo, el método comprende medir la descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida en el segmento gastrointestinal *ex vivo* antes de poner en contacto el segmento gastrointestinal *ex vivo* con el agente que va a someterse a prueba. El método también

comprende determinar la descarga aferente mesentérica de control basándose en la descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida medida en el segmento gastrointestinal *ex vivo* antes de poner en contacto el segmento gastrointestinal *ex vivo* con el agente que va a someterse a prueba.

5 Alternativamente, pueden llevarse a cabo dos experimentos en paralelo. En uno de ellos, se pone en contacto un segmento gastrointestinal *ex vivo* con el agente que va a someterse a prueba y, en el otro, el experimento de control, no se pone en contacto un segmento gastrointestinal *ex vivo* con el agente. La descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida se mide en ambos experimentos y se comparan entre sí.

10 El análisis de uno o más de estos parámetros anteriores dará como resultado un método de selección de agentes eficaces en reducir o evitar el dolor gastrointestinal.

En una realización particular, el segmento gastrointestinal *ex vivo* se selecciona de un segmento de colon o yeyuno *ex vivo*. En un caso de este tipo, el método comprende poner en contacto un segmento de colon o yeyuno *ex vivo* con tejido mesentérico unido con el agente que va a someterse a prueba.

15 Los ejemplos de métodos apropiados y aparatos para analizar la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 se describen en los ejemplos y las figuras.

20 Por tanto, en métodos preferidos, el análisis presentado proporcionará datos sobre la activación espontánea y/o inducida de TRPV1. El análisis de uno o varios de estos parámetros dará como resultado un método preferido de selección de agentes eficaces en reducir y/o evitar el dolor gastrointestinal.

Por tanto, el método de las realizaciones puede usarse para encontrar agentes adecuados para el tratamiento, la prevención y/o la reducción del dolor gastrointestinal, usando el modelo en el presente documento.

25 El método presentado proporcionará datos sobre la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 usando diferentes modelos. El análisis de este parámetro dará como resultado un método de selección de agentes eficaces en reducir o evitar el dolor gastrointestinal.

30 En una realización, el método analiza el efecto de un agente sobre la activación de TRPV1 (espontánea y/o inducida por, por ejemplo, capsaicina, cambio de pH y/o calor, y su prevención por un agente) y, por tanto, puede usarse como una lectura de la señalización del dolor gastrointestinal, es decir si es probable que un agente tenga o no un efecto sobre el dolor gastrointestinal, por ejemplo, dolor visceral. Un aumento o ningún efecto significativo en la actividad espontánea o inducida (por ejemplo, por capsaicina, cambio de pH y/o calor) de TRPV1 es indicativo de un agente que es probable que dé como resultado un aumento en el dolor gastrointestinal o ningún efecto significativo sobre el dolor gastrointestinal, respectivamente, mientras que una disminución en la actividad espontánea y/o inducida (por ejemplo, por capsaicina, cambio de pH y/o calor) de TRPV1 es indicativa de un agente que reducirá el dolor gastrointestinal. Por tanto, los agentes preferidos son aquellos que dan como resultado una disminución en la actividad espontánea y/o inducida (por ejemplo, por capsaicina) de TRPV1.

35 En otra realización, el método analiza el efecto de un agente sobre la actividad de TRPV1 analizando la descarga espontánea y/o inducida (por ejemplo, por capsaicina, cambio de pH y/o calor) de los nervios aferentes mesentéricos (señalización del dolor) y, por tanto, puede usarse como una lectura para el dolor gastrointestinal, es decir si es probable que un agente tenga o no un efecto sobre el dolor gastrointestinal, por ejemplo, dolor visceral. Un aumento o ningún efecto significativo en la descarga de los nervios aferentes es indicativo de un agente que es probable que dé como resultado un aumento en el dolor gastrointestinal o ningún efecto significativo sobre el dolor gastrointestinal, respectivamente, mientras que una disminución en la descarga de los nervios aferentes es indicativa de un agente que reducirá el dolor gastrointestinal. Por tanto, los agentes preferidos son aquellos que dan como resultado una disminución en la descarga de los nervios aferentes, por ejemplo, una disminución en la frecuencia de descarga espontánea y/o inducida de los haces nerviosos aferentes.

45 El agente que va a someterse a prueba se añade al sistema elegido para el análisis de la actividad de TRPV1 de cualquier manera apropiada. Con el fin de analizar el efecto del agente sobre la señalización del dolor, los métodos se llevan a cabo de manera conveniente en presencia y ausencia del agente. Por ejemplo, la etapa del método se lleva a cabo antes y después de que se aplique 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, los resultados con tampón solo frente a tampón más agente.

60 Los inventores han encontrado sorprendentemente que determinadas cepas de bacterias del ácido láctico, por ejemplo, DSM 17938, pueden reducir la activación de TRPV1 en diferentes modelos *ex vivo* e *in vitro* (véase el ejemplo 1 y 2). Por tanto, en una realización preferida, el agente es una cepa bacteriana, más preferiblemente una bacteria del ácido láctico. Por tanto, el método de las realizaciones puede usarse ventajosamente para someter a prueba diversas bacterias del ácido láctico con el fin de identificar y seleccionar una o más cepas de bacterias del ácido láctico que son eficaces en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto tal como se determina

mediante el método en cuanto a poder reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1.

Otro aspecto de las realizaciones es un agente seleccionado mediante el método de las realizaciones, es decir que puede obtenerse mediante el método de selección.

5 Un agente preferido es un microorganismo, más preferiblemente una cepa bacteriana, preferiblemente una bacteria del ácido láctico, incluyendo partes o metabolitos de los mismos

Otro agente preferido es un medio acondicionado de un microorganismo de este tipo.

10 Un aspecto relacionado de las realizaciones define un agente que puede obtenerse mediante el método de selección de las realizaciones para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto.

15 En una realización particular, el agente puede obtenerse mediante el método de selección de las realizaciones que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto.

20 En una realización, para la reducción o prevención del dolor gastrointestinal, se seleccionará un agente que preferiblemente actúe para disminuir la señalización del dolor tal como se evalúa monitorizando el efecto del agente sobre la activación espontánea y/o inducida de TRPV1. Un agente de este tipo actuará preferiblemente para reducir o disminuir la activación de TRPV1 en neuronas de DRG, u otro tejido o células que expresan TRPV. Preferiblemente, el agente actuará para reducir la actividad espontánea y/o inducida (por ejemplo, por capsaicina, cambio de pH y/o calor) de TRPV1 usando diferentes sistemas o modelos *in vitro* incluyendo, sin limitarse a, células primarias y líneas celulares que expresan el receptor TRPV1 tal como se comentó anteriormente.

25 En una realización, se seleccionará un agente que actúe preferiblemente para reducir o disminuir la activación de TRPV1 en los haces nerviosos aferentes mesentéricos. El agente actuará para reducir las frecuencias de descarga espontánea y/o inducida (por ejemplo, por capsaicina, cambio de pH y/o calor) de los haces nerviosos aferentes mesentéricos.

30 Resulta evidente a partir de lo anterior que el método de las realizaciones también puede usarse para seleccionar o identificar agentes que no son apropiados para el tratamiento de dolor gastrointestinal, por ejemplo, agentes que no tienen un efecto beneficioso sobre la reducción de la señalización del dolor. En particular, es improbable que aquellos agentes que no muestran un efecto sobre este parámetro sean adecuados para la reducción o prevención del dolor gastrointestinal. Además, es improbable que aquellos agentes que tengan un efecto de aumento de la señalización del dolor, tal como se mide mediante un aumento en la actividad espontánea y/o inducida de TRPV1, sean adecuados para la reducción o prevención del dolor gastrointestinal.

35 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a una composición que comprende un agente seleccionado mediante el método de las realizaciones y al menos un componente adicional. Por tanto, al menos un componente adicional se selecciona preferiblemente de un grupo que consiste en un portador farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un producto alimenticio, un complemento alimenticio y otro agente preventivo o terapéutico.

40 Por tanto, una realización se refiere a una composición que comprende un agente que puede obtenerse mediante el método de selección de las realizaciones y al menos un componente adicional seleccionado de un grupo que consiste en un portador farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un producto alimenticio, un complemento alimenticio y otro agente preventivo o terapéutico para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto.

45 El al menos un componente adicional puede administrarse junto con el agente seleccionado según las realizaciones o puede administrarse de manera separada. Además, el al menos un componente adicional puede administrarse al mismo tiempo que el agente seleccionado según las realizaciones o en puntos de tiempo diferentes. Los regímenes de administración y los momentos adecuados pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica dependiendo del componente adicional en cuestión.

50 En una realización, el al menos un componente adicional es cualquier componente nutricional apropiado, por ejemplo, un producto alimenticio o un complemento alimenticio.

55 En una realización, el otro agente preventivo o terapéutico puede ser cualquier agente adicional, que es útil en la prevención o reducción, tal como el tratamiento, del dolor gastrointestinal en cuestión.

60 En otra realización, el otro agente preventivo o terapéutico es un agente que puede afectar a la motilidad y/o el mezclado gastrointestinal. Entonces, el otro agente preventivo o terapéutico puede preferiblemente modular (aumentar o reducir, dependiendo del estado que va a tratarse tal como se conoce en la técnica y se describe a continuación) la motilidad y/o el mezclado gastrointestinal.

65

En una realización adicional, el agente de las realizaciones puede tener funciones duales, es decir, tener función sobre tanto el dolor gastrointestinal como la motilidad y/o el mezclado gastrointestinal.

5 El agente seleccionado según las presentes realizaciones con el propósito de ser eficaz en reducir o evitar el dolor gastrointestinal también puede someterse a análisis o métodos de selección distintos o adicionales con el propósito de determinar si el agente es eficaz adicionalmente en modular la motilidad y/o el mezclado gastrointestinal. Un agente de este tipo puede ser interesante para su uso en la prevención o el tratamiento de, por ejemplo, trastornos de motilidad, ya que aborda tanto el dolor gastrointestinal como la alteración de la motilidad en conjunto. Los modos de analizar la motilidad y/o el mezclado se conocen en la técnica. Los parámetros que van a analizarse incluyen, pero no se limitan a, frecuencia de MMC, velocidad de MMC, presión intraluminal tal como PPr y otros modelos funcionales.

15 En análisis de motilidad, los cambios en la motilidad gastrointestinal inducida por un agente pueden detectarse, por ejemplo, como una alteración en el patrón de motilidad o las amplitudes de contracción. Algunos agentes no tendrán ningún efecto. Un agente que puede aumentar la motilidad gastrointestinal, por ejemplo, aumentando la frecuencia de MMC y/o la velocidad de MMC y/o la presión intraluminal tal como PPr, probablemente serán útiles para tratar trastornos asociados con el dolor gastrointestinal en los que sería ventajoso aumentar la motilidad propulsora a lo largo del tubo digestivo, tal como estreñimiento y cólico.

20 Alternativamente, si por ejemplo el trastorno de motilidad intestinal para el tratamiento es uno en el que se desea aumentar el tiempo de tránsito de material a través del intestino, por ejemplo trastornos que implican el tránsito rápido, tal como IBS o diarrea, entonces un agente de interés actuará, además de sus efectos sobre la modulación del dolor gastrointestinal, para disminuir la motilidad gastrointestinal, por ejemplo disminuyendo la frecuencia de MMC o la velocidad de MMC o la presión intraluminal, por ejemplo PPr. Los agentes preferidos disminuirán al menos la velocidad de MMC. Los agentes preferidos disminuirán dos o más de estos parámetros, por ejemplo, disminuirán la velocidad de MMC y la frecuencia de MMC o disminuirán la frecuencia de MMC y la presión intraluminal (por ejemplo, PPr) o disminuirán la velocidad de MMC y la presión intraluminal (por ejemplo, PPr). Los agentes más preferidos disminuirán todos estos parámetros, por ejemplo, disminuirán la frecuencia de MMC, la velocidad de MMC y la presión intraluminal (por ejemplo, PPr). El análisis de motilidad puede evaluarse 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 de intestino grueso, por ejemplo, colon.

35 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un agente seleccionado mediante el método de las realizaciones o una composición tal como se definió anteriormente para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto.

40 Un aspecto relacionado de las realizaciones define el uso de un agente seleccionado mediante el método de las realizaciones, por ejemplo, que puede obtenerse mediante el método de selección según las realizaciones, o una composición tal como se definió anteriormente para la fabricación de un medicamento, un producto alimenticio o un complemento alimenticio para reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto.

45 Otro aspecto relacionado de las realizaciones define un método de reducción o prevención del dolor gastrointestinal en un sujeto. El método comprende administrar una cantidad eficaz de un agente seleccionado mediante el método de las realizaciones, por ejemplo, que puede obtenerse mediante el método de selección según las realizaciones, o una composición tal como se definió anteriormente para el sujeto.

50 En una realización de estos aspectos, el agente es una cepa bacteriana, preferiblemente una cepa de bacterias del ácido láctico y más preferiblemente una cepa de *Lactobacillus reuteri*, tal como una cepa bacteriana que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1, preferiblemente una cepa de bacterias del ácido láctico que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 y más preferiblemente una cepa de *Lactobacillus reuteri* que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1.

55 En una realización de estos aspectos, el agente es preferiblemente *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. En otra realización, el agente es otra cepa de bacterias del ácido láctico, es decir el agente es una cepa de bacterias del ácido láctico distinta de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, preferiblemente una cepa de *Lactobacillus reuteri* distinta de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

60 En una realización de estos aspectos, el agente es un medio acondicionado de una cepa bacteriana, preferiblemente de una cepa de bacterias del ácido láctico y más preferiblemente de una cepa de *Lactobacillus reuteri*, tal como un medio acondicionado de una cepa bacteriana que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1, preferiblemente de una cepa de bacterias del ácido láctico que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1 y más preferiblemente de una cepa de *Lactobacillus reuteri* que puede reducir la activación espontánea y/o inducida de TRPV1.

65

- 5 En una realización, el agente es un medio acondicionado de cepas de bacterias del ácido láctico, preferiblemente de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 o una cepa de *Lactobacillus reuteri* distinta de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. El medio usado para tal medio acondicionado puede ser cualquier medio apropiado para cultivar cepas de bacterias del ácido láctico conocido en la técnica. En una realización, se usa medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) como material de partida para producir medio acondicionado de cepas de bacterias del ácido láctico, preferiblemente de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. En una realización de la invención, se liofiliza medio acondicionado de cepas de bacterias del ácido láctico, preferiblemente de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, antes de introducirse en o usarse como una composición.
- 10 En otra realización, se aísla uno o varios componentes del medio acondicionado de cepas de bacterias del ácido láctico, preferiblemente de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, y se administran como componentes purificados y/o enriquecidos a un sujeto en forma de una composición adecuada. Los ejemplos de tales componentes incluyen proteínas, péptidos, enzimas y otras moléculas preferiblemente secretadas de la cepa de bacterias del ácido láctico en el medio. También pueden usarse tales componentes extraídos directamente de las cepas de bacterias del ácido láctico según las realizaciones.
- 15 Se elige un modo apropiado de administración y formulación del agente o la composición dependiendo del sitio de la enfermedad. Un modo preferido de administración es por vía oral, sin embargo, serán igualmente apropiados para algunos tratamientos la inyección intravenosa o intramuscular.
- 20 Las dosis apropiadas del agente o la composición pueden elegirse o determinarse fácilmente por el experto en la técnica dependiendo del trastorno que va a tratarse, el modo de administración y la formulación en cuestión.
- 25 En una realización, el receptor TRPV1 se modula de manera local, por ejemplo, usando bacterias del ácido láctico administrada por vía oral que pueden modular la activación de TRPV1 de manera selectiva en el tracto gastrointestinal, en un sujeto que padece dolor gastrointestinal y, por tanto, se minimiza cualquier efecto secundario en dicho sujeto. Se cree que esta vía de administración preferida del agente, en particular una cepa de bacterias del ácido láctico seleccionada mediante el método de las realizaciones, afectará principalmente a la activación de TRPV1 de manera local, es decir dentro del aparato digestivo. Por tanto, el agente tendrá entonces un efecto beneficioso en la prevención o reducción del dolor gastrointestinal a la vez que se minimiza cualquier modulación de TRPV1 no deseada fuera del aparato digestivo.
- 30 En los métodos y usos de las presentes realizaciones descritos en el presente documento, los términos "aumentar", "disminuir", "reducir", etc., se refieren a cambios en niveles que pueden medirse, preferiblemente un cambio significativo en los niveles, más preferiblemente un cambio estadísticamente significativo, preferiblemente con un valor de probabilidad de $\leq 0,05$.
- 35 Los sujetos preferidos son mamíferos, más preferiblemente seres humanos.
- 40 Cuando el trastorno de motilidad intestinal asociado con el dolor gastrointestinal que va a tratarse es estreñimiento, entonces los sujetos preferidos son pacientes de edad avanzada o mujeres embarazadas. En general, se entenderá que un paciente de edad avanzada es un paciente de 70 años o más.
- 45 Cuando el trastorno de motilidad intestinal asociado con el dolor gastrointestinal que va a tratarse es cólico, preferiblemente este es cólicos del lactante.
- 50 Los usos de los agentes, preferiblemente cepas de bacterias del ácido láctico, seleccionados según el método de las realizaciones, incluyen la reducción, la prevención o el alivio del trastorno o los síntomas del trastorno relevantes (por ejemplo, puede dar como resultado la modulación de los síntomas de la enfermedad). Tal reducción, prevención o alivio de un trastorno o síntomas del mismo puede medirse mediante cualquier ensayo apropiado.
- 55 Es un objetivo de una realización encontrar agentes, tales como bacterias del ácido láctico, incluyendo partes o metabolitos de las mismas, tales como los presentes en o los extraídos de un medio acondicionado, adecuados para el tratamiento, la reducción, la prevención o la modulación del dolor gastrointestinal en, por ejemplo, trastornos de motilidad específicos y/u otros trastornos/enfermedades de dolor gastrointestinal, usando el modelo en el presente documento basándose en el efecto del agente sobre la actividad espontánea y/o inducida de TRPV1.
- 60 En una realización, el objetivo es seleccionar una cepa bacteriana probiótica, tal como cepa de bacterias del ácido láctico, que puede ser eficaz en evitar o reducir el dolor gastrointestinal asociado con el estreñimiento en seres humanos, especialmente sujetos de edad avanzada o mujeres embarazadas.
- En una realización, el objetivo es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa de bacterias del ácido láctico, que puede ser eficaz en evitar o reducir el dolor gastrointestinal asociado con cólicos del lactante.
- 65 En una realización, el objetivo es seleccionar un agente, por ejemplo, una cepa de bacterias del ácido láctico, que puede ser eficaz en tratar, evitar o reducir los síntomas del dolor gastrointestinal del síndrome del intestino irritable

(IBS).

Los siguientes son algunos ejemplos de las realizaciones, que no pretenden ser limitativos del uso de las realizaciones en el presente documento sino mostrar ejemplos prácticos en detalle de cómo puede usarse la invención. El ejemplo 1 se refiere a un experimento de haces nerviosos mesentéricos que muestra que DSM 17938 inhibe la frecuencia de descarga del nervio mesentérico. El ejemplo 2 muestra que DSM 17938 bloquea el flujo de entrada de calcio inducido por capsaicina en cultivos primarios de DRG. El ejemplo 3 demuestra que DSM 17938 inhibe la reducción de la frecuencia cardíaca provocada por la distensión gástrica.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Experimentos de haces nerviosos mesentéricos

Registros extracelulares

Se adquirieron ratones Swiss Webster macho adultos (20-30 g) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los ratones se sacrificaron mediante luxación cervical. Todos los procedimientos subsiguientes fueron *ex vivo*.

Se extirparon segmentos de la porción distal del yeyuno (~2,5 cm) con tejido mesentérico unido de animales recién sacrificados y se colocaron en una placa de Petri recubierta con Sylgard llena con tampón de Krebs (en mM): NaCl 118, KCl 4,8, NaHCO₃ 25, NaH₂PO₄ 1,0, MgSO₄ 1,2, glucosa 11,1 y CaCl₂ 2,5, burbujeado con carbógeno (95% de O₂ - 5% de CO₂). Se insertó una cánula de tubo de plástico a los extremos oral y anal de cada segmento y se vaciaron. El tejido se fijó al Sylgard, y se expuso el haz nervioso mesentérico. La placa de Petri se colocó sobre la platina de un microscopio invertido y la luz se perfundió por gravedad a 0,5-1 ml/min con Krebs oxigenado o Krebs con aditivos (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). El compartimento seroso se perfundió de manera separada con Krebs calentado previamente (34°C) a 3-5 ml/min. El haz nervioso se succionó con cuidado en una pipeta de vidrio unida a un portaelectrodos de registro electrofisiológico de fijación de voltaje (CV-7B; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), y se realizaron registros de los nervios extracelulares usando un amplificador Multi-Clamp 700B y un convertidor de señales Digidata 1440A (Molecular Devices). Las señales eléctricas se filtraron por paso de banda a 0,1-2 kHz, se muestrearon a 20 kHz y se almacenaron en un ordenador personal que ejecuta el software pClamp 10 (Molecular Devices). Se realizaron repetidas distensiones de segmentos elevando la presión intraluminal por encima de 2 hPa. Se aplicó un cabezal de presión de gravedad constante de 48 hPa al Krebs que perfunde el lumen y se elevó la presión cerrando el tubo de salida durante 1 min a un máximo de 3 distensiones consecutivas. Se dejaron reposar los segmentos durante 9 min entre distensiones. Se registró la actividad eléctrica de unidades múltiples constitutivas en ausencia de presión intraluminal positiva.

Vagotomía

La vagotomía subdiafragmática se llevó a cabo tal como se describió anteriormente (van der Kleij H, O'Mahony C *et al.* American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 2008;295:R1131-7). Se permitió que los animales se recuperaran durante 10-14 días antes de recoger el yeyuno y tejido mesentérico para experimentos electrofisiológicos. Se realizaron vagotomías simuladas en 3 animales. Después de la operación, se midieron diariamente el peso corporal y la salud general de los ratones. No se encontró evidencia de diferencias significativas en aumento de peso 1 semana tras la cirugía en animales o bien sometidos a vagotomía o bien tratados de manera simulada (datos no mostrados). Todos los ratones sometidos a vagotomía se sometieron a prueba para completar el procedimiento registrando después de cada experimento las respuestas a la aplicación serosa de colecistoquinina (CCK). Sólo se consideró que la vagotomía había sido eficaz cuando la CCK no aumentó la tasa de descarga del nervio mesentérico (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20).

Fármacos y bacterias

DSM 17938 se donaron por BioGaia AB (Estocolmo, Suecia), mientras que *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 se tomaron de una reserva en el Instituto Brian-Body de la Universidad McMaster (Ontario, Canadá). Todos los procedimientos fueron tal como se notificó previamente (Kunze WA, Mao YK *et al.*, Journal of cellular and molecular medicine 2009;13:2261-70, Ma X, Mao YK *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2009;296:G868-75, Wang B, Mao YK, FASEB journal: publicación oficial de la Federación de Sociedades Americana de Biología Experimental 2010;24:4078-88). Los números bacterianos se determinaron mediante inspección visual, y la viabilidad se comprobó después de la siembra en placas de agar con medio de crecimiento. Se descongelaron bacterias de reservas congeladas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min y se suspendió el sedimento en Krebs y de nuevo se centrifugó y se volvió a suspender. Antes de su uso, las bacterias se diluyeron hasta concentraciones de trabajo con Krebs. Se obtuvo colecistoquinina (25-33) sulfatada (CCK) de AnaSpec (Fremont, CA); nicardipina, capsaicina y 6-yodonordihidrocapsaicina de Sigma-Aldrich y ω -conotoxina GVIA (ω -Cg-GVIA) y ω -

conotoxina MVIIC (ω -Cg-MVIIC) de Alomone Labs (Jerusalén, Israel). Se disolvieron 6-yodonordihidrocapsaicina y CCK en DMSO; se disolvió capsaicina en etanol para preparar alícuotas de disolución de reserva. El día del experimento, se diluyeron las alícuotas en Krebs hasta concentraciones de trabajo con concentraciones finales de DMSO y de etanol de $\leq 0,01\%$ y $\leq 0,1\%$, respectivamente.

5

Análisis de datos fuera de línea

Las frecuencias de descarga espontánea de unidades individuales y múltiples se midieron usando el software Clampfit 10.2 (Molecular Devices) y Origin 8.5 (Northampton, MA). Los registros máximos de unidades individuales y múltiples se usaron de manera rutinaria para determinar los cambios en las tasas de descarga de las fibras nerviosas mesentéricas inducidos mediante la exposición del intestino a diferentes estímulos o agentes farmacológicos (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). Los momentos de los máximos en el registro de unidades múltiples se determinaron usando el módulo de detección de máximos de Clampfit, y se calculó la frecuencia de descarga promedio a partir de los intervalos entre máximos. Las unidades individuales se extrajeron de la señal de unidades múltiples haciendo coincidir la forma de máximo usando la herramienta de detección de plantilla de forma de máximo de Clampfit (análisis computarizado de forma de onda). Después de la ejecución del algoritmo de detección de plantilla, se comprobó siempre la discriminación de máximos de unidades individuales mediante inspección visual, y se descartaron los casos de máximos no coincidentes ($\leq 0,2\%$) (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20).

10

15

20

Estadística

Los datos se expresan como medias \pm DE, con N refiriéndose al número total de los segmentos de yeyuno registrado, y n refiriéndose al número de actividad de fibras individuales extraídas de registros de unidades múltiples. Se extrajo un máximo de 6 unidades individuales de cada registro de múltiples unidades. Se usaron las pruebas de Wilcoxon o de la t de datos independientes para comparaciones de datos emparejados o no emparejados, respectivamente; se usaron ANOVA de una vía y de dos vías con prueba de Bonferroni *a posteriori* para comparar múltiples grupos según corresponda. Dado que pueden producirse grandes variaciones en la actividad espontánea entre una preparación y otra en la actividad nerviosa de unidades múltiples, se emparejaron las comparaciones antes y después de los registros de tratamiento realizados en los que cada haz nervioso sirvió como su propio control para garantizar cambios significativos en cada tratamiento o dosis de fármaco. Se representó gráficamente el porcentaje de aumento en la descarga por encima de la frecuencia inicial frente a la concentración de capsaicina (en presencia o ausencia de bacterias) y esto se ajustó mediante una ecuación logística de dosis-respuesta [$Y = \text{parte inferior} + (\text{parte superior} - \text{parte inferior}) / (1 + 10^{\text{LogCE50-X}})$]. Los parámetros que describen los ajustes logísticos se compararon usando una prueba F de suma de cuadrados extra. Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el software Prism 5.0 (Graph-Pad software, San Diego, CA).

25

30

35

Efectos de DSM 17938 sobre la frecuencia de descarga espontánea del nervio mesentérico

DSM 17938 luminal influyó en la descarga espontánea de unidades múltiples del nervio mesentérico (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 intraluminal provocaron una disminución en la frecuencia de descarga espontánea de unidades múltiples en un 22% desde $36,3 \pm 8,4$ hasta $28,2 \pm 7,2$ Hz ($N = 7$, $P = 0,02$, figura 1A); DSM 17938 a 1×10^8 ufc/ml cambió la descarga espontánea en un 19% desde $21,6 \pm 5,1$ hasta $17,6 \pm 6$ Hz, $N = 6$, $P = 0,09$, figura 1B). El medio acondicionado con DSM 17938 (1:5) también disminuyó la descarga espontánea en un 37% desde $22,6 \pm 4,2$ hasta $14,17 \pm 2,4$ Hz ($N = 7$, $P = 0,03$, figura 1C). Sin embargo, DSM 17938 destruido por irradiación y o caldo solo no disminuyó la excitabilidad aferente: desde $17,84 \pm 5,3$ hasta $18,25 \pm 4,1$ Hz ($N = 6$, $P = 0,84$), y desde $20,48 \pm 1,6$ hasta $21,49 \pm 2,8$ Hz ($N = 6$, $P = 0,10$), respectivamente (figuras 1D-E).

40

45

50

La vagotomía y la parálisis muscular no inhibieron la reducción por DSM 17938 de la descarga espontánea del nervio mesentérico

Se investigó si el efecto de 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 sobre la descarga espontánea se suprimió por vagotomía. Para controlar las posibles acciones directas de DSM 17938 en células de músculo liso, se añadió en este y en todos los experimentos posteriores de descarga espontánea el bloqueador de canales de Ca^{2+} de tipo L nicardipina ($3 \mu\text{M}$) que inhibe las contracciones musculares. Por tanto, después de la vagotomía y de la adición de nicardipina, DSM 17938 redujo la frecuencia de descarga de unidades múltiples en un 18% desde $16,72 \pm 1,9$ hasta $13,77 \pm 1,9$ Hz ($N = 17$, $P = 0,001$, figura 2A, 2C). A continuación, se analizaron los datos de los animales sometidos a vagotomía y con músculos paralizados con respecto a las tasas de descarga de unidades individuales. DSM 17938 redujo la frecuencia de descarga de unidades individuales en un 19% desde $0,36 \pm 0,05$ hasta $0,29 \pm 0,03$ Hz ($n = 30$, $P = 0,02$, figura 2B, 2C); de estas fibras, la mayoría (20/30) mostró una disminución en la frecuencia del 36% desde $0,42 \pm 0,06$ hasta $0,27 \pm 0,04$ Hz ($P < 0,0001$), pero la fracción más pequeña de fibras restantes aumentó su tasa de descarga en un 29% desde $0,24 \pm 0,04$ hasta $0,31 \pm 0,06$ Hz ($n = 10/30$, $P = 0,006$).

55

60

65

DSM 17938 disminuyó la frecuencia de descarga de unidades múltiples espinales y la respuesta a la capsaicina

mediante antagonismo parcial insuperable de los receptores TRPV1

Se sometió a prueba si DSM 17938 podía modificar el aumento de frecuencia de descarga inducida por capsaicina en la excitación de unidades individuales en tejidos tomados de ratones previamente sometidos a vagotomía. La capsaicina aplicada al compartimento seroso aumentó la tasa de descarga espontánea de unidades individuales y múltiples, con latencias de aparición de ~60 s y de una manera dependiente de la dosis. Dado que los receptores sensibles a capsaicina TRPV1 se desensibilizan, y aplicaciones posteriores del agonista pueden dar lugar a un efecto disminuido, se examinaron las respuestas a un intervalo de dosis de capsaicina (100 nM-100 μ M) en segmentos de yeyuno individuales. Esto se realizó con y sin 20 min de aplicación intraluminal previa de 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 ($N=25$ para cada curva, 5 segmentos por cada concentración; se analizaron ~6 unidades individuales espinales para cada segmento). Se representó gráficamente el porcentaje de aumento en la frecuencia de descarga frente a la concentración de capsaicina o concentración de capsaicina más DSM 17938 y se ajustó con una ecuación logística de tres parámetros de la forma $Y = \text{parte inferior} + (\text{parte superior} - \text{parte inferior}) / (1 + 10^{\text{LogCE50} - X})$. La CE50 para capsaicina sola fue de 200 nM en comparación con 500 nM para capsaicina en presencia de DSM 17938 ($P = 0,71$). La respuesta máxima (parte superior) obtenida con capsaicina fue de $238,4 \pm 27,5\%$ frente a $129 \pm 17\%$ obtenida con capsaicina más DSM 17938 ($P = 0,004$, figura 3A). Según informes previos, algunas fibras espinales no se excitaron por la capsaicina. Se examinó si la capsaicina excitaba fibras espinales directamente, o si la excitación dependía de la transmisión sináptica intraparietal desde neuronas entéricas hasta terminaciones nerviosas intraganglionares. Se añadió capsaicina $1 \mu\text{M}$ en el compartimento seroso después de que la transmisión sináptica intraparietal se bloqueara al añadir 500 nM de cada uno de los bloqueadores de Ca^{2+} ω -Cg-GVIA y ω -Cg-MVIIC. El bloqueo sináptico intraparietal no disminuyó la excitación provocada por la capsaicina que fue de $187,5 \pm 42,9\%$ ($n = 17$) en ausencia de las conotoxinas y de $219,1 \pm 72,6$ ($n = 12$) en su presencia ($P = 0,947$, figura 3B). Se concluyó que la acción de DSM 17938 sobre los aferentes espinales no implica transmisión sináptica intraparietal.

Los efectos del medio acondicionado con DSM 17938 que contiene productos de liberación de bacterias DSM 17938 redujeron las acciones de la capsaicina sobre las fibras espinales

Se sometió a prueba si los productos de bacterias DSM 17938 subyacen al antagonismo de TRPV1 en aferentes mesentéricos. La diana de DSM 17938 en los aferentes mesentéricos son predominantemente fibras espinales, dado que el porcentaje de reducción inducida por DSM 17938 de frecuencia de descarga espontánea fue muy similar con y sin vagotomía previa (el 18% frente al 22 %, respectivamente); a continuación, se aplicó capsaicina $1 \mu\text{M}$ en fibras mesentéricas no sometidas a vagotomía que recibieron una aplicación intraluminal previa de medio acondicionado con DSM 17938 durante 20 min. El medio acondicionado con DSM 17938 (1:5) inhibió el aumento de frecuencia de descarga inducida por capsaicina (%) en fibras individuales mesentéricas desde $187,5 \pm 43\%$ (grupo de control, $N = 17$) hasta $74,89 \pm 22\%$ ($N = 14$), y fue similar al porcentaje de aumento inducido por capsaicina en fibras espinales con tratamiento con 1×10^9 ufc/ml de DSM 17938 ($80,29 \pm 22\%$, $N = 17$) ($P = 0,02$, prueba ANOVA de una vía; figura 7).

DSM 17938 o el antagonismo de TRPV1 redujeron la descarga provocada por distensión

En ausencia de nicardipina para permitir la contracción muscular, se registró la frecuencia de descarga de unidades individuales y múltiples de fibras que se supone que son nociceptores (Grundy D, Gut 2004;53 Supl. 2:ii5-8). Se sometió a prueba si DSM 17938 podía reducir su respuesta excitadora provocada al elevar la presión intraluminal hasta una intensidad nociceptora de 48 hPa (36 mmHg) (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). La primera respuesta de estas fibras a la distensión del intestino es generalmente mayor que la obtenida con una distensión posterior, pero permanece constante durante hasta 3 distensiones adicionales (Perez-Burgos A., Wang B *et al.*, American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2013;304:G211-20). Por tanto, se usó la 2ª de 3 distensiones sucesivas para comparación. La descarga de unidades múltiples fue de $111,5 \pm 16,7$ Hz durante la distensión, pero después de añadir DSM 17938 durante 20 min, la distensión aumentó la descarga hasta sólo $86,5 \pm 10,6$ Hz ($N = 5$, $P = 0,31$). La frecuencia de descarga de unidades individuales espinales fue de $3,01 \pm 0,44$ Hz durante la distensión, pero en presencia de DSM 17938 la descarga fue de $1,71 \pm 0,16$ Hz durante la distensión ($n = 28$, $P = 0,008$, figura 4A). La frecuencia de descarga previa a la distensión fue de $0,31 \pm 0,05$ frente a $0,25 \pm 0,07$ Hz ($n = 28$, $P = 0,053$, figura 4A) para el control frente a DSM 17938 añadida. El antagonista de TRPV1 6-yodonordihidrocapsaicina ($10 \mu\text{M}$) imitó el efecto de DSM 17938 sobre la respuesta de unidades individuales disminuyendo la respuesta a la distensión desde $3,26 \pm 0,73$ hasta $2,23 \pm 0,50$ Hz ($n = 13$, $P = 0,0002$, prueba de Wilcoxon, figura 4B en ausencia de nicardipina).

Ejemplo 2

DSM 17938 bloqueó el aumento de Ca^{2+} inducido por capsaicina en cultivos primarios de neuronas DRG

Cultivos primarios de ganglios nerviosos de la raíz posterior (DRG)

La columna vertebral se retiró del cuerpo, se transfirió a un vaso de precipitados que contenía Krebs enfriado con

hielo y se bisecó longitudinalmente. Se expusieron las DRG y se recogieron de los niveles toracolumbares. Se lavaron dos veces las DRG completas con medio estéril L-15 de Leibovitz (GIBCO, Gaithersburg, MD) y se incubaron durante 40 min en colagenasa tipo 1 a 1 mg/ml (Sigma-Aldrich; Oakville, ON, Canadá) y 0,5 ml de tripsina (0,25%, GIBCO) en 20 ml de L-15 a 37°C. Después de la adición adicional de 5 ml de L-15 que contenía suero fetal bovino al 10% (FBS, GIBCO), los ganglios se centrifugaron durante 5 min a 1.000 rpm, después se lavaron dos veces con medio de crecimiento (L-15, que contenía FBS al 10%, penicilina/estreptomicina/glutamina al 1%, HEPES al 1% y piruvato de Na al 1%). Las DRG se colocaron en 2 ml de medio de crecimiento y se trituraron 10 veces. A continuación, se centrifugaron los ganglios durante 10 s a 500 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. Se volvieron a suspender en 2 ml de medio de crecimiento, se trituraron de manera repetida hasta que el volumen de sobrenadante transferido fue de 10 ml, se centrifugaron durante 5 min a 1.000 rpm y el sedimento final se volvió a suspender en 3 ml de medio de crecimiento. Las neuronas se sembraron en placa sobre 3 placas de Petri con fondo de vidrio recubiertas con poli-d-lisina (MatTek, Ashland, MA). Se añadieron 1,5 ml adicionales de medio de crecimiento a cada placa después de 30 min y se incubó todo durante 24 h a 37°C con carbógeno.

15 *Obtención de imágenes de Ca²⁺*

Las neuronas DRG se colocaron dentro de una placa de registro de plexiglás y se cargaron con el indicador de Ca²⁺ Fluo-4-AM (8 μM) diluido en Krebs con ácido plurónico al 0,1% (en DMSO) a 37°C durante 60 min. La placa se colocó en el compartimento de registro y se superfundió con Krebs nuevo (~34°C) durante 15 min para permitir el lavado del tinte. Se observaron las células en un microscopio invertido (Nikon eclipse TE 2000-S, Melville, NY) y se obtuvieron imágenes usando una cámara Rolera-XR (Surrey, BC, Canadá). Se registró la intensidad de fluorescencia en neuronas individuales mediante el software Simple PCI 6 (Compix Inc, Imaging systems, Sewickley, PA). Se administraron fármacos a través de una micropipeta unida a un impulsor de presión controlado electrónicamente (Picospritzer II; General Valve, Fairfield, NJ) con la punta de <100 μm de la célula. Las imágenes, registradas a 0,9 fotogramas/s, se almacenaron en un disco duro local. Se analizaron fuera de línea los archivos de imágenes usando el software Image J (NIH, EE.UU., <http://imagej.nih.gov/ij>). El aumento en Fluo-4 Ca²⁺ cuando se aplicó capsaicina se midió como la razón (F/F₀) de intensidad de fluorescencia después de capsaicina (F) dividido por la intensidad antes de capsaicina (F₀). Las bacterias y los fármacos se manipularon como en el ejemplo 1.

30 *Resultados*

La especificidad del efecto de DSM 17938 sobre las neuronas espinales se investigó adicionalmente sometiendo a prueba la capacidad de las bacterias en la inhibición de la respuesta del agonista del receptor TRPV1 capsaicina. En estos experimentos, también se incluyó JB-1. JB-1 (*Lactobacillus rhamnosus*) ha mostrado previamente que reduce el dolor y la descarga de fibras individuales de DRG inducida por distensión gástrica (Duncker *et al.*, The Journal of Nutrition 2011). Dado que la apertura de los canales de TRPV1 aumenta la concentración de Ca²⁺ intracelular, se usó la obtención de imágenes de Ca²⁺ de cultivo primario de neuronas DRG para estos experimentos. Al impulsar capsaicina 1 μM sobre las neuronas DRG se provocó un aumento en Ca²⁺ intracelular en un plazo de ~30 s (figura 5A). Dado que el canal de TRPV1 puede desensibilizarse con exposiciones repetidas de ligando, sólo se aplicó capsaicina una vez a cada placa de cultivo. A continuación, se añadió o bien DSM 17938 o bien JB-1 30 min antes de aplicar capsaicina. DSM 17938 a 1x10⁹ ufc/ml disminuyó la razón de aumento de fluorescencia F/F₀ desde 2,36 ± 0,31 (grupo de control, N = 14) hasta 1,25 ± 0,04. En cambio, 1x10⁸ ufc/ml de DSM 17938 cambió F/F₀ a 2,67 ± 0,35 y 1x10^{8,5} ufc/ml de DSM 17938 a 2,07 ± 0,27. La adición de 1x10⁹ ufc/ml de JB-1 tuvo un pequeño efecto y cambió la razón F/F₀ a 2,48 ± 0,19 (N = 9), que es similar a la razón obtenida con capsaicina sola (figura 5B). Estos resultados demuestran que DSM 17938 puede bloquear el aumento de Ca²⁺ inducido por capsaicina en cultivos primarios de neuronas DRG.

Ejemplo 3

50 *DSM 17938 inhibió la disminución de la frecuencia cardíaca provocada por distensión gástrica*

Se asignaron un total de 17 ratas a 2 grupos. A su llegada, se permitió que las ratas se aclimataran durante 1 semana seguido por la manipulación durante 1 semana (10 min/d) para minimizar efectos de estrés durante los experimentos. A las ratas se les alimentó por sonda cada mañana durante 9 d con o bien 0,2 ml (1x10⁹ ufc/ml) de DSM 17938 vivas en Krebs o bien Krebs solo como control (vehículo). Los métodos para GD se han publicado anteriormente (Tougas, Wang, American Journal of Physiology 1999;277:R272-8). De manera breve, se privó de alimentos a las ratas durante la noche, se anestesiaron con una mezcla de clorhidrato de ketamina (75 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal) por vía intraperitoneal. Se proporcionó anestesia complementaria según fuera necesario. Después de una laparotomía en la línea media, se insertó un dispositivo de distensión que consistía en un globo gástrico con forma de bola (d.i. de 2 cm) fijado a un catéter de Teflon (20 cm) en el estómago a través de una pequeña incisión en la zona proximal del duodeno y se conectó a un sistema de baróstato (Distender, G&J Electronic, Toronto, Canadá). Se midió la respuesta cardíaca a medida que se inflaba el globo con aire a presiones de 40 y 60 mmHg durante 60 s. Se permitieron diez minutos de descanso para la recuperación después de cada distensión. Se aplicó sólo un conjunto de distensiones a cada rata para evitar posibles mecanismos compensatorios y se sacrificaron las ratas después de las mediciones antes de que recuperaran la conciencia. Se realizaron registros continuos de frecuencia cardíaca a través de un

5 electrocardiograma de superficie que consistía en 3 electrodos de aguja aplicados a los hombros izquierdo y derecho y a las patas traseras derechas. Se amplificó la señal y se registró en un ordenador personal usando un programa de adquisición de datos comercial (Experimenter's Workbench, DataWave Technologies, Loveland, CO). Se midió la frecuencia cardiaca 60 s antes, durante y después de cada distensión durante un total de 180 s. El registro de la frecuencia cardiaca (FC) antes de cada distensión permitió la corrección de posibles cambios del valor inicial debido a variaciones en los niveles de anestesia y garantizó que cualquier respuesta de frecuencia cardiaca podía estar ligada a la distensión. Para controlar el efecto de GD a lo largo del tiempo, los datos se presentaron como cambio medio de la FC en reposo (100% = reposo) usando la FC media registrada durante un periodo de 10 s durante la distensión (10, 20, 30, 40, 50 y 60 s). Los grupos se compararon usando la media de los cambios de FC (porcentaje de FC en reposo) en todas las ratas del mismo grupo durante los 60 s de cada distensión (40 y 60 mmHg). Las bacterias y los fármacos se manipularon como en el ejemplo 1.

Resultados

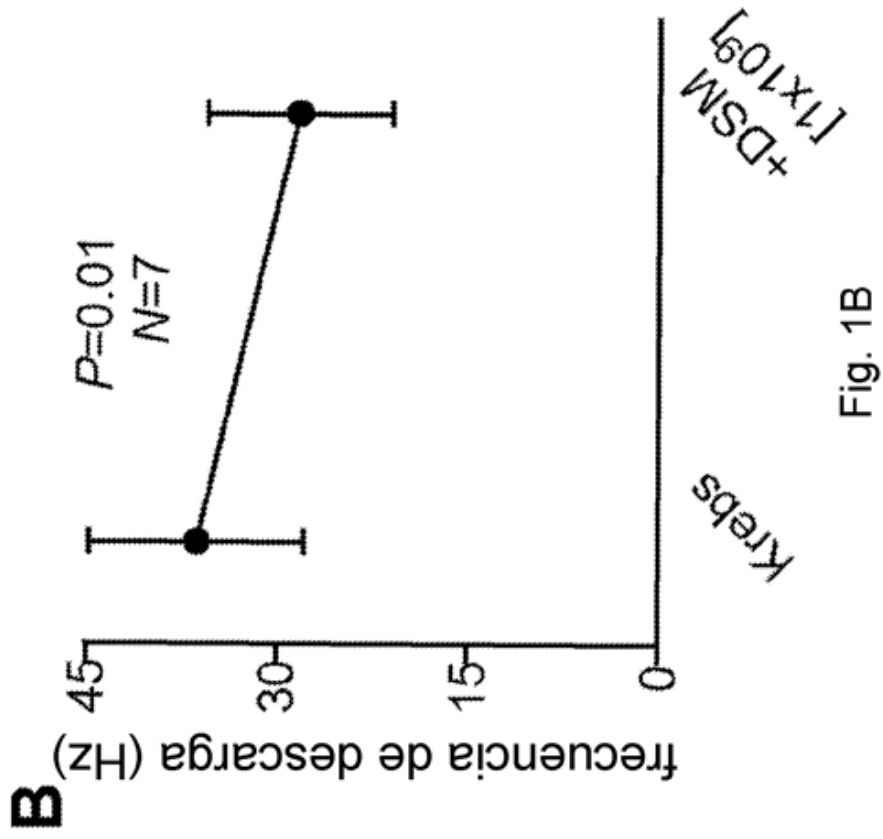
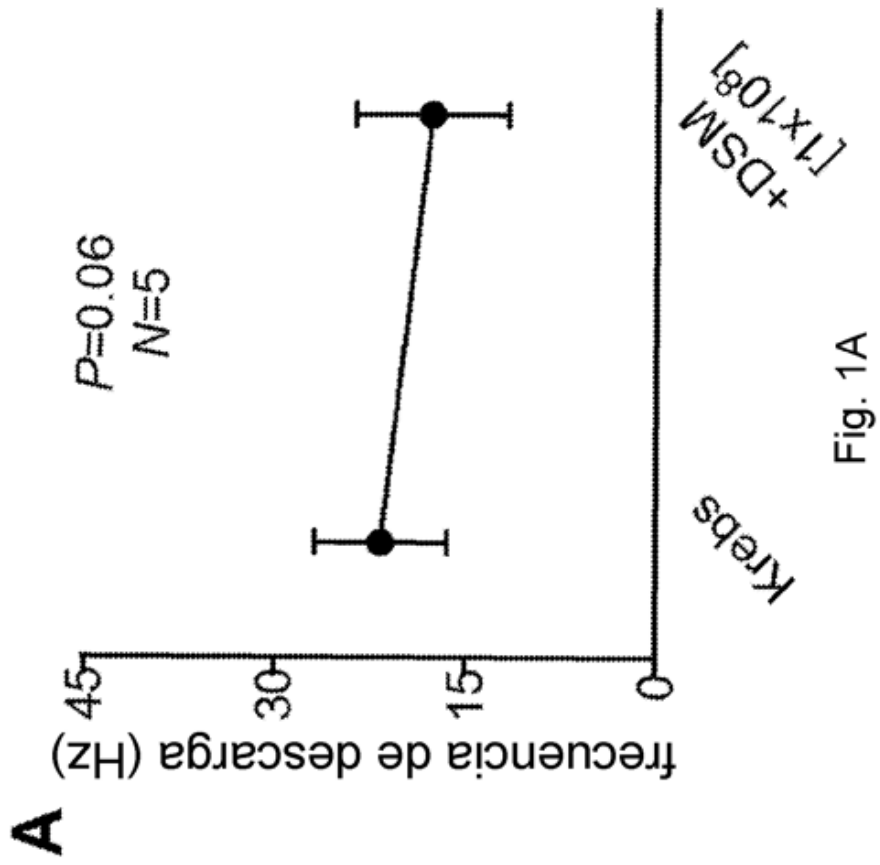
15 La disminución en la frecuencia cardiaca provocada por 40 mmHg no se cambió al alimentar por sonda DSM 17938 ($P = 0,121$, figura 6A) ($N = 8$ y 9 con vehículo y DSM 17938, respectivamente). La insuflación con 60 mmHg disminuyó la frecuencia cardiaca en un plazo de 10 s que persistió durante 30 s durante la distensión (figura 6B). La alimentación por sonda con DSM 17938 durante 9 d antes de la prueba moderó la respuesta a 60 mmHg ($P = 0,028$, prueba de la t para datos independientes, figura 6A, 6B). La distensibilidad gástrica (volumen/presión) no difirió entre animales tratados con vehículo o DSM 17938, para presiones de distensión gástrica de 40 ó 60 mmHg (datos no mostrados). Estos resultados demuestran un efecto antinociceptor de las bacterias.

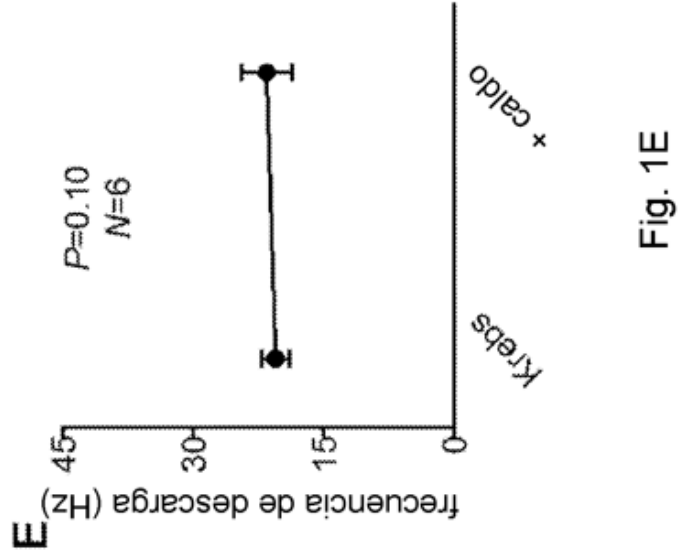
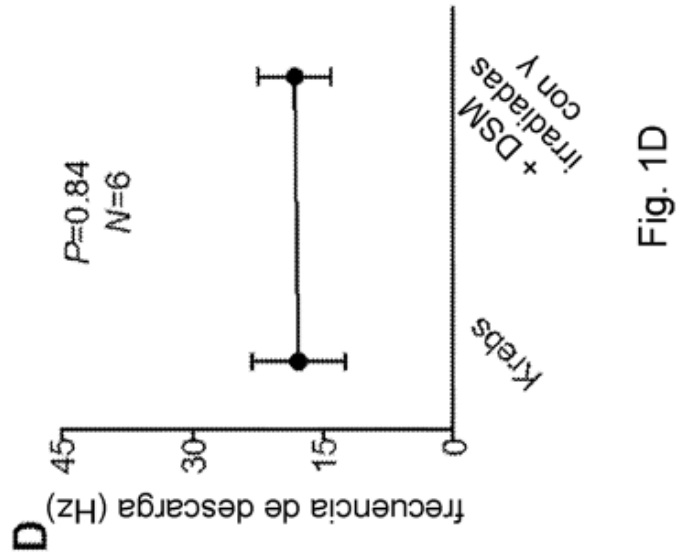
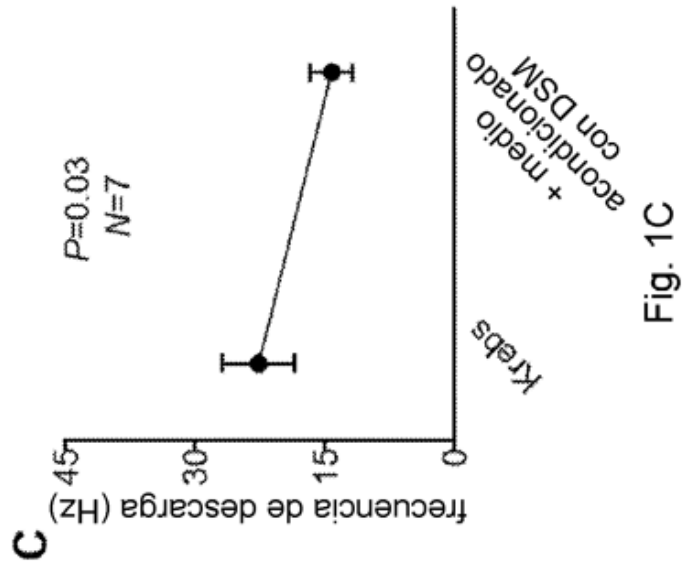
REIVINDICACIONES

1. Método para seleccionar un agente para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto, comprendiendo dicho método:

5 poner en contacto una célula que expresa TRPV1 con una cepa de *Lactobacillus reuteri* o un medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* que va a someterse a prueba; medir la activación espontánea y/o inducida del receptor de potencial transitorio vaniloide 1, TRPV1, en dicha célula tras poner en contacto dicha célula con dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* o dicho medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* que va a someterse a prueba; compararla dicha activación espontánea y/o inducida de TRPV1 medida con una activación de TRPV1 de control; y seleccionar, como dicho agente, dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* o dicho medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* que va a someterse a prueba como cepa de *Lactobacillus reuteri* o medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* eficaz en reducir o evitar el dolor gastrointestinal si dicha activación espontánea y/o inducida de TRPV1 medida es menor que dicha activación de TRPV1 de control.
2. Método según la reivindicación 1, en el que medir dicha activación espontánea y/o inducida de TRPV1 comprende medir el flujo de entrada de Ca²⁺ en dicha célula inducida por capsaicina, cambio de pH y/o calor.
3. Método para seleccionar un agente para su uso en reducir o evitar el dolor gastrointestinal en un sujeto, comprendiendo dicho método:

25 poner en contacto un segmento gastrointestinal *ex vivo* con tejido mesentérico unido con una cepa de *Lactobacillus reuteri* o un medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* que va a someterse a prueba; medir la descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida en dicho segmento gastrointestinal *ex vivo* tras poner en contacto dicho segmento gastrointestinal *ex vivo* con dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* o dicho medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* que va a someterse a prueba; comparar dicha descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida medida con una descarga aferente mesentérica de control; y seleccionar, como dicho agente, dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* o dicho medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* que va a someterse a prueba como cepa de *Lactobacillus reuteri* o medio acondicionado de dicha cepa de *Lactobacillus reuteri* eficaz en reducir o evitar el dolor gastrointestinal si dicha descarga aferente mesentérica espontánea y/o inducida medida es menor que dicha descarga aferente mesentérica de control.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sujeto padece un trastorno de motilidad intestinal que provoca dicho dolor gastrointestinal en dicho sujeto.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto padece una enfermedad seleccionada de un grupo que consiste en cólico, síndrome del intestino irritable y estreñimiento que provoca dicho dolor gastrointestinal en dicho sujeto.





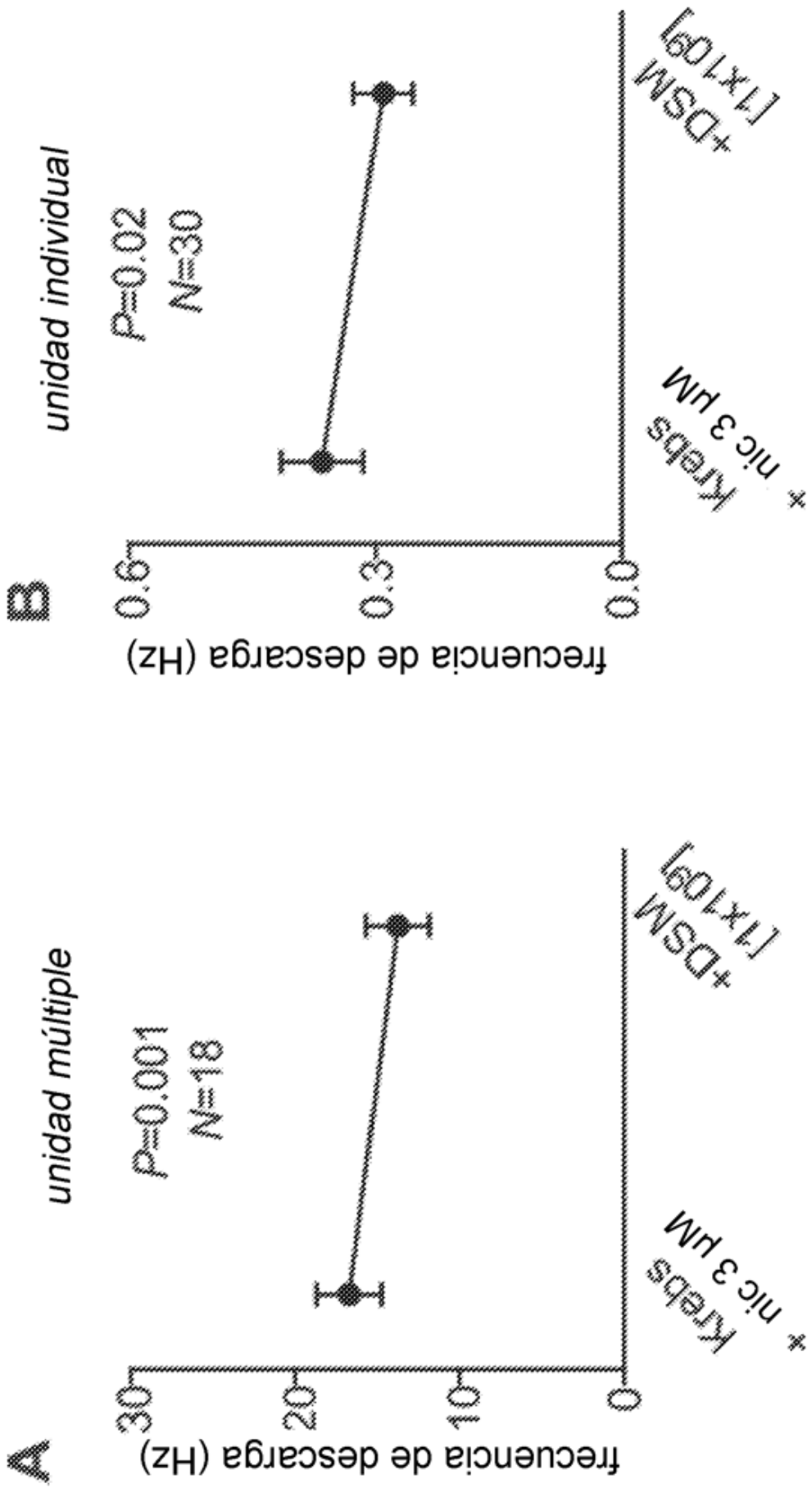


Fig. 2A

Fig. 2B

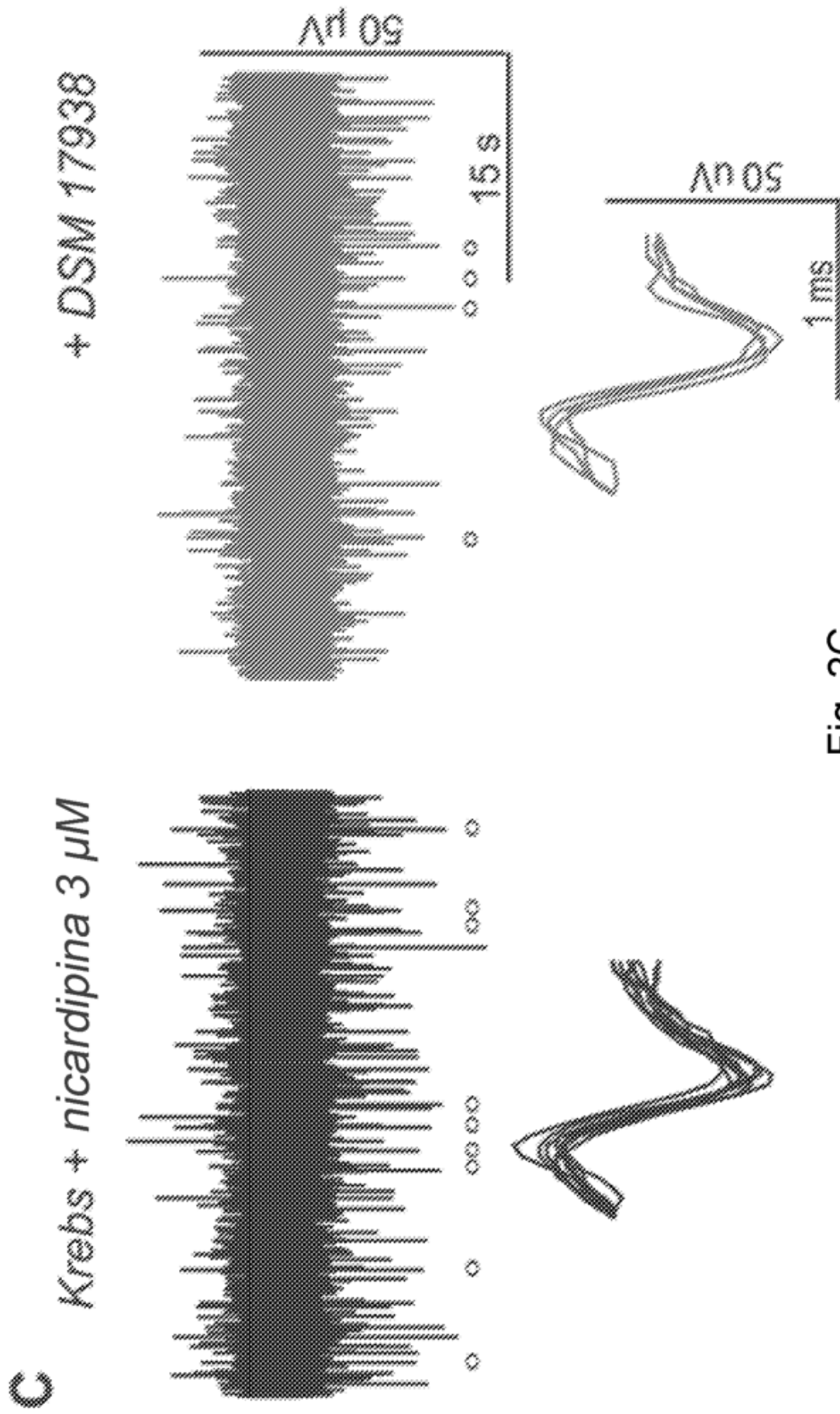


Fig. 2C

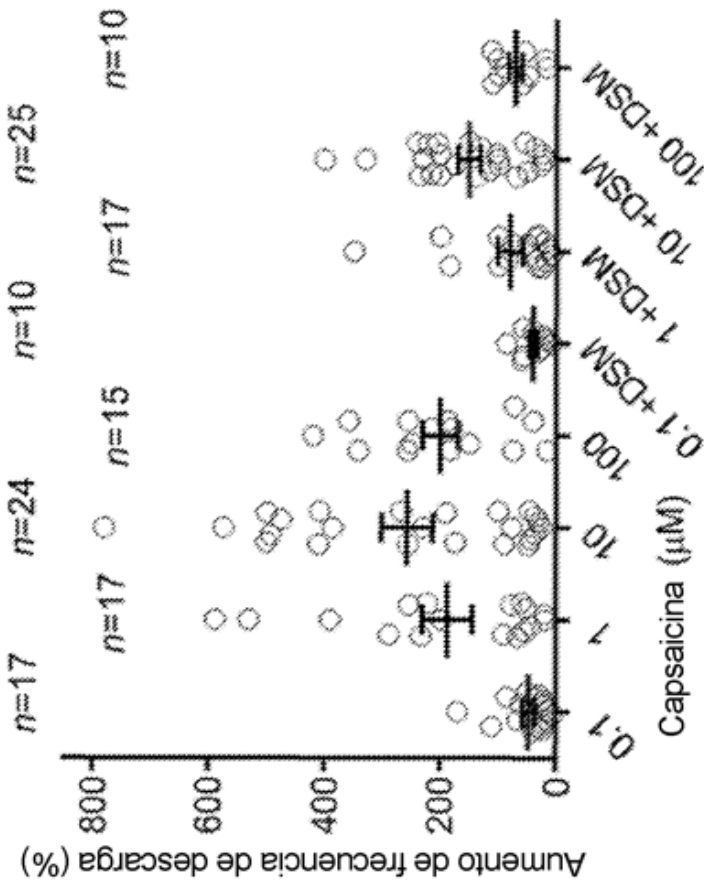


Fig. 3B

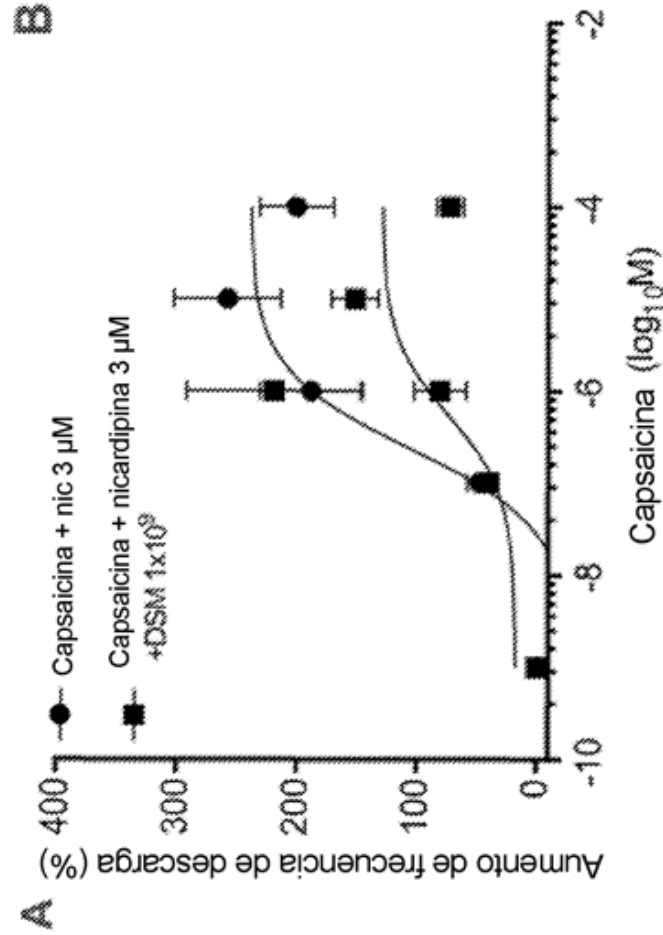


Fig. 3A

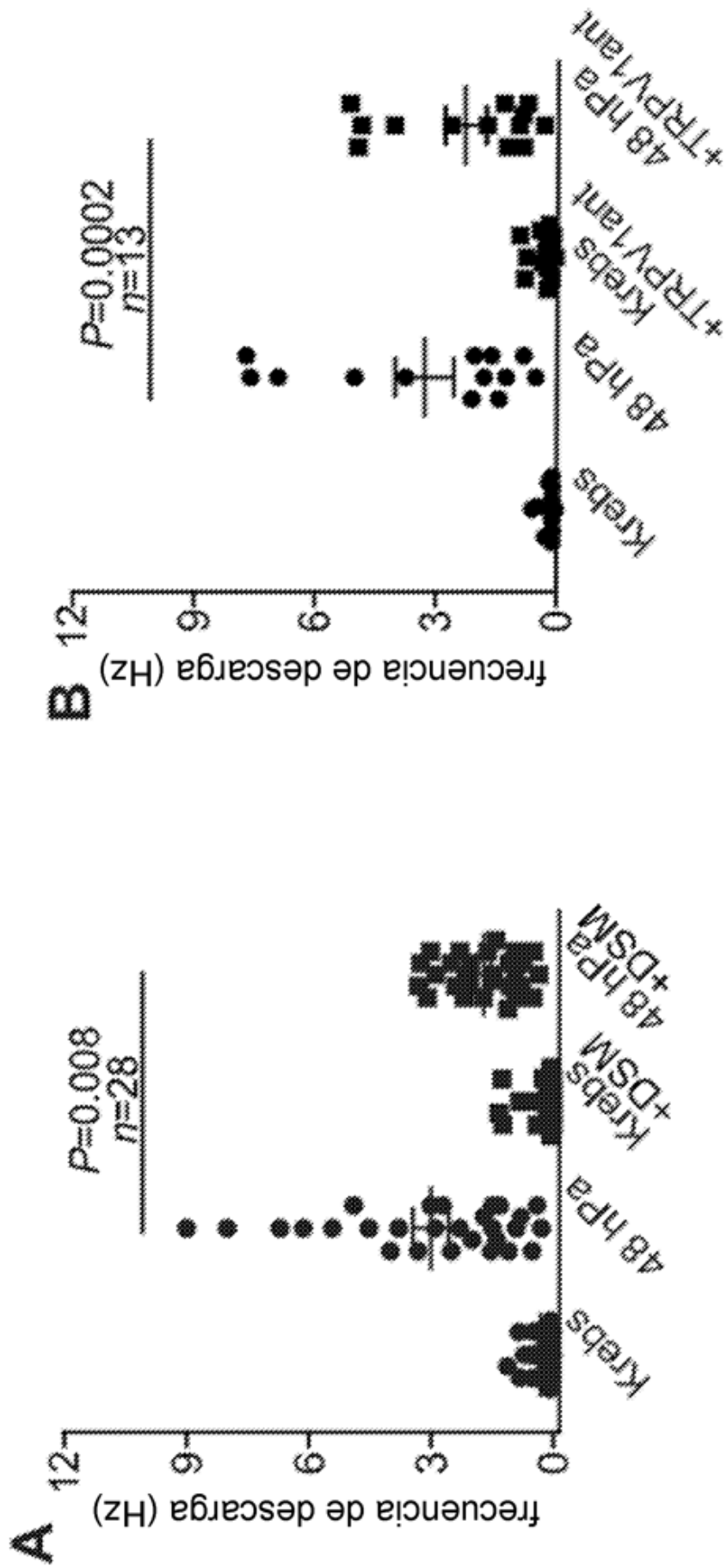


Fig. 4A

Fig. 4B

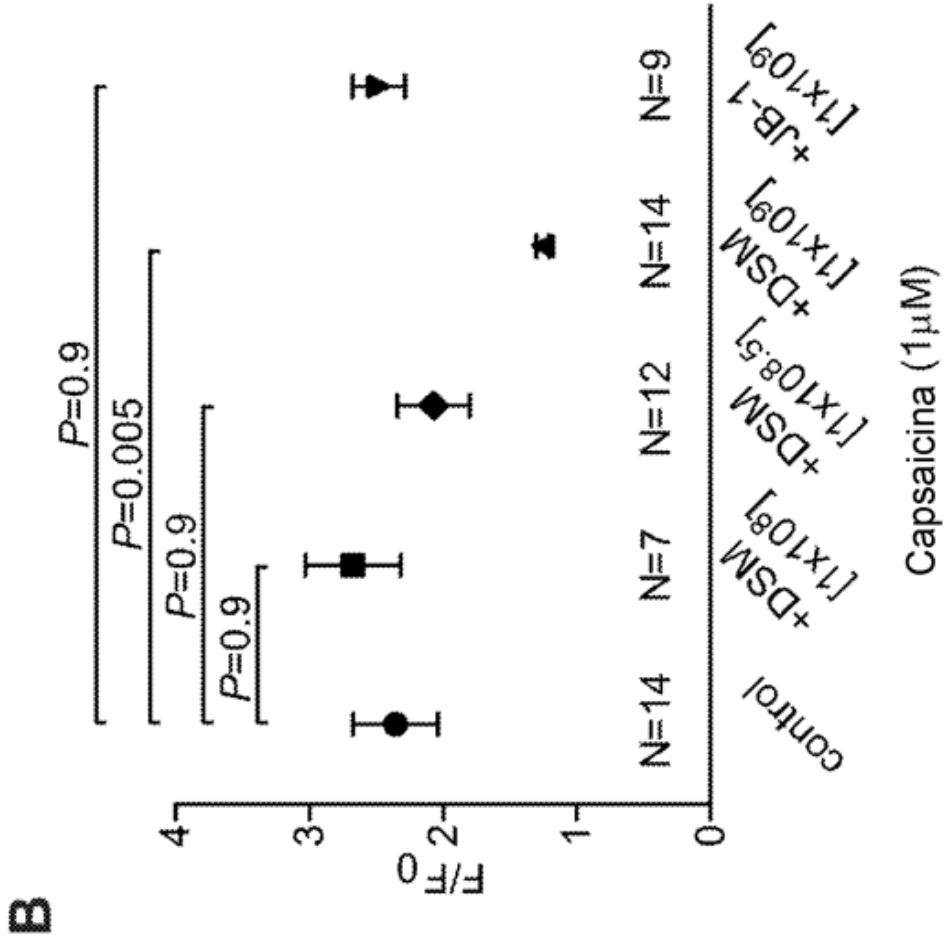
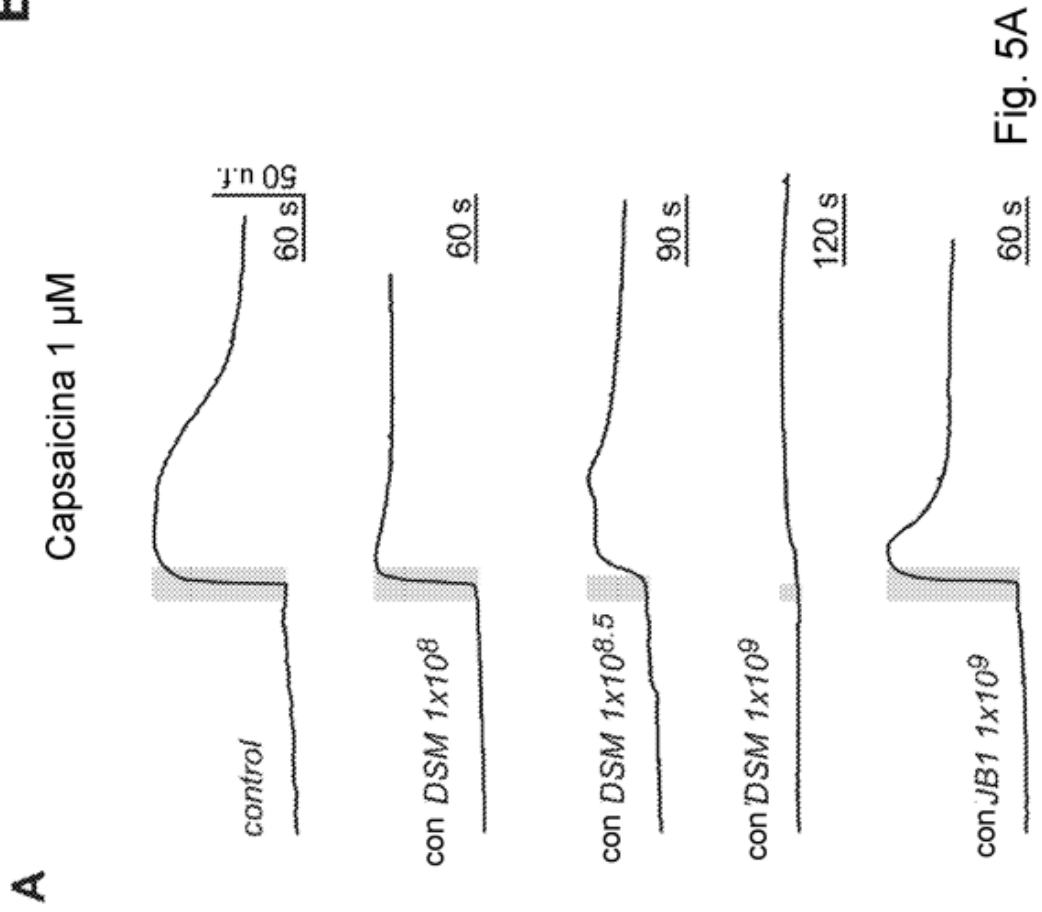


Fig. 5B



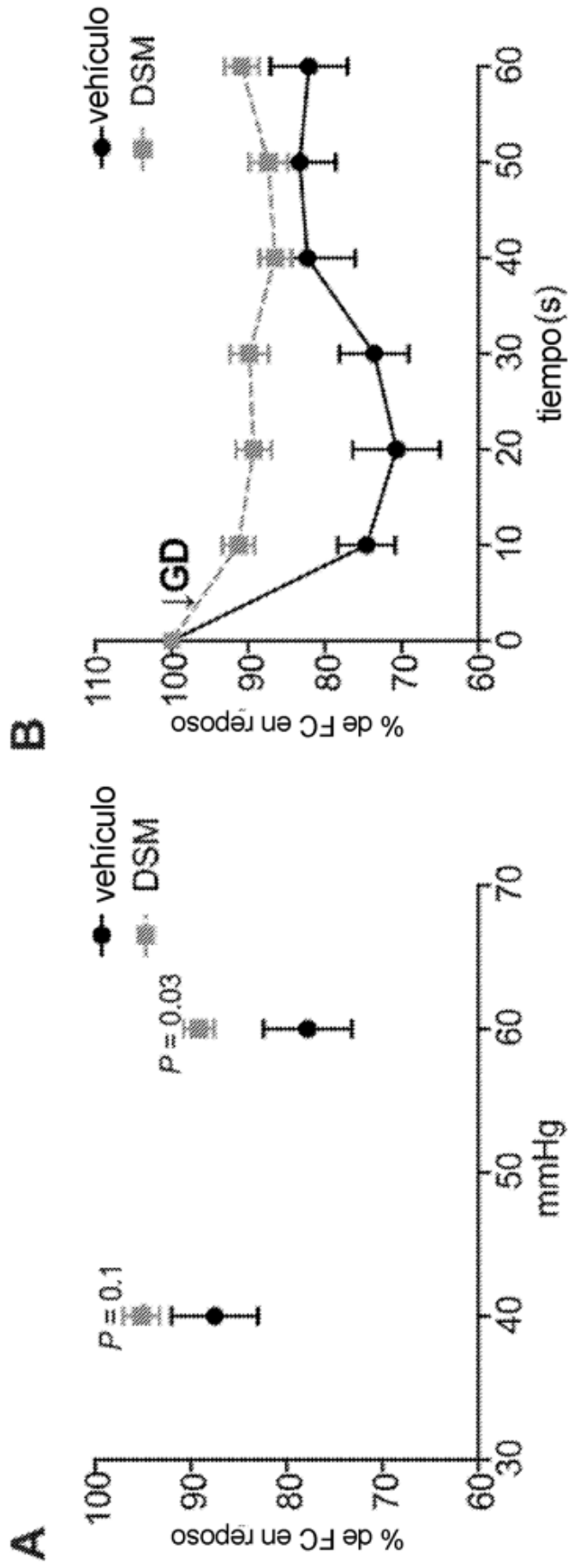


Fig. 6B

Fig. 6A

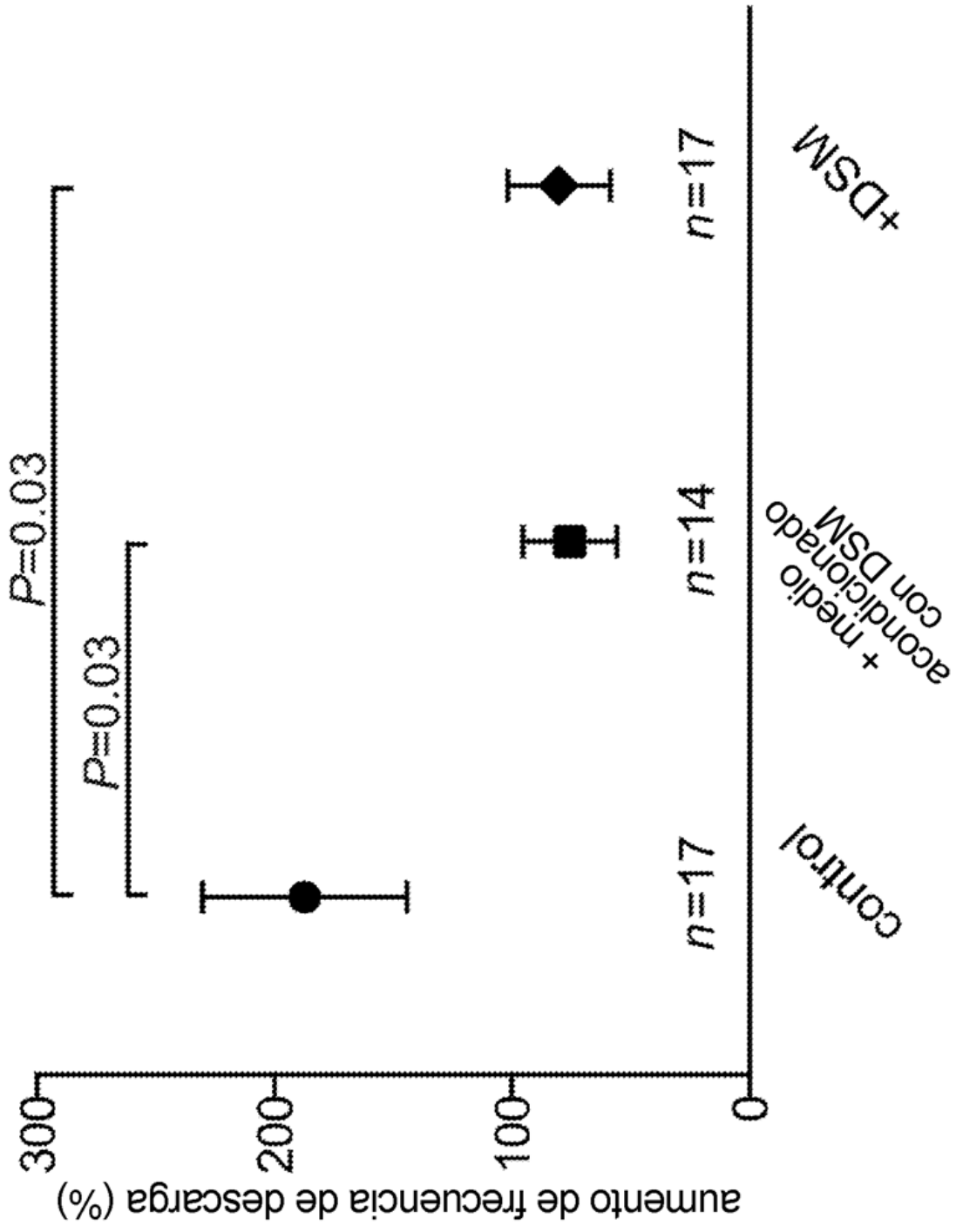


Fig. 7
Capsaicina (1 μ M)