

[0001]

5 La presente invención se refiere a: un agente y alimento para suprimir la inflamación de las células intestinales de un rumiante o un animal no humano tal como un cerdo o un ave; y un método para suprimir la inflamación de las células intestinales del animal no humano usando el agente y el alimento.

[0002]

El mantenimiento del estado de salud y el control de enfermedades de los animales domésticos son factores importantes para mejorar la productividad de animales domésticos como rumiantes, cerdos y aves de corral.

15 LPS (lipopolisacárido) y similares, que son los productos de descomposición
de bacterias patógenas, causan inflamación intestinal en los intestinos de los
animales domésticos, lo que da como resultado diversas enfermedades
gastrointestinales, incluidas diarrea y colitis, disminución de la resistencia e
inmunidad debido a la privación nutricional y susceptibilidad a enfermedades,
20 causadas por las disminuciones, que han sido muy problemáticas en el campo de la
industria animal.

Por el contrario, los agentes microbianos vivos tales como las bacterias *Bacillus* y las bifidobacterias también se han utilizado en la industria animal con el propósito de efectos de regulación intestinal. Sin embargo, no se ha confirmado que ninguna formulación de producto natural tenga los efectos de suprimir la secreción de citoquinas inflamatorias y reparar la unión estrecha intestinal (TJ, por sus siglas en inglés).

[0003]

Los efectos conocidos del líquido de cáscara de anacardo en animales domésticos incluyen el efecto de mejorar la fermentación del rumen (Documento Patente 1), el efecto de prevenir timpanites (Documento Patente 2), el efecto de prevenir la coccidiosis (Documento Patente 3) y el efecto de prevenir acidosis (documento Patente 4). Sin embargo, hasta el momento no hay informes sobre los efectos del aceite de cáscara de anacardo para suprimir la inflamación intestinal de los animales domésticos.

10 DOCUMENTOS DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Documentos Patente

[0004]

Documento Patente 1: WO 2008/149992

Documento Patente 2: WO 2008/149994

15 Documento Patente 3: WO 2009/139468

Documento Patente 4: WO 2010/053085

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Problemas a resolver por la invención

20 [0005]

Un objeto de la presente invención es proporcionar un material para suprimir la inflamación intestinal de un animal no humano.

Medios para resolver los problemas

[0006]

25 Los inventores estudiaron intensamente para resolver los problemas descritos anteriormente y, en consecuencia, encontraron que el líquido de cáscara de anacardo (en lo sucesivo, puede abreviarse como “CNSL” o “CNSE”, por sus siglas en inglés)

proporciona una acción para suprimir la inflamación de las células intestinales de un animal. Los inventores completaron la presente invención sobre la base de dichos hallazgos.

[0007]

5 Es decir, la presente invención es como sigue.

[1] Un método para suprimir la inflamación en las células intestinales de un animal no humano, que comprende administrar líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol a un animal no humano.

10 [2] Un método para suprimir la inflamación en las células intestinales de un animal no humano, que comprende: mezclar un alimento con líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol; y administrar el alimento al animal no humano.

[3] Un método para suprimir la inflamación en las células intestinales de un animal no humano, que comprende: mezclar el alimento con 5 ppm a 1000 ppm (peso) de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol; y administrar el alimento al animal no humano.

[4] El método para suprimir la inflamación en las células intestinales según cualquiera de [1] a [3], en el que el animal no humano es un mamífero.

20 [5] El método para suprimir la inflamación en las células intestinales según cualquiera de [1] a [3], en el que el animal no humano es un ave de corral, un cerdo o un rumiante.

[6] El método para suprimir la inflamación en las células intestinales según cualquiera de [1] a [3], en el que el animal no humano es un rumiante.

25 [7] El método para suprimir la inflamación en las células intestinales en un animal no humano de acuerdo con cualquiera de [1] a [6], en el que la administración de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido

anacárdico, cardanol y/o cardol da como resultado la supresión de la producción de una citocina inflamatoria en las células intestinales para suprimir la inflamación en las células intestinales del animal no humano.

[8] El método según [7], en el que la citocina inflamatoria es una o más de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 y MCP-1.

[9] Un agente para suprimir la inflamación intestinal de un animal no humano, que comprende, como componentes activos, líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol.

[10] El agente para suprimir la inflamación intestinal según [9], en el que dicho agente comprende de 5 ppm a 1000 ppm (en peso) de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol.

[11] El agente para suprimir la inflamación intestinal según [9] o [10], en el que el ácido anacárdico, el cardanol y/o el cardol son componentes activos.

[12] Un agente para suprimir la producción de una citocina inflamatoria en las células intestinales de un animal no humano, que comprende, como componentes activos, líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol.

[13] El agente para suprimir la inflamación intestinal según [12], en el que dicho agente comprende de 5 ppm a 1000 ppm (en peso) de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol.

[14] El agente para suprimir la inflamación intestinal según [12] o [13], en el que el ácido anacárdico, el cardanol y/o el cardol son componentes activos.

[15] Uso de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol en la fabricación de un agente para suprimir la producción de una citoquina inflamatoria en células intestinales de un animal no humano.

EFFECTOS DE LA INVENCION

[0008]

De acuerdo con la presente invención, la secreción de una citocina inflamatoria secretada por las células intestinales se puede suprimir mediante la administración de un agente o alimento que comprenda líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol a un animal no humano tal como un rumiante, un cerdo o aves de corral. Como resultado, se puede suprimir la aparición y el empeoramiento sintomático de la inflamación en las células intestinales. Como resultado, se puede mantener el estado de salud del animal no humano tal como un animal doméstico para mejorar la productividad. Estas sustancias provienen de sustancias naturales y, por lo tanto, se considera que suprimen los efectos secundarios con una baja aparición de bacterias resistentes. Estas sustancias tienen la ventaja de actuar en dosis bajas y además tener una alta seguridad.

15

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0009]

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico que indica los resultados (RT-PCR) del análisis de la expresión de un gen de citocinas inflamatorias en el caso de añadir diversas sustancias a células epiteliales intestinales porcinas. Se examinaron sus efectos sobre el aumento estimulado por LPS en la expresión del gen de la citocina inflamatoria. La ordenada indica un nivel de expresión relativo en el supuesto de que un nivel de expresión en la estimulación con solo LPS se establece en 1.

[Figura 2] La figura 2 es un diagrama que indica los resultados de la cuantificación de la cantidad de secreción de MCP-1 en el caso de añadir diversas sustancias a las células epiteliales intestinales porcinas. Se examinaron sus efectos sobre el aumento estimulado por LPS en la secreción de MCP-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0010]

El agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención comprende, como componentes activos, líquido de cáscara de anacardo (CNSL), líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, 5 cardanol y/o cardol.

[0011]

Los ejemplos de supresión de la inflamación en las células intestinales incluyen la supresión de un síntoma inflamatorio en las células o tejidos intestinales y la supresión de la producción de una citocina inflamatoria en las células intestinales. 10 La supresión de la producción de la citoquina inflamatoria incluye no solo la supresión de la secreción de una citoquina inflamatoria sino también la supresión de la expresión de un gen de citoquina inflamatoria. Los ejemplos de la citocina inflamatoria incluyen MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1), IL-6 (interleucina-6) y TNF- α (factor de necrosis tumoral- α). 15

Se prefiere una célula epitelial intestinal como célula intestinal.

[0012]

El agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención también puede usarse como agente para suprimir la producción de una citocina inflamatoria en las células intestinales. El agente para suprimir la 20 producción de una citoquina inflamatoria preferiblemente da como resultado disminuciones en la cantidad de producción de la citocina inflamatoria al 90% o menos, preferiblemente al 80% o menos, y más preferiblemente al 50% o menos, en comparación con la cantidad de producción en un control (sin adición de CNSL, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol). 25

Se prefiere la supresión de la producción de una citoquina inflamatoria, provocada por un estímulo inflamatorio, como supresión de la producción de una

citoquina inflamatoria. Los ejemplos del estímulo inflamatorio incluyen un estímulo derivado de bacterias, como LPS (lipopolisacárido). Como resultado, la inflamación causada por una infección bacteriana o similar se puede suprimir de manera eficiente.

El agente para la supresión de la inflamación en las células intestinales y el
5 agente para la supresión de la producción de una citocina inflamatoria en las células intestinales de la presente invención pueden usarse preferentemente en la prevención o el tratamiento de una enfermedad provocada por la inflamación en las células intestinales. Ejemplos de tales enfermedades incluyen infecciones bacterianas y enfermedades inflamatorias del intestino.

10 [0013]

El líquido de la cáscara del anacardo es un líquido aceitoso contenido en la cáscara del anacardo (*Anacardium occidentale* L.). El líquido de cáscara de anacardo contiene, como componentes, ácido anacárdico, cardanol y cardol. El ácido anacárdico se convierte en cardanol mediante tratamiento térmico. También se puede
15 usar líquido de cáscara de anacardo que contiene solo cardanol y cardol debido al tratamiento térmico (líquido de cáscara de anacardo calentado).

[0014]

El líquido de cáscara de anacardo (sin calentar) extraído presionando cáscaras de anacardo comprende de 55 a 80% en masa de ácido anacárdico, de 5 a 20% en
20 masa de cardanol y de 5 a 30% en masa de cardol, como se describe en J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 2548-2551.

Líquido de cáscara de anacardo calentado obtenido por tratamiento térmico de líquido de cáscara de anacardo sin calentar (por ejemplo, a 70°C o más, preferiblemente 130°C o más), lo que genera ácido anacárdico, que es un
25 componente principal del líquido de cáscara de anacardo sin calentar para ser descarboxilado y convertido en cardanol, comprende 0 a 10% en masa de ácido anacárdico, 55 a 80% en masa de cardanol, y 5 a 30% en masa de cardol.

[0015]

El líquido de la cáscara de anacardo se puede obtener como un aceite vegetal extraído presionando las cáscaras de anacardo. El líquido de la cáscara del anacardo también se puede obtener por destilación en seco o extracción con solvente de las cáscaras del anacardo. Por ejemplo, también se puede obtener líquido de cáscara de anacardo mediante un método como el descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada No. H08-231410. Un producto comercial de líquido de cáscara de anacardo puede ser utilizado.

[0016]

El agente para suprimir la inflamación en una célula intestinal de la presente invención puede comprender ácido anacárdico, cardanol y cardol, en lugar de líquido de cáscara de anacardo.

[0017]

Los ejemplos de ácido anacárdico incluyen ácido anacárdico natural, ácido anacárdico sintético y derivados del mismo. Además, también se puede utilizar un producto comercial de ácido anacárdico. El ácido anacárdico se puede obtener como se describe en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada No. H08-231410 extrayendo aceite de anacardo de cáscaras de anacardo tratadas con un solvente orgánico, sometiendo el aceite de anacardo obtenido a, por ejemplo, cromatografía en columna de gel de sílice, y aplicando un disolvente mixto de n-hexano, acetato de etilo y ácido acético con una relación variable con respecto a la cromatografía para la elución del aceite de anacardo obtenido (véase la publicación de patente japonesa no examinada No. H03-240721, la publicación de patente japonesa no examinada No. H03-240716, etc.).

[0018]

Los ejemplos de cardanol incluyen cardanol natural, cardanol sintético y derivados de los mismos. Además, el cardanol que se utilizará en la presente

invención se puede obtener mediante la descarboxilación del ácido anacárdico, un componente principal del líquido de la cáscara del anacardo.

[0019]

Los ejemplos de cardol incluyen cardol de origen natural, cardol sintético y
5 derivados de los mismos. Además, el cardol a utilizar en la presente invención se puede obtener a partir de la purificación del líquido de la cáscara del anacardo.

[0020]

El contenido de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de
anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol en el agente para suprimir
10 la inflamación en las células intestinales de la presente invención es preferentemente de 0,5 a 50.000 ppm en peso, más preferentemente de 1 a 10.000 ppm, además preferentemente de 5 a 1000 ppm basado en la cantidad total del agente.

[0021]

Como agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la
15 presente invención, se puede administrar directamente por vía oral una solución sin diluir de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol.

[0022]

El agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la
20 presente invención puede comprender componentes tales como un excipiente que puede usarse en un alimento o producto farmacéutico, como, por ejemplo, lactosa, sacarosa, D-manitol, α -almidón, almidón, almidón de maíz, celulosa cristalina, bentonita, gel de sílice o ácido silícico anhidro ligero, además de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol
25 y/o cardol.

[0023]

El agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la

presente invención puede comprender además un componente opcional tal como un componente efectivo en la promoción del crecimiento de un rumiante, un componente nutricional, un componente que mejora la estabilidad durante el almacenamiento o un componente de recubrimiento, además al líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol. Los ejemplos de tales componentes opcionales incluyen materias primas de alimentos, como salvado, alfalfa y fleo, aditivos para alimentos, materiales de origen alimentario, aditivos alimentarios, materiales de productos farmacéuticos y otros componentes de suplementos utilizados en suplementos para animales (en lo sucesivo denominados "suplementos"). Los ejemplos de los mismos incluyen: agentes bacterianos vivos tales como bacterias pertenecientes al género *Enterococcus*, bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, y *Lactobacillus bifidus*; enzimas tales como amilasa y lipasa; ácido L-ascórbico, cloruro de colina, inositol y vitaminas como el ácido fólico; minerales como cloruro de potasio, citrato férrico, óxido de magnesio y fosfatos; aminoácidos tales como DL-alanina, DL-metionina y L-lisina; ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido butírico, ácido láctico y ácido acético, y sales de los mismos; antioxidantes tales como etoxiquina, dibutil hidroxitolueno, hidroxianisol butilado, ácido ferúlico, vitamina C y vitamina E; fungicidas tales como propionato de calcio; agentes aglutinantes tales como carboximetilcelulosa (CMC), caseinato de sodio y poliacrilato de sodio; emulsionantes tales como lecitina, éster de ácido graso de glicerina y éster de ácido graso de sorbitán; agentes colorantes tales como astaxantina y cantaxantina; y agentes aromatizantes tales como diversos ésteres, éteres y cetonas. Los tipos de suplementos y los componentes que no sean líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol no están limitados.

[0024]

El agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención puede comprender un agente de absorción de aceite tal como óxido de magnesio, estearato, talco, zeolita, tierra de diatomeas o sílice, y el agente de absorción de aceite es preferiblemente granulado. El agente de absorción de aceite es preferentemente un agente de absorción de aceite que puede adsorber de 50 a 300 g de aceite por 100 g de agente de absorción de aceite. Cuando el agente de absorción de aceite tiene un diámetro de partícula de más de 300 μm , las partículas del agente de absorción de aceite se espesan y separan. Por lo tanto, el agente de absorción de aceite tiene preferentemente un diámetro de partícula de 2 a 300 μm .

En una realización del agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención, una proporción de masa preferida entre el agente de absorción de aceite y el líquido de cáscara de anacardo (CNSL), líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol es de 100:20 a 100:180. Una relación de masa preferida entre el agente de absorción de aceite y el producto de cáscara de anacardo molido es de 15:100 a 60:100.

[0025]

La forma de dosificación del agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención no está particularmente limitada, pero sus ejemplos incluyen cualquier forma como medicamento líquido, polvo, sólido, tableta, cápsula, emulsión, gránulo, tableta y recubrimiento. La forma de dosificación es preferiblemente medicamento líquido, polvo, cápsula, gránulo o tableta.

El líquido de cáscara de anacardo, el líquido de cáscara de anacardo calentado, el ácido anacárdico, el cardanol y/o el cardol pueden usarse tal cual como agente líquido. Alternativamente, el líquido de la cáscara de anacardo, el líquido de la cáscara de anacardo caliente, el ácido anacárdico, el cardanol y/o el cardol pueden disolverse en un disolvente como el etanol. Además, se le puede añadir el excipiente descrito anteriormente o un componente opcional. El polvo, cápsula, gránulo o

tableta, como se describe a continuación, se puede suspender y dejar que flote en un líquido.

En cuanto al polvo, el excipiente descrito anteriormente se puede agregar al líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol para hacer el polvo.

En cuanto a la cápsula, se puede llenar una cápsula con líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol tal cual, o el excipiente descrito anteriormente o un componente opcional puede ser añadido a la cápsula.

En cuanto al gránulo, el excipiente descrito anteriormente se puede agregar al líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol, y el resultante se puede granular para hacer el gránulo.

En cuanto a la tableta, el excipiente descrito anteriormente se puede agregar al líquido de cáscara de anacardo, al líquido de cáscara de anacardo calentado, al ácido anacárdico, al cardanol y/o al cardol, y el resultante se puede granular para hacer la tableta.

Es preferible formular el agente como polvo, tableta y gránulo cuando el agente comprende un agente de absorción de aceite como sílice.

[0026]

Como se describió anteriormente, el agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención se puede producir mezclando líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol con un excipiente o un componente opcional, según sea necesario para la formulación. Además, dependiendo de la forma del agente, un producto obtenido por pulverización/trituración de la cáscara de anacardo, o cáscara de anacardo sin procesar, puede mezclarse directamente con cualquier otro componente

opcional para producir el agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención. Además, el producto molido o triturado de cáscara de anacardo o la propia cáscara de anacardo se puede usar como agente para suprimir la inflamación en las células intestinales de la presente invención sin
 5 mezclarlo con otros componentes opcionales.

[0027]

El alimento de la presente invención comprende líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol.

10 El contenido de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o el cardol en el alimento de la presente invención es preferentemente de 0,5 a 50.000 ppm en peso, más preferentemente de 1 a 10.000 ppm en peso, aún más preferiblemente de 5 a 100 ppm en peso basado en la cantidad total por masa de materia seca del alimento.

15 [0028]

El alimento de la presente invención se puede producir agregando líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol, o el agente para suprimir la inflamación en una célula intestinal de la presente invención, que comprende anacardo líquido de cáscara, líquido de
 20 cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol a un componente de alimentación, y mezclando el resultante.

En tal caso, cuando se usa el agente que es pulverulento y sólido, se puede permitir que el agente esté en forma líquida o de gel usando un vehículo líquido para facilitar la mezcla. En este caso, se puede utilizar como vehículo líquido un líquido
 25 fluido tal como agua, aceite vegetal, aceite animal líquido, aceite mineral, aceite sintético o un compuesto polimérico soluble en agua. Además, los polisacáridos solubles en agua como el ácido alginico, el alginato de sodio, la goma xantana, la

carboximetilcelulosa, el α -almidón, el caseinato de sodio, la goma arábica, la goma guar y los polisacáridos de semillas de tamarindo también se combinan preferentemente para mantener la homogeneidad del líquido de la cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol en el alimento.

[0029]

Para el alimento de la presente invención, los tipos, proporciones de combinación y similares de los componentes del alimento combinados con el agente de la presente invención no están particularmente limitados. El pienso puede ser un pienso dado convencionalmente a cada animal. El alimento se puede preparar usando, por ejemplo, granos de maíz, harinas de maíz, milo, salvado, torta de soya, avena, trigo corto, polvos gruesos de trigo, alfalfa, fleo, trébol, salvado de arroz desgrasado, harina de océano del norte, harina de la costa, levadura, melaza, trozos de carne, harina de huesos, carbonato de calcio, difosfato de calcio, grasa amarilla, vitaminas, minerales y/o similares.

[0030]

Los tipos de animales no humanos a los que se va a administrar el agente para suprimir la inflamación en las células intestinales o el alimento de la presente invención no están particularmente limitados, pero son preferentemente animales mamíferos no humanos y aves de corral, y ejemplos de los mismos incluyen rumiantes, cerdos, y aves de corral. Los ejemplos de los rumiantes incluyen ganado, búfalos, cabras, ovejas y yaks. Los ejemplos de los tipos de ganado incluyen, pero no se limitan a, Holstein hembra, Jersey, negro japonés, Shorthorn japonés y Aberdeen Angus. Los ejemplos de aves de corral incluyen pollos, codornices, pavos, patos, gansos, avestruces, emús, faisanes y gallinas de guinea.

[0031]

La cantidad del agente para suprimir la inflamación en las células intestinales

o el alimento que se va a administrar puede ajustarse apropiadamente dependiendo del tipo, peso corporal, edad, sexo y estado de salud del animal, componentes del alimento y similares. En este caso, las cantidades de líquido de cáscara de anacardo, líquido de cáscara de anacardo calentado, ácido anacárdico, cardanol y/o cardol
 5 contenidas en el pienso son, por ejemplo, de 0,01 a 500 g/animal/día, preferiblemente de 0,1 a 200 g. /animal/día, más preferentemente de 1 a 50 g/animal/día, y además preferentemente de 0,5 a 5 g/animal/día.

EJEMPLOS

10 [0032]

La presente invención se describirá específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, los aspectos de la presente invención no se limitan a los siguientes Ejemplos.

[0033]

15 Para evaluar el efecto de la reacción inflamatoria estimulada por endotoxinas en el intestino, se añadió CNSL, aceite de ricino o CNSL calentado a células epiteliales intestinales porcinas, se cultivaron las células y se cuantificaron los genes de citoquinas y las proteínas de citoquinas.

[0034]

20 Método de prueba

Evaluación de cultivo celular, estimulación con LPS y Sustancia Antiinflamatoria

1. Siembra de células PIE

Se sembraron células PIE (epitelial intestinal porcina) en una placa de 12
 25 pozos (fabricada por COSTAR) a $3,0 \times 10^4$ células/pozo y se cultivaron en una incubadora de CO₂. (Día 0)

[0035]

2. Muestras Añadidas

· Medio (medio MEM modificado de Dulbecco DMEM) como NC (control negativo)

PC1 (control positivo 1)·Ácido acetilsalicílico (aspirina)

5 La aspirina (fabricada por BAYER) se muele en un mortero y luego se produce una solución de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contiene 10 mg/mL de aspirina y se esteriliza a través de un filtro de 0,45 μ m (fabricado por ADVANTEC TOYO). El PBS esterilizado se usa para preparar la solución diluida de Aspirina (400 μ g/mL or 200 μ g/mL) y la solución diluida se agrega al medio a razón
10 de 1/20 de volumen (Concentración final de 20 ppm o 10 ppm).

PC2 (control positivo 2) Aceite de ricino

·CNSE (líquido de cáscara de anacardo)

·CNSL (líquido de cáscara de anacardo calentado)

15 10 mg/mL de aceite de ricino o una solución de etanol (solución madre) que contiene 50 mg/mL (CNSE o CNSL calentado) se diluye con PBS para producir 5 mg/mL, 2,5 mg/mL o 1,25 mg/mL, 0,6 mg /mL o 0,3 mg/mL de solución, que luego se esteriliza a través de un filtro (0,45 μ m).

[0036]

3. Medio de reemplazo

20 Se agregan 20 μ L de las muestras descritas anteriormente a 1 mL de DMEM para preparar un medio de reemplazo.

El medio de la placa de 12 pozos se aspira y se reemplaza con el medio de reemplazo (a las 9:00 a. m. del día 3)

Estimulación LPS

25 Se añade una solución de LPS (lipopolisacárido) al medio para conseguir una concentración final de 1 μ g/mL (a las 9:00 p. m. del día 4).

Cosecha I

Se recoge un sobrenadante de cultivo, luego se lavan los pozos con PBS esterilizado, y las células adherentes se solubilizan con TRIZOL y se cosechan (a las 9:00 a. m. del día 5).

Cosecha II

- 5 Se recoge un sobrenadante de cultivo, luego se lavan los pozos con PBS esterilizado y las células adherentes se solubilizan con TRIZOL y se cosechan (a las 9:00 a. m. del día 7).

[0037]

RT-PCR (utilizando la muestra de Cosecha I)

- 10 La muestra en la que se disuelve TRIZOL (fabricado por INVITROGEN) se purifica parcialmente mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, y luego se disuelve en 10 µL de agua libre de RNasa, y la D.O. (absorbancia) del resultante se mide con NanoDrop (fabricado por Thermo Fisher Scientific K.K.).

- La PCR en tiempo real se realizó de conformidad con el manual del kit de reactivos Prime Script RT con gDNA Eraser de TAKARABIO.

[0038]

ELISA (utilizando la muestra de Cosecha II)

- La MCP-1 se cuantificó de acuerdo con el protocolo de Ray Bio porcine C-motive Chemokine 2 (CCL2)/Monocyte chemoattractant Protein 1 (MCP1) ELISA Kit. El sobrenadante del cultivo se diluyó dos veces para la cuantificación. El estándar fue de 2800 pg/mL a 28,67 pg/mL.

[0039]

Resultados

- Los resultados de la RT-PCR se muestran en la Figura 1. Los resultados revelan que el CNSL suprimió los aumentos inducidos por LPS en la expresión de MCP-1, IL-6 y TNF- α . Además, como se muestra en la Figura 2, tanto el CNSL como el CNSL calentado suprimieron el aumento de secreción de MCP-1 inducido

por LPS.

[0040]

Discusión

5 Como se describió anteriormente, se sugirió que el CNSL y el CNSL calentado suprimen la acción de los mediadores de la inflamación, estimulados por la endotoxina (LPS: lipopolisacárido), en las células PIE (células epiteliales intestinales porcinas).