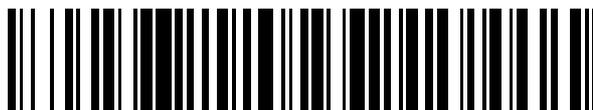


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 513**

51 Int. Cl.:

A61K 36/14 (2006.01)

A61K 35/56 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 35/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08860286 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2231173**

54 Título: **Composición nutracéutica y métodos de uso**

30 Prioridad:

12.12.2007 AU 2007906770

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

21.08.2014

73 Titular/es:

**DACY TECH PTY LTD (100.0%)
7 THE AVENUE
DELACOMBE, VIC 3356, AU**

72 Inventor/es:

BRIGHT, DAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 487 513 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

Composición nutracéutica y métodos de uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a composiciones nutracéuticas y a métodos para administrarlas para el tratamiento de una inflamación o trastornos asociados con la inflamación y específicamente a la lesión de cartílago.

La presente invención también se refiere a extractos de composiciones nutracéuticas de una planta que puede tratar una inflamación o trastornos asociados con la inflamación.

Descripción de la técnica anterior

10 En esta memoria descriptiva, cuando se hace referencia a o se discute un documento, un acto o un elemento de conocimiento, esta referencia o discusión no es un reconocimiento de que el documento, el acto o el elemento de conocimiento o cualquier combinación de los mismos fue en la fecha de prioridad: parte del conocimiento general común o que se conocía que era relevante para intentar resolver cualquier problema con el que esté relacionado esta memoria descriptiva.

La degradación de cartílago es un problema que asedia a todos los vertebrados.

15 El cartílago es el tejido conjuntivo liso localizado sobre la superficie articular de los huesos y soporta y protege el hueso. Cuando el cartílago pasa a dañarse, la articulación ya no puede funcionar de manera normal y la superficie del cartílago disminuye y pierde su capacidad de retención de agua y se deteriora con fisuras que aparecen en el propio cartílago. A lo largo del tiempo, la elasticidad del cartílago se reduce y pasa a ser más susceptible de lesión y daño. La pérdida progresiva puede dar como resultado un contacto hueso en puntos específicos, lo que
20 es extremadamente doloroso y prohíbe el funcionamiento normal de la articulación que se está articulando.

Los AINE se han usado desde hace tiempo en el tratamiento de inflamación de articulaciones como una forma de alivio del dolor. Sin embargo, ha existido resistencia al uso continuado de muchos AINE debido a las complicaciones y a las reacciones adversas que se han notificado.

25 El cartílago de tiburón proporciona una mejora significativa en la salud de articulaciones en un modelo experimental de artritis inmunomediada (Pivnenko *et al.*, 2005) y puede mejorar la captación de sulfato al interior de nuevas moléculas de proteoglicano.

30 De manera similar, existe evidencia clínica de la eficacia del mejillón perna como tratamiento para la enfermedad articular degenerativa en perros (Pollard *et al.*, 2006; Bui y Bierer 2003). Se incorporó abulón, que tiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados n-3, de los que se conocen que reducen la formación de eicosanoides inflamatorios (Mesa Garcia *et al.*, 2006) y de NO (Pearson *et al* 2007).

Objetivo de la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar una composición nutracéutica para su uso en el tratamiento de una inflamación o trastornos asociados con la inflamación.

35 Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una composición nutracéutica para la estimulación de la formación de cartílago.

Un objetivo de la presente invención es superar, o al menos mejorar sustancialmente, las desventajas y los defectos de la técnica anterior.

40 Otros objetivos y ventajas de la presente invención pasarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción, tomándola en relación con los dibujos adjuntos, en los que, a modo de ilustración y ejemplo, se da a conocer una realización de la presente invención.

Sumario de la invención

En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición que incluye una cantidad terapéutica de un extracto de una planta *Biota orientalis* para su uso en el tratamiento de la degradación de cartílago en un organismo.

45 En una realización, la composición incluye una cantidad terapéutica de un extracto de la planta *B. orientalis*, puede incluir además un extracto adicional tal como extracto de mejillón perna, extracto o polvo de abulón, polvo de cartílago de tiburón o combinaciones de los mismos.

En una realización adicional, el extracto es un extracto de las semillas de la planta *B. orientalis*.

En una realización adicional, un extracto de la planta *B. orientalis* puede producirse a partir de un digesto simulado que imita la función/el procesamiento gastrointestinal.

Una forma adicional de la invención reside en una composición que incluye un extracto de una planta *Biota orientalis* para su uso para aumentar la actividad de al menos un receptor prostanoide implicado en la proliferación de condrocitos, en la que administrar la composición al paciente estimula la proliferación de condrocitos y el crecimiento y/o la reparación de cartílago.

- 5 Preferiblemente, la composición para su uso incluye además administrar el extracto en combinación con un extracto tal como cartílago de tiburón, extracto de mejillón perna, extracto de abulón o combinaciones de los mismos.

En aún una forma adicional de la invención, se proporciona un extracto de la planta *Biota orientalis* para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de estados degenerativos de cartílago.

- 10 En aún una forma adicional de la invención, existe una composición que incluye al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido (9Z,13S,15Z)-12,13-epoxioctadeca-9,11,15-trienoico, ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico (ALA), ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico (GLA), ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico y ácido 9-octadecenoico para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de estados degenerativos de cartílago.

- 15 Preferiblemente, la composición incluye un extracto adicional tal como extracto de mejillón perna, extracto o polvo de abulón, polvo de cartílago de tiburón o combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, lo anterior es una preparación farmacéutica

Breve descripción de los dibujos

A modo de ejemplo, un empleo de la invención se describe de manera más completa a continuación en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos, en que:

- 20 **Figura 1:** Liberación de GAG por explantes de cartílago estimulados con IL-1 (fig. 1A) y no estimulados (fig. 1B). **●—●** representa tratamientos significativamente diferentes de los controles estimulados (A) o no estimulados (B). IL-1 dio como resultado un aumento significativo en la liberación de GAG en explantes control. No hubo ningún efecto significativo de ningún tratamiento sobre explantes estimulados con IL-1. $Indo_{sim}$ y SEQ_{sim} (0,06 mg/ml) dieron como resultado una [GAG] en los medios significativamente superior en explantes no estimulados en comparación con los controles no estimulados. El BO (0,06 mg/ml) redujo la [GAG] en los medios en explantes no estimulados.

- 25 **Figura 2:** Óxido nítrico (NO) (medido como nitrito) en medios de explantes de cartílago estimulados con IL-1 (A) y no estimulados (B). **●—●** representa tratamientos significativamente diferentes de los controles estimulados (A) o no estimulados (B). IL-1 dio como resultado un aumento significativo en la liberación de NO por explantes control. SEQ_{sim} (ambas dosis) dio como resultado una [NO] en los medios significativamente superior en explantes no estimulados en comparación con los controles no estimulados, y una [NO] en los medios significativamente inferior en explantes estimulados en comparación con los controles estimulados. El BO_{sim} no tuvo efecto sobre la [NO] en los medios.

- 30 **Figura 3:** Razón de fluorescencia de calceína-AM (C-AM) y de homodímero de etidio-1 (Ethd-1) en explantes de cartílago estimulados con IL-1 y no estimulados. Se incluyen controles estimulados (estim) y no estimulados (no estim) en cada gráfico para su comparación. * indica significativamente diferente de los controles estimulados (A) o no estimulados (B). La estimulación con IL-1 produjo una disminución pequeña, no significativa, en la viabilidad celular. No hubo ningún efecto de ningún tratamiento sobre la viabilidad celular en explantes no estimulados. SEQ_{sim} y BO_{sim} (0,18 mg/ml) aumentaron significativamente la viabilidad celular en explantes estimulados con IL-1 en relación con los controles estimulados.

- 35 **Figura 4:** Expresión relativa de ARN de agrecano en explantes de cartílago estimulados con IL-1 (A) y no estimulados (B). Se muestran controles estimulados (estim) y no estimulados (no estim) en cada gráfico para su comparación. Para cada uno de A y B, se comparan los tratamientos con los controles estimulados (A) y no estimulados (B). Los explantes control no estimulados y estimulados no tuvieron expresión medible de agrecano. Todos los tratamientos dieron como resultado un aumento significativo en la expresión de agrecano en explantes no estimulados, el menos eficaz de los cuales fue AB_{sim} . $NZGLM_{sim}$ (0,06 mg/ml) dio como resultado un aumento sustancial en la expresión de agrecano en explantes tanto no estimulados como estimulados. SEQ_{sim} (0,18 mg/ml) fue eficaz en el aumento de la expresión de agrecano en explantes tanto estimulados como no estimulados.

- 40 **Figura 5:** La recogida de muestras consistió en artrocentesis de líquido sinovial de articulaciones intercarpianas izquierdas y derechas y sangre venosa yugular. La complementación dietética se inició en el día 0 y continuó durante la duración del experimento.

- 45 **Figura 6:** Circunferencia de las articulaciones intercarpianas en las que se inyectó IL-1 (10 ng en iny-1, 100 ng en iny-2) o solución salina en caballos alimentados con CON (A) y con SEQ (B). Los caballos sanos recibieron una dieta que contenía placebo (CON) o Sasha's EQ (SEQ) durante 28 días. Se inyectó IL-1 intraarticular (10 ng en

500 μ l de solución salina estéril) en la articulación intercarpiana y se inyectó una solución salina estéril (500 μ l) en la articulación contralateral 14 días tras el comienzo de la complementación (iny-1). Se inyectó una segunda inyección intraarticular de IL-1 (100 ng en 500 μ l de solución salina estéril) o solución salina (500 μ l) en las mismas articulaciones 24 h más tarde (iny-2). Se aspiraron aproximadamente 1,5 ml de líquido sinovial de las articulaciones intercarpianas en los días pre (antes del comienzo de la complementación), iny-1 e iny-2 (antes de las inyecciones), iny-2-2 (8 h tras la 2ª inyección de IL-1) y 1, 3, 7 y 14 días tras la 2ª inyección de IL-1. * indica un cambio significativo con respecto a iny-1 dentro de los tratamientos. Las letras indican diferencias significativas entre la IL-1 y la solución salina dentro de los tratamientos. La circunferencia de la articulación de las articulaciones en las que se inyectó IL-1 fue significativamente inferior en caballos alimentados con SEQ que en caballos alimentados con CON ($p < 0,001$). Las diferencias fueron significativas cuando $p \leq 0,05$.

Figura 7: [PGE₂] en el líquido sinovial de articulaciones intercarpianas de caballos control en los que se inyectó IL-1 (10 ng en iny-1, 100 ng en iny-2) o con solución salina en caballos alimentados con CON (A) y con SEQ (B). Los caballos sanos recibieron una dieta que contenía placebo (CON) o Sasha's EQ (SEQ) durante 28 días. Se inyectó IL-1 intraarticular (10 ng en 500 μ l de solución salina estéril) en la articulación intercarpiana y se inyectó una solución salina estéril (500 μ l) en la articulación contralateral 14 días tras el comienzo de la complementación (iny-1). Se inyectó una segunda inyección intraarticular de IL-1 (100 ng en 500 μ l de solución salina estéril) o solución salina (500 μ l) en las mismas articulaciones 24 h más tarde (iny-2). Se aspiraron aproximadamente 1,5 ml de líquido sinovial de las articulaciones intercarpianas en los días pre (antes del comienzo de la complementación), iny-1 e iny-2 (antes de las inyecciones), iny-2-2 (8 h tras la 2ª inyección de IL-1) y 1, 3, 7 y 14 días tras la 2ª inyección de IL-1. * indica un cambio significativo con respecto a iny-1 dentro de los tratamientos. Las letras indican diferencias significativas entre la solución salina y la IL-1 dentro de los tratamientos. Los cambios fueron significativos cuando $p \leq 0,05$.

Figura 8: [GAG] en el líquido sinovial de articulaciones intercarpianas en las que se inyectó IL-1 (10 ng en iny-1, 100 ng en iny-2) o solución salina en caballos alimentados con CON (A) y con SEQ (B). Los caballos sanos recibieron una dieta que contenía placebo (CON) o Sasha's EQ (SEQ) durante 28 días. Se inyectó IL-1 intraarticular (10 ng en 500 μ l de solución salina estéril) en la articulación intercarpiana y se inyectó una solución salina estéril (500 μ l) en la articulación contralateral 14 días tras el comienzo de la complementación (iny-1). Se inyectó una segunda inyección intraarticular de IL-1 (100 ng en 500 μ l de solución salina estéril) o solución salina (500 μ l) en las mismas articulaciones 24 h más tarde (iny-2). Se aspiraron aproximadamente 1,5 ml de líquido sinovial de las articulaciones intercarpianas en los días pre (antes del comienzo de la complementación), iny-1 e iny-2 (antes de las inyecciones), iny-2-2 (8 h tras la 2ª inyección de IL-1) y 1, 3, 7 y 14 días tras la 2ª inyección de IL-1. * indica un cambio significativo con respecto a iny-1 dentro de los tratamientos. Las letras indican una diferencia significativa entre la IL-1 y la solución salina dentro de los tratamientos. Los caballos alimentados con SEQ tuvieron una [GAG] en el líquido sinovial significativamente superior a la de los caballos alimentados con CON. Las diferencias fueron significativas cuando $p \leq 0,05$.

Figura 9: [proteína] en el líquido sinovial de articulaciones intercarpianas de caballos control a los que se les inyectó IL-1 (10 ng en iny-1, 100 ng en iny-2) o solución salina en caballos alimentados con CON (A) y con SEQ (B). Los caballos sanos recibieron una dieta que contenía placebo (CON) o Sasha's EQ (SEQ) durante 28 días. Se inyectó IL-1 intraarticular (10 ng en 500 μ l de solución salina estéril) en la articulación intercarpiana y se inyectó una solución salina estéril (500 μ l) en la articulación contralateral 14 días tras el comienzo de la complementación (iny-1). Se inyectó una segunda inyección intraarticular de IL-1 (100 ng en 500 μ l de solución salina estéril) o solución salina (500 μ l) en las mismas articulaciones 24 h más tarde (iny-2). Se aspiraron aproximadamente 1,5 ml de líquido sinovial de las articulaciones intercarpianas en los días pre (antes del comienzo de la complementación), iny-1 e iny-2 (antes de las inyecciones), iny-2-2 (8 h tras la 2ª inyección de IL-1) y 1, 3, 7 y 14 días tras la 2ª inyección de IL-1. * indica un cambio significativo con respecto a iny-1 dentro de los tratamientos. Las letras indican diferencias significativas entre la IL-1 y la solución salina dentro de los tratamientos. Las diferencias fueron significativas cuando $p \leq 0,05$.

Figura 10: La tabla 1 que muestra los cebadores para agrecano y β -actina.

Figura 11: La tabla 2 que muestra la composición del polvo de Sasha's EQ preparado combinando abulón (AB), mejillón de labios verdes de Nueva Zelanda (NZGLM), cartílago de tiburón (SC) y BO (Interpath Pty Ltd, Australia).

Figura 12: La tabla 3 que muestra la composición de Sasha's EQ para alimentar a los caballos.

Figura 13: Espectro cromatográfico del extracto de aceite de *Biota orientalis*.

Figura 14: Muestra el ensayo de proliferación celular de BrdU de las fracciones F1, F2, F3 y F4.

Figura 15: Muestra el ensayo de proliferación celular de BrdU de las fracciones I, ii, V, Vi y Vii.

Figura 16: Muestra el ensayo de proliferación celular de BrdU de las fracciones F1, F1.1, F1.2, F1.3 y F1.4.

Descripción detallada de la invención

Para facilitar un entendimiento de la invención, diversos términos y abreviaciones se usan y se definen a continuación:

“SEQ” significa una mezcla de mejillón de labios verdes de Nueva Zelanda o perna, abulón, polvo de cartílago de tiburón y aceite de Biota.

5 “BO” significa aceite de Biota extraído de las semillas de la planta *Biota orientalis*.

“NZGLM” significa mejillón de labios verdes de Nueva Zelanda o mejillón perna.

“sim” significa el digesto simulado.

“COX” o “cox” significa la enzima ciclooxigenasa.

“iNOS” significa NO sintasa inducible.

10 La *Biota orientalis* (“Biota”) es una hierba originaria de China Occidental y Corea del Norte y se conoce por varios otros nombres, tales como *Thuja orientalis*, *Platyclusus stricta* y *Platyclusus orientalis*, la Biota se valora enormemente en la medicina china tradicional como una de las 50 hierbas fundamentales (Duke y Ayensu 1985). Se usa tradicionalmente como laxante, analgésico y sedante (Duke y Ayensu 1985).

15 Se ha notificado anteriormente que digestos simulados de cartílago de tiburón, NZGLM y abulón tienen efectos antiinflamatorios en un modelo de explante de cartílago de artritis reduciendo PGE₂ (prostaglandina E₂), GAG y/o óxido nítrico (Pearson *et al.*, 2007).

Métodos

Cultivos de explantes

20 Se obtuvieron patas delanteras de cerdos con peso listo para la venta (5-7 meses de edad, 200-250 lb) de un matadero local. Se refrigeraron las patas en hielo picado hasta la disección. Usando una técnica aséptica, se abrió la articulación intercarpiana y se expusieron las superficies de cartílago. Se usó un sacabocados para biopsia dérmica de 4 mm para tomar explantes (~ 0,5 mm de grosor; 11-15 mg/explante) de cartílago sano de la región que soporta el peso de ambas superficies de articulación de la articulación intercarpiana. Se lavaron piezas de cartílago 3 veces en medio Eagle modificado por Dubelco (DMEM) complementado con NaHCO₃. Se colocaron dos discos de cartílago dentro de cada pocillo de placas de cultivo tisular de 24 pocillos que contenían DMEM complementado con aminoácidos, selenito de sodio, sulfato de manganeso, NaHCO₃ y ácido ascórbico (TCM - medio de cultivo tisular). Se incubaron las placas a 37°C, CO₂ al 7% en una atmósfera humidificada durante hasta 144 h. Cada 24 h se aspiraron completamente los medios al interior de tubos de microcentrífuga de 1 ml y se reemplazaron inmediatamente con medios acondicionados y/o estimulados control (descritos a continuación) antes de devolverse al incubador. Se almacenaron los medios recogidos a -80°C hasta el análisis. Se recogió el cartílago al final de cada experimento con un explante por pocillo teñido para determinar la citotoxicidad y se congeló inmediatamente el cartílago restante a -80°C.

Digestión simulada y ultrafiltración

35 Se desarrolló un procedimiento de digestión simulada para imitar el procesamiento gastrointestinal de complementos dietéticos ingeridos. Se ha usado anteriormente este tipo de aproximación para mejorar la bioevaluación de supuestos nutraceuticos (Rininger *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2007).

40 Se prepararon digestos simulados usando SEQ (0,85 g), BO [2,5 ml (0,85 g)] e indometacina (0,074 g - un control antiinflamatorio positivo). Se suspendió individualmente cada sustancia de prueba en 35 ml de fluido gástrico simulado (NaCl 37 mM, HCl 0,03 N, pepsina 3,2 mg/ml) y se agitaron a 37°C durante 2 h (Rininger *et al.*, 2000). Tras esto, se neutralizó la acidez de la disolución añadiendo un volumen equinormal de NaOH 2,2 N (1,15 ml). A esto se le añadieron 36,15 ml de fluido intestinal simulado (Rininger *et al.*, 2000 - K₂HPO₄ 30 mM, NaH₂PO₄ 160 mM; pancreatina 20 mg/ml; pH ajustado a 7,4) y se agitó la mezcla resultante en un incubador a 37°C durante 2 h más. Se preparó un “blanco” usando una metodología idéntica pero sin incluir ninguna sustancia de prueba. Se derivaron volúmenes apropiados de fluido gástrico e intestinal a partir de aquéllos aproximados en un estómago humano (Marciani *et al.*, 2005).

45 Tras la finalización de la incubación de 4 horas, se centrifugaron digestos simulados de SEQ (SEQ_{sim}), BO (BO_{sim}) e indometacina (indo_{sim}) a 3.000 x g durante 25 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó una segunda vez a 3.000 x g durante 15 min a 4°C. Se calentó el sobrenadante resultante hasta temperatura ambiente y se filtró (0,22 µm) para eliminar los materiales particulados. Se fraccionó adicionalmente este filtrado con una unidad de centrífuga de ultrafiltración con un límite de peso molecular de 50 kDa, (AmiconUltra, Millipore, Mississauga ON), centrifugando a 3.000 x g durante 25 min (temperatura ambiente). Se almacenó el digesto simulado filtrado a 4°C hasta su uso durante un máximo de 7 días.

Efecto de SEQ_{sim} y BO_{sim} sobre inflamación inducida por IL-1

Se preparó SEQ_{sim} tal como se explicó anteriormente. Se prepararon explantes de 12 cerdos tal como describió anteriormente, y se mantuvieron en medios no acondicionados durante las 24 h iniciales. 24 horas después del cultivo, se añadió SEQ_{sim}, BO_{sim} (0, 0,06 ó 0,18 mg/ml) o indo_{sim} (0,02 mg/ml) al TCM. Se renovaron los medios acondicionados cada 24 horas durante la duración del experimento. 72 horas después del cultivo, y cada 24 horas después, se estimularon los explantes con IL-1 (0 ó 10 ng/ml; Medicorp, Montreal, Quebec; n.º de cat. PHC0813). Se expusieron los explantes de cada animal a cada tratamiento por duplicado. Se cultivaron los explantes durante un total de 120 h. Se analizaron los medios para determinar la [PGE₂], la [GAG] y la [NO]. Se recogió un explante por tratamiento en solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) y se tiñó inmediatamente para determinar la viabilidad celular (véase a continuación). Se congeló el segundo explante a -80°C para la extracción de ARN (véase a continuación).

Análisis de GAG

Se determinó la concentración de GAG en los medios usando un ensayo espectrofotométrico con 1,9-DMB (Chandrasekhar *et al.*, 1987). Se añadieron las muestras a placas de 96 pocillos al 50% de dilución, y se diluyeron en serie 1:2 hasta una dilución final de 1:64. Se añadió clorhidrato de guanidina a todos los pocillos inmediatamente antes del colorante DMB. Se incubaron las placas en la oscuridad durante 10 minutos, y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas Victor 3 a 530 nm. Se comparó la absorbancia de la muestra con la de un patrón de sulfato de condroitina. Se desarrollaron curvas patrón para cada placa, y se usó una ecuación lineal de ajuste óptimo con R² ≥ 0,99 para calcular las concentraciones de GAG para patrones y muestras.

Aislamiento de ARN total y síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN total de explantes de cartílago usando un procedimiento de TRIzol modificado (Chan *et al.*, 2005). Se agrupó cartílago congelado de cada animal según el acondicionamiento y la estimulación, y se homogenizó en TRI Reagent (100 mg de tejido/ml; Sigma, Mississauga ON). Se añadió cloroformo para extraer ARN seguido por agitación vigorosa e incubación de 2 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó la muestra (12.000 x g, 15 min) y se precipitó el ARN con un volumen igual de etanol al 70% (DEPC). Se aplicó el precipitado de ARN a una minicolumna RNeasy (Qiagen, Valencia CA, USA) y se purificó el ARN según las instrucciones del fabricante.

Para cada muestra agrupada, se convirtió 1 µg de ARN total en ADNc monocatenario usando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) (Invitrogen, Burlington ON) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ADNc monocatenario mediante espectrofotometría UV y se diluyó con DEPC-H₂O hasta una concentración final de 10 ng/µl.

30 RT-PCR en tiempo real cuantitativa

Se prepararon cebadores para agregano (el proteoglicano de agregación grande primario en cartílago hialino) (Fehrenbacher *et al.*, 2003) y β-actina (gen de mantenimiento; Nishimoto *et al.*, 2005) (tabla 1) (División de Servicios de Laboratorio, Universidad de Guelph) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se evaluaron muestras de cartílago de SEQ_{sim} y BO_{sim} para determinar cambios en la expresión génica, junto con cartílago cultivado en condiciones idénticas previamente con los otros 3 componentes de la SEQ (véase Pearson *et al.*, 2007 para condiciones de cultivo detalladas). Se realizaron reacciones PCR de veinticinco microlitros por triplicado usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 (Perkin-Elmer). Se detectó la amplificación de 50 ng de cada muestra de ADNc usando un equipo SYBR-Rox (Invitrogen, Burlington ON) y se comparó con una curva patrón de ADNc agrupado que contenía cantidades iguales de ADNc de cada muestra. Se usó un gel de electroforesis de agarosa al 1,5% para confirmar los productos de PCR. Se normalizó la expresión de cada gen de interés (G) en cada muestra a β-actina (β), y se comparó con explantes control no estimulados (es decir, el cambio en veces para el calibrador = 1).

El cambio en veces (fc) de la expresión ($\Delta G/\Delta \beta$), en relación con el control no estimulado o estimulado según se indique, se presenta en unidades arbitrarias.

Tinción de citotoxicidad

Se determinó la viabilidad celular usando un kit de tinción de viabilidad comercialmente disponible (Invitrogen; Burlington ON) (Pearson *et al.*, 2007). Brevemente, se lavaron los explantes en 500 µl de PBS y se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (un explante por pocillo) y se incubaron en 200 µl de disolución de tinción madre (C-AM 4 µM; Ethd-1 8 µM) durante una hora a temperatura ambiente. Se leyó la placa desde la base de cada pocillo usando 10 etapas horizontales, 3 etapas verticales y un desplazamiento de 0,1 mm. Se obtuvieron fluorescencias de C-AM y de Ethd-1 en explantes vivos y muertos con filtros de excitación/emisión de 485/530 nm y 530/685 nm, respectivamente.

Análisis de los datos

Los datos de los análisis de medios de cultivo tisular y de viabilidad se presentan como medias ± error estándar. Se analizaron las medias de réplicas de cada tratamiento/animal usando un análisis de varianza de medidas repetidas de dos vías que compara cada tratamiento con controles no acondicionados y controles acondicionados con

indometacina. Se analizaron los datos de viabilidad usando la prueba de la t de Student, que compara individualmente los controles estimulados con todos los demás tratamientos. Cuando se obtuvo una razón F significativa, se usó la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Holm-Sidak para identificar diferencias significativas con respecto al tratamiento y/o el tiempo. Se aceptó la significancia si $p \leq 0,05$.

- 5 Debido a la baja celularidad de los explantes de cartilago, fue necesario agrupar el ARN de explantes expuestos al mismo acondicionamiento y estimulación con el fin de extraer suficiente ARN para una reacción de transcripción inversa. Por tanto, los datos PCR se presentan en el texto como cambio medio en la expresión génica (calibrado con respecto a controles) en relación con β -actina. Un cambio en veces de la expresión calibrado ≥ 2 se considera que es biológicamente relevante (Yang *et al.*, 2002; Schena *et al.*, 1995) y tales cambios de expresión se discuten en el
10 texto como diferencias significativas.

Resultados

EXPRESIÓN GÉNICA

- 15 Cox 1: Todos los constituyentes de la SEQ redujeron la expresión de cox 1 en explantes no estimulados (intervalo: el 76 - 95% de inhibición). De manera importante, se observó que el BO_{sim} (0,06 mg/ml) fue el inhibidor de cox 1 más eficaz, reduciendo la expresión de cox 1 en el 95% en explantes tanto no estimulados como estimulados.

Agrecano (figura 4, A y B): La estimulación de explantes control con IL-1 dio como resultado una disminución no significativa escasa en la expresión de agrecano. El acondicionamiento de explantes no estimulados con $indo_{sim}$ dio como resultado un aumento de 58 veces en agrecano. Este aumento se suprimió completamente mediante estimulación de explantes acondicionados con $indo_{sim}$ con IL-1.

- 20 SEQ y todos sus constituyentes aumentaron significativamente la expresión de agrecano en explantes no estimulados. SEQ_{sim} aumentó la expresión de agrecano en explantes no estimulados de una manera dependiente de la dosis (aumento de 42,8 y de 215,7 veces para 0,06 y 0,18 mg/ml, respectivamente).

La estimulación de explantes acondicionados con IL-1 dio como resultado un aumento significativo en la expresión de agrecano en SEQ y todos sus constituyentes, con la excepción de SC_{sim} (0,18 mg/ml; aumento de 1,4 veces).

- 25 METABOLISMO CELULAR

- 30 GAG: La [GAG] en los medios disminuyó significativamente a las 24 y 48 h en explantes control no estimulados. El acondicionamiento de explantes no estimulados con $indo_{sim}$ dio como resultado una [GAG] en los medios significativamente superior en todos los puntos de tiempo en comparación con los controles no estimulados (figura 1). La estimulación con IL-1 (10 ng/ml) dio como resultado una elevación significativa de [GAG] en los medios en explantes de control a las 24 h después de la estimulación. La [GAG] en los medios de explantes acondicionados con $indo_{sim}$ fue elevada en comparación con los controles estimulados a lo largo de la duración del experimento, pero no significativamente ($p = 0,1$). No hubo ningún efecto significativo de la IL-1 sobre explantes acondicionados con $indo_{sim}$.

- 35 No hubo ningún efecto significativo de SEQ_{sim} (0,06 y 0,18 mg/ml) sobre la liberación de GAG inducida por IL-1 (figura 1, A). La [GAG] en los medios fue significativamente superior en SEQ_{sim} acondicionada de explantes no estimulados (0-06 mg/ml) en comparación con los controles no estimulados (figura 1, B). El acondicionamiento con SEQ_{sim} (0,18 mg/ml) dio como resultado un aumento no significativo en la [GAG] en los medios ($p = 0,06$).

- 40 No hubo ningún efecto de BO_{sim} sobre la liberación de GAG en explantes estimulados con IL-1 (figura 1, A). El acondicionamiento de explantes no estimulados con BO_{sim} (0,06 mg/ml) redujo significativamente la [GAG] en los medios en comparación con los controles no estimulados (figura 1, B). Hubo una tendencia a una disminución en la [GAG] en los medios de explantes acondicionados con BO_{sim} (0,18 mg/ml) ($p = 0,06$).

Viabilidad. No hubo ningún efecto significativo de la estimulación con IL-1 (10 ng/ml) sobre la viabilidad celular. El acondicionamiento de explantes con $indo_{sim}$ no tuvo ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular en explantes no estimulados o estimulados con IL-1 (figura 3).

- 45 La SEQ_{sim} (0,18 mg/ml) dio como resultado un aumento significativo en la viabilidad celular en explantes estimulados con IL-1 en comparación con los controles estimulados (figura 3, A), mientras que los explantes estimulados acondicionados con SEQ_{sim} (0,06 mg/ml) tendían a aumentar en % de viabilidad ($p = 0,06$). El acondicionamiento con SEQ_{sim} no tuvo efecto sobre los explantes no estimulados (figura 3, B).

- 50 Hubo una tendencia hacia viabilidad celular aumentada en explantes no estimulados acondicionados con BO_{sim} (0,18 mg/ml) ($p = 0,09$) (figura 3, B). El aumento en la viabilidad celular fue significativo cuando esta dosis se aplicó a explantes estimulados con IL-1 (figura 3, A).

Discusión

La metodología descrita evaluó el efecto de un digesto simulado de SEQ y BO sobre el metabolismo de cartilago, en

presencia y ausencia de IL-1, con respecto a PGE₂, NO, GAG y viabilidad celular. Se usaron los datos de la expresión génica para realizar predicciones acerca de un mecanismo de acción de SEQ.

También se ha mostrado que Indo_{sim} no influye en la expresión de agregano mediada por IL-1 en explantes estimulados con IL-1, un efecto que se ha notificado en explantes de cartílago sometidos a tensión mecánica (Iimoto *et al.*, 2005).

Estos datos caracterizan la indometacina como antiinflamatorio eficaz predominantemente a través de la inhibición de cox. Sin embargo, su incapacidad para reducir la expresión de agregano mediada por IL-1 y su efecto de incremento sobre la expresión de iNOS mediada por IL-1, sugieren que el cartílago expuesto a la indometacina continuaría degenerándose a través de una disminución en la formación de matriz y padecería un aumento de muerte celular mediada por óxido nítrico.

En efecto, estos efectos adversos se han notificado en perros artríticos usando indometacina profiláctica (Hungin y Kean 2001), y la indometacina se asocia con empeoramiento de algunos indicadores fisiopatológicos de artritis en seres humanos (Rashad *et al.*, 1989; Huakinson *et al.*, 1995). Cuando se aplicó la indo_{sim} a explantes de cartílago en el estudio actual, hubo un aumento en la producción de NO mediada por IL-1, pero esto no iba unido con una disminución en la viabilidad celular. La muerte celular posterior a la lesión de cartílago se ha notificado 7 días tras la lesión mecánica, y esta apoptosis se medió, hasta cierto grado, mediante bloqueantes específicos de la actividad iNOS (Green *et al.*, 2006), mientras que células parecidas a condrocitos aisladas experimentaron cambios apoptóticos en un plazo de 48 h de exposición a IL-1 1 ng/ml (Yasuhara *et al.*, 2005).

Sin embargo, la regulación por incremento transcripcional de agregano de más de 120 veces proporciona una buena evidencia de que SEQ puede estimular la formación de cartílago nuevo ante una exposición inflamatoria mediante IL-1. El aumento en GAG observado en explantes no estimulados acondicionados con SEQ (0,06 mg/ml) fue probablemente un reflejo de una provisión aumentada de GAG exógenos. Es probable que este aumento no fuera significativo en explantes acondicionados con la dosis superior debido a una formación significativamente aumentada de proteoglicano nuevo, como se demuestra mediante un aumento en la expresión de agregano por los explantes.

Además, este aumento en los GAG no se vio en explantes estimulados con IL-1, sugiriendo que SEQ puede de hecho estar inhibiendo la liberación de GAG inducida por IL-1 además de estimular la síntesis de proteoglicano.

Un criterio de valoración final que se vio afectado significativamente por SEQ y BO en el experimento actual fue un aumento en la viabilidad celular posterior a la exposición a IL-1. Este aumento no fue una apoptosis reducida, como puede predecirse de las propiedades inhibitorias de iNOS y NO de SEQ, puesto que no reflejó recuperación de células estimuladas con IL-1 de vuelta a un estado no estimulado. Más bien, la viabilidad celular aumentó por encima de los niveles de controles no estimulados. El mecanismo primario para el crecimiento de condrocitos en cartílago se ha atribuido a la unión de PGE₂ a uno de sus cuatro receptores de superficie celular, EP1, EP2, EP3 y EP4. Esta propiedad se ha asociado específicamente a EP1 (Del Toro *et al.*, 2000; Brochhausen *et al.*, 2006) o a EP2 (Aoyama *et al.*, 2005).

Lo que se ha visto ahora/se ha observado en los estudios descritos en el presente documento es que SEQ_{sim} y/o BO_{sim} producen un aumento en la proliferación de condrocitos, dando como resultado un aumento en la tinción de células vivas. Esto también proporciona una base para la inhibición concurrente de PGE₂. Las sustancias que se comportan como agonistas para los receptores de PGE₂ actúan para “engañar” a las células para tratar al agonista como si fuera la molécula diana (es decir, PGE₂). Así, la inclusión de un agonista de PGE₂ puede tener un efecto similar como aumentar la cantidad de PGE₂ en el entorno pericelular.

Se conoce que la producción de PGE₂ de células estimuladas con IL-1 se inhibe aumentando concentraciones extracelulares de PGE₂ (Akarasereenont *et al.*, 1999).

Conclusiones

El digesto simulado de SEQ inhibió significativamente la formación *in vitro* de PGE₂ y de NO en explantes de cartílago estimulados con IL-1, mientras no mostraba ningún efecto sobre la liberación de GAG y aumentaba la viabilidad celular. Un digesto simulado de *Biota orientalis*, un constituyente previamente no investigado de SEQ, inhibió la liberación de los GAG por explantes de cartílago no estimulados. Este constituyente también aumentó significativamente la viabilidad celular en explantes de cartílago estimulados con IL-1. Tomados juntos, estos datos proporcionan evidencia de que SEQ protege al cartílago de los efectos dañinos de IL-1 y aumenta la viabilidad de condrocitos.

Los modelos de inflamación de cartílago en caballos se notifican ampliamente e incluyen exposiciones intraarticulares tales como lipopolisacárido (Jacobsen *et al.*, 2006), adyuvante completo de Freund (Toutain y Cester 2004) o monoyodoacetato de Na (Welch *et al.*, 1991); o perturbaciones quirúrgicas que incluyen creación de fragmentos osteocondrales (Frisbie *et al.*, 2007), lesiones por impacto de contusión focal (Bolam *et al.*, 2006) y transección ligamentosa (Simmons *et al.*, 1999). Aunque estos modelos demuestran de manera competente la activación de una complejidad de mecanismos inflamatorios dentro del cartílago y hueso subcondral y tejidos

blandos asociados, representan una respuesta inflamatoria predominantemente traumática. Son menos representativos de los cambios bioquímicos, funcionales y fisiopatológicos más sutiles en inflamación articular incipiente o subaguda que caracteriza la mayor parte de casos de cojera en caballos de carreras (Steel *et al.*, 2006).

Métodos

5 Dietas: Se preparó polvo de Sasha's EQ en nuestro laboratorio combinando abulón (AB), mejillón de labios verdes de Nueva Zelanda (NZGLM), cartílago de tiburón (SC) y BO (Interpath Pty Ltd, Australia) según la composición proporcionada en la tabla 2. Se preparó una ración mixta de Sasha's EQ (SEQ) combinando polvo de Sasha's EQ (10 g/kg), melaza (20 g/kg) y saborizante (esencia para caballo de dulce esencial D 2344. Essentials Inc. Abbotsford, BC.) (1 g/kg) a una ración para caballo de pienso dulce (tabla 3), y combinando en una mezcladora de pienso en lotes de 5 kg hasta un mezclado completo. Se preparó la ración control (CON) usando la misma dieta de pienso dulce combinada con melaza (~20 g/kg) y saborizante (1 g/kg).

10 Caballos: Se asignaron al azar 11 caballos sanos sin signos de inflamación articular (3 purasangre, 8 Standardbred; edad de 5 - 12 años; 10 caballos castrados, 1 yegua) o bien al grupo A (SEQ; 1,5 kg/día; n = 6) o bien al grupo B (CON; 1,5 kg/día; n = 5). El experimento de 28 días consistió en dos fases - fase 1: pretratamiento (14 días); fase 2: tratamiento (14 días). La complementación se inició en el día 0 y continuó durante la duración del experimento (figura 5). Se produjo la recogida de muestras en los días 0 (pre), 14 (iny-1), 15 (2 muestras: iny-2 - tomada inmediatamente antes de la inyección; iny-2-2 - tomada 8 h después de la inyección), 16 (día 1), 18 (día 3), 21 (día 7) y 28 (día 14); en estos días se tomó sangre de la vena yugular y se muestreó el líquido sinovial de ambas articulaciones intercarpianas mediante artrocentesis aséptica (véase a continuación). Se inyectó una exposición inflamatoria - interleucina-1 β (IL-1) recombinante - en la articulación intercarpiana izquierda o derecha en el día 14 (iny-1; 10 ng en 500 μ l de solución salina estéril) y 15 (iny-2; 100 ng en 500 μ l de solución salina estéril). Se inyectó un volumen igual de solución salina estéril en la articulación intercarpiana contralateral. Se midió la circunferencia de la articulación como indicador de derrame articular con una cinta métrica en cada muestreo de fluido de articulación.

20 Se llevaron a todos los caballos a corrales de ejercicio durante el día y se alojaron en cubículos durante la noche. Se les proporcionó un lecho de virutas de madera y se les ofreció heno, agua y sales minerales a voluntad. Se aprobaron todos los procedimientos por el Comité del cuidado de animales de la Universidad de Guelph según las directrices del Consejo Canadiense de Protección de los Animales.

25 Artrocentesis: Se afeitaron las rodillas tanto de las patas izquierdas como de las derechas, y se preparó de manera aséptica el área usando clorhexadina (4%) y se enjuagó con alcohol isopropílico al 70%. Se insertó una aguja de 1,5" de calibre 22 estéril, en la cara lateral de la articulación intercarpiana izquierda. Luego se unió una jeringuilla estéril de 3 cc, y se aspiraron aproximadamente 1,5 - 2 ml de líquido sinovial y se inyectó inmediatamente en un tubo de ensayo Vacutainer de K₂-heparina estéril. Luego se repitió el procedimiento para la articulación intercarpiana derecha. En los días 14 (iny-1) y 15 (iny-2), se inyectó IL-1 (500 μ l) o bien en el intercarpiano izquierdo o bien en el derecho (500 μ l de solución salina inyectada en la articulación contralateral) tras la aspiración de líquido sinovial y antes de la retirada del conector de aguja. Se retiraron aproximadamente 1,5 ml de líquido sinovial del tubo de ensayo Vacutainer y se colocaron en un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron a 11.000 x g durante 10 minutos para retirar el residuo celular. Se colocó el sobrenadante en otro tubo de microcentrífuga que contenía 10 μ g de indometacina y se congeló a -80°C hasta que se analizó para determinar PGE₂, GAG y NO. Se añadió indometacina al líquido sinovial tras recogerse con el fin de impedir la formación adicional de PGE₂ durante el almacenamiento de las muestras. Se enviaron los restantes ~0,5 ml de líquido sinovial al Laboratorio de salud animal (Universidad de Guelph) para análisis citológico.

Citología del líquido sinovial

30 Se retiraron 1,0 - 1,5 ml de fluido del tubo de ensayo Vacutainer para los análisis de PGE₂, NO y GAG (véase a continuación), y se analizaron aproximadamente 0,5 ml para la cuenta de células nucleadas totales (contador Z2 COULTER COUNTER; Beckman Coulter Canada Inc. Mississauga ON), proteína (refractómetro) y diferencial celular (en 100 células nucleadas) en el Laboratorio de salud animal.

35 [PGE₂] en el líquido sinovial: Se descongeló el líquido sinovial hasta temperatura ambiente, luego se incubó con 20 μ l de hialuronidasa (10 mg/ml) en un agitador basculante de tubos durante 30 minutos a 37°C para digerir el ácido hialurónico. Luego se diluyó la muestra 1:2 con ácido fórmico (0,1%) y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se analizó para determinar PGE₂ mediante un kit para ELISA comercialmente disponible (GE Amersham, Baie D'Urfé, Québec). Se extrajo la PGE₂ de la muestra usando reactivos de lisis proporcionados para disociar PGE₂ de los receptores de membrana solubles y las proteínas de unión, y luego se cuantificó según el protocolo del kit. Se leyeron las placas usando un lector de microplacas Victor 3 (Perkin Elmer, Woodbridge ON) con absorbancia fijada a 450 nm. Se desarrolló una curva patrón polinómica de 3^{er} orden de ajuste óptimo para cada placa ($R^2 \geq 0,99$), y se usaron estas ecuaciones para calcular las concentraciones de PGE₂ para las muestras de cada placa.

40 [GAG] en el líquido sinovial: Se digirieron muestras de ácido hialurónico en líquido sinovial con hialuronidasa tal como se describió anteriormente. Se determinó la concentración de GAG del líquido sinovial usando un ensayo

espectrofotométrico con 1,9-DMB tal como se describe por Chandrasekhar *et al.* (1987). Se diluyeron las muestras 1:3 con tampón de dilución y se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añadió clorhidrato de guanidina (275 g/l) a cada pocillo seguido inmediatamente por adición de 150 μ l de reactivo de DMB. Se incubaron las placas en la oscuridad durante 10 minutos, y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas Victor 3 a 530 nm. Se comparó la absorbancia de la muestra con la de un patrón de sulfato de condroitina bovina (Sigma, Oakville ON). Se desarrolló una curva patrón lineal de ajuste óptimo para cada placa ($R^2 \geq 0,99$), y se usaron estas ecuaciones para calcular las concentraciones de GAG para las muestras en cada placa.

NOI en el líquido sinovial: Se analizó el nitrito (NO_2^-), un producto de oxidación estable de NO, mediante la reacción de Griess (Fenton *et al.*, 2002). Se añadieron muestras de TCM no diluidas a placas de 96 pocillos. Se añadieron sulfanilamida (0,01 g/ml) y clorhidrato de N-(1)-naftiletilendiamina (1 mg/ml) disueltos en ácido fosfórico (0,085 g/l) a todos los pocillos, y se leyó la absorbancia en un plazo de 5 minutos en un lector de microplacas Victor 3 a 530 nm. Se comparó la absorbancia de la muestra con un patrón de nitrito de sodio.

Análisis de los datos y presentación

El análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas (RM) de dos vías se usó para detectar diferencias entre los tratamientos. Cuando se obtuvo una razón F significativa, la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Holm-Sidak se usó para identificar diferencias entre los tratamientos. El ANOVA de RM de una vía se usó para detectar diferencias dentro de los tratamientos con respecto al tiempo. Para los datos de sangre y líquido sinovial, se realizaron comparaciones de una vía de datos frente a los datos pre e iny-1, puesto que cada uno representaba la referencia para dieta e inyecciones de IL-1, respectivamente. Los datos se presentan como medias \pm EEM (error estándar de la media). Los gráficos para los datos bioquímicos y de hematología se trazan a escala para intervalos de referencia fisiológicos a menos que se establezca lo contrario. Los intervalos de referencia son aquéllos publicados por el Laboratorio de salud animal, Universidad de Guelph (<http://www.labservices.uoguelph.ca/units/ahl/files/AHL-userguide.pdf>).

Resultados

Líquido sinovial

PGE₂:

Caballos alimentados con CON: No hubo cambio significativo en la [PGE₂] en el líquido sinovial en articulaciones en las que se inyectó solución salina en cualquier momento (figura 7, A). En relación con las concentraciones previas a la inyección, la [PGE₂] aumentó significativamente en iny-2-2 ($321,3 \pm 161,8$ pg/ml; $p = 0,04$) en articulaciones en las que se inyectó IL-1, momento en el que la [PGE₂] en el líquido sinovial fue significativamente superior en articulaciones en las que se inyectó IL-1 que en articulaciones en las que se inyectó solución salina ($p < 0,001$).

Caballos alimentados con SEQ: Los datos representan $n = 5$, ya que un caballo de resultado atípico se eliminó del análisis. La PGE₂ no cambió en las articulaciones en las que se inyectó solución salina de caballos alimentados con SEQ. Como los caballos alimentados con CON, hubo un pico en el aumento de [PGE₂] en la iny-2-2 ($175,4 \pm 89,2$ pg/ml) en las articulaciones en las que se inyectó IL-1 de caballos alimentados con SEQ (figura 7, B). Sin embargo, este aumento no fue significativo en comparación con las concentraciones previas a la inyección ($p > 0,05$). La respuesta de PGE₂ a la inyección de solución salina no fue diferente en los caballos alimentados con SEQ en comparación con los caballos alimentados con CON. No hubo diferencia significativa en la respuesta de PGE₂ a la inyección de IL-1 en comparación con la solución salina en caballos alimentados con SEQ.

Aunque la [PGE₂] media en la iny-2-2 en caballos alimentados con SEQ fue aproximadamente el 55% de la de los caballos alimentados con CON, la variabilidad acerca de las medias no dio como resultado ninguna diferencia significativa entre las dietas.

GAG:

Caballos alimentados con CON: La [GAG] en el líquido sinovial aumentó en las articulaciones en las que se inyectó solución salina entre la iny-1 ($18,3 \pm 6,8$ μ g/ml) y el día 1 ($48,1 \pm 9,6$ μ g/ml) (figura 8, A). La inyección de IL-1 (10 ng) provocó un aumento rápido y significativo en la [GAG] en el líquido sinovial entre la iny-1 ($24,5 \pm 7,3$ μ g/ml) y la iny-2 ($77,6 \pm 4,4$ μ g/ml). La [GAG] en el líquido sinovial permaneció significativamente elevada en las articulaciones en las que se inyectó IL-1 en la iny-2-2 ($66,0 \pm 9,6$ μ g/ml) y el día 1 ($53,3 \pm 11,4$ μ g/ml) en comparación con las concentraciones previas a la inyección. La magnitud del aumento en la [GAG] en el líquido sinovial fue significativamente superior en las articulaciones en las que se inyectó IL-1 que en las articulaciones en las que se inyectó solución salina ($p = 0,003$).

Caballos alimentados con SEQ: La [GAG] en el líquido sinovial tendió a aumentar ($p = 0,09$) tanto en las articulaciones en las que se inyectó solución salina como en las que se inyectó IL-1 entre la pre (solución salina: $29,3 \pm 5,9$ μ g/ml; IL-1: $27,0 \pm 10,8$ μ g/ml) y la iny-1 (solución salina: $85,5 \pm 28,0$ μ g/ml; IL-1: $83,2 \pm 27,9$ μ g/ml), sugiriendo un efecto de la dieta sobre la [GAG] en el líquido sinovial (figura 8, B). No hubo ningún cambio en la

[GAG] en el líquido sinovial en las articulaciones en las que se inyectó solución salina o IL-1 durante el transcurso del experimento. No hubo diferencia significativa en la [GAG] en el líquido sinovial de articulaciones en las que se inyectó IL-1 y solución salina.

- 5 La [GAG] en el líquido sinovial en articulaciones en las que se inyectó IL-1 y solución salina fue significativamente superior en caballos alimentados con SEQ que en caballos alimentados con CON ($p < 0,001$). Esta diferencia fue lo más probablemente un efecto de la dieta, y no un efecto de IL-1, como se evidencia mediante el hecho de que la mayoría del aumento se produjo antes de cualquier inyección de IL-1.

NO:

- 10 Caballos alimentados con CON: La [NO] en el líquido sinovial fue baja y variable durante el transcurso del experimento tanto en las articulaciones en las que se inyectó solución salina como en la que se inyectó IL-1. No hubo ningún efecto significativo de la inyección o bien de solución salina o bien de IL-1 sobre los niveles de NO en caballos alimentados con CON a lo largo del tiempo. La magnitud de la [NO] en el líquido sinovial no fue diferente entre las articulaciones en las que se inyectó IL-1 y en las que se inyectó solución salina.

- 15 Caballos alimentados con SEQ: No hubo ningún cambio en la [NO] en el líquido sinovial en articulaciones en las que se inyectó IL-1 o en las que se inyectó solución salina en cualquier momento durante el transcurso del experimento. No hubo diferencia significativa entre la IL-1 o la solución salina en ningún momento.

No hubo ningún efecto significativo de la dieta sobre la [NO] en el líquido sinovial en articulaciones en las que se inyectó IL-1 o en las que se inyectó solución salina.

Citología del líquido sinovial:

- 20 Caballos alimentados con CON: La cuenta de células totales antes de la inyección ($0,61 \pm 0,1 \times 10^9/l$) fue significativamente elevada por la provisión de IL-1 exógena (10 ng) en la iny-2 ($40,17 \pm 16,1 \times 10^9/l$). La cuenta de células no aumentó adicionalmente tras la 2ª inyección de IL-1 (100 ng), sino que permaneció ligeramente (pero no significativamente) elevada a lo largo del día 1. La cuenta de células de la iny-1 en articulaciones en las que se inyectó solución salina ($0,6 \pm 0,2 \times 10^9/l$) aumentó levemente, alcanzando un máximo en el día 1 ($6,0 \pm 2,6 \times 10^9/l$),
25 pero este aumento no fue significativo. Las cuentas de células totales de las articulaciones en las que se inyectó solución salina y en las que se inyectó IL-1 fueron significativamente diferentes unas de otras en la iny-2 [es decir, 24 h tras la 1ª inyección de IL-1 (10 ng)]. El aumento en la cuenta de las células se debió principalmente a un aumento en el porcentaje relativo de neutrófilos. El porcentaje de neutrófilos aumentó significativamente tanto en articulaciones en las que se inyectó IL-1 como en las que se inyectó solución salina tras la primera inyección. Las
30 cuentas de neutrófilos disminuyeron significativamente tanto en articulaciones en las que se inyectó IL-1 como en las que se inyectó solución salina entre el día 1 y el 3 sin aumento adicional para el resto del experimento. No hubo ninguna diferencia en el % de neutrófilos entre las articulaciones en las que se inyectó IL-1 y en las que se inyectó solución salina.

- 35 Caballos alimentados con SEQ: La cuenta de células totales antes de la inyección ($0,4 \pm 0,03 \times 10^9/l$) fue significativamente elevada por la provisión de IL-1 exógena (10 ng) mediante la iny-2 ($27,5 \pm 8,7 \times 10^9/l$). La cuenta de células no aumentó adicionalmente mediante la iny-2-2, sino que permaneció significativamente elevada a lo largo del día 1. La cuenta de células totales de la iny-1 en articulaciones en las que se inyectó solución salina ($0,4 \pm 0,1 \times 10^9/l$) aumentó levemente, alcanzando un máximo en la iny-2-2 ($4,0 \pm 2,6 \times 10^9/l$), pero este aumento no fue significativo. Las cuentas de células totales de las articulaciones en las que se inyectó solución salina y en las que
40 se inyectó IL-1 fueron significativamente diferentes unas de otras en la iny-2 (es decir, 24 h tras la 1ª inyección de IL-1 de 10 ng), la iny-2-2 (es decir, 8 h tras la 2ª inyección de IL-1 de 100 ng) y el día 1 (es decir, 24 h tras la 2ª inyección de IL-1 de 100 ng). Los neutrófilos porcentuales aumentaron significativamente tanto en articulaciones en las que se inyectó IL-1 como en las que se inyectó solución salina tras la primera inyección. El aumento en la concentración de neutrófilos de articulaciones en las que se inyectó solución salina puede haberse podido atribuir a
45 una inflamación menor provocada por el traumatismo por inyección. Las cuentas de neutrófilos (%) disminuyeron significativamente tanto en articulaciones en las que se inyectó IL-1 como en las que se inyectó solución salina entre el día 1 y el 3 con un segundo pico significativo en el día 7. No hubo ninguna diferencia en el % de neutrófilos entre las articulaciones en las que se inyectó IL-1 y en las que se inyectó solución salina.

- 50 No hubo diferencia significativa en el efecto de las dietas de SEQ y de CON sobre las cuentas de células totales o el % de neutrófilos en articulaciones en las que se inyectó IL-1 o en las que se inyectó solución salina.

- 55 Caballos alimentados con CON: La [proteína] en el líquido sinovial aumentó significativamente mediante inyección de 10 ng de IL-1 (de $20 \pm 0,0$ g/l a $39,4 \pm 4,0$ g/l) (figura 9, A). La [proteína] no aumentó adicionalmente mediante inyección de 100 ng de IL-1, y disminuyó significativamente 24 h tras la inyección de 100 ng. La inyección de solución salina también dio como resultado un aumento significativo en la [proteína] inmediatamente tras la primera inyección, volviendo a las concentraciones de referencia en el día 1 ($25,5 \pm 1,5$ g/l). La magnitud del aumento en la [proteína] durante el transcurso del experimento fue significativamente superior en articulaciones en las que se inyectó IL-1 que en las que se inyectó solución salina ($p = 0,01$).

5 Caballos alimentados con SEQ: La inyección de 10 ng de IL-1 dio como resultado un aumento significativo en la proteína del líquido sinovial en la iny-2 ($38,7 \pm 4,9$ g/l), la iny-2-2 ($36,2 \pm 4,4$ g/l) y el día 1 ($27,8 \pm 3,8$ g/l) en comparación con la iny-1 (20 ± 0 g/l) (figura 9, B). No hubo ningún efecto adicional de la 2ª inyección de IL-1 de 100 ng sobre la [proteína]. La inyección de solución salina también dio como resultado un aumento significativo en la [proteína] en la iny-2-am ($27,5 \pm 3,0$ g/l) y la iny-2-pm ($25,8 \pm 2,5$ g/l) en comparación con la iny-1 ($20,6 \pm 0,6$ g/l). La magnitud del aumento en la [proteína] en el líquido sinovial fue significativamente superior en articulaciones en las que se inyectó IL-1 que en articulaciones en las que se inyectó solución salina ($p = 0,003$).

No hubo diferencia significativa en el efecto de las dietas de SEQ y de CON sobre la [proteína] en el líquido sinovial en articulaciones en las que se inyectó IL-1 o en las que se inyectó solución salina.

10 Circunferencia de la articulación:

Caballos alimentados con CON: No hubo cambio significativo en la circunferencia a lo largo del tiempo en las articulaciones en las que se inyectó IL-1 o en las que se inyectó solución salina, y no hubo diferencia significativa en la circunferencia de la articulación entre las articulaciones en las que se inyectó IL-1 y en las que se inyectó solución salina (figura 6, A).

15 Caballos alimentados con SEQ: Hubo un aumento significativo en la circunferencia de la articulación en las articulaciones en las que se inyectó IL-1 entre la iny-1 ($31,1 \pm 0,2$ cm) y la iny-2 ($31,9 \pm 0,5$ cm) en caballos alimentados con SEQ (figura 6, B). La circunferencia de la articulación permaneció significativamente elevada en la iny-2-2 ($31,7 \pm 0,4$ cm) antes de disminuir hasta los niveles previos a la inyección. El mismo patrón se mostró exactamente en las articulaciones en las que se inyectó solución salina de caballos alimentados con SEQ.

20 La circunferencia de la articulación de articulaciones en las que se inyectó IL-1 fue significativamente inferior en caballos alimentados con SEQ que en caballos alimentados con CON ($p < 0,001$).

Fraccionamiento de aceite de Biota

Cromatografía

25 Se fraccionó el aceite de las semillas de *Biota orientalis* usando una HPLC preparativa 1200 de Agilent equipada con un detector de red de diodos y un recogedor de fracciones automatizado. La columna usada fue una columna Agilent Prep C18, 10 μm (30 x 250 mm) con el siguiente gradiente a una velocidad de flujo de 20 ml/minuto con una inyección de 900 μl de constituyente 4. 0-5 minutos agua al 80%, acetonitrilo al 20%. 5-7 minutos el gradiente cambia, agua al 10%, acetonitrilo al 90%, de 7-25 minutos agua al 10%, isocrática, acetonitrilo al 90%. La detección de la fracción se logró a 254 nm.

30 Espectrometría de masas:

La detección por espectrometría de masas se realizó en una espectrometría de masas con tiempo de vuelo Agilent 6210 MSD en modo de ion tanto positivo como negativo. Se usaron las siguientes condiciones de ionización por electropulverización, gas de secado: nitrógeno (7 ml min⁻¹, 350°C); gas nebulizador: nitrógeno (15 psi); voltaje capilar: 4,0 kV; temperatura de vaporización: 350°C y voltaje de cono: 60 V

35 La figura 13 muestra el espectro cromatográfico del aceite, y se recogieron diversas fracciones y se enumeraron tal como se muestra.

Potencial condroprotector/condrogénico de fracciones del aceite de Biota

40 Se sometieron a prueba *in vitro* un total de diez fracciones (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fri, Frij, FrV, FrVi y FrVii). Condrocitos articulares humanos normales de Clonetics® (NHAC-rodilla) obtenidos de Lonza Australia Pty Ltd, se hicieron crecer en un medio de crecimiento de condrocitos (CGM) complementado con factores de crecimiento. Se usaron los NHAC en el paso n.º 3-4 para todos los experimentos.

45 La fracción 1 fue soluble en agua, las fracciones 2-10 se disolvieron a una concentración final de 64 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) de calidad para cultivo celular. Las células de NHAC se hicieron crecer en presencia o ausencia de las fracciones mencionadas anteriormente durante 24, 48 horas y los efectos en la morfología se observaron durante el tratamiento. Los siguientes ensayos se llevaron a cabo usando los protocolos de acuerdo con las instrucciones del kit:

Viabilidad/citotoxicidad :

- Ensayo de citotoxicidad (lactato deshidrogenasa) (Roche Applied Science)

Crecimiento y proliferación celular:

- 50
- Marcaje de BrdU y kit III de detección (Roche Applied Science)

- Kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT (Molecular Probes: Invitrogen)

Apoptosis/necrosis

Kit de extracción por escalones de ADN apoptótico (Biovision)

Kit Annexin-V-Fluor (Roche Applied Science)

- 5 Las observaciones del efecto sobre la morfología de los condrocitos tras el tratamiento con las diversas fracciones revelaron que la fracción 1, incluso en la concentración más alta (128 µg/ml) sometida a prueba, conservó la morfología celular normal y ayudó en el mantenimiento del crecimiento celular. Otras fracciones provocaron morfología apoptótica y necrótica a concentraciones superiores (128-32 µg/ml) conduciendo a un desplazamiento de células adherentes y muerte celular.
- 10 La fracción 1 no mostró ninguna citotoxicidad hacia los NHAC ni siquiera a la concentración más alta (128 µg/ml) sometida a prueba. A la concentración más alta todas las otras fracciones fueron citotóxicas. Sin embargo Fr V, Fr Vi y Fr i mostraron baja citotoxicidad hacia los NHAC a ≤ 64 µg/ml. Se observó apoptosis y necrosis celular muy baja (en el intervalo normal), en los condrocitos tratados con Fr 1, Fr i y Fr V.

- 15 En el ensayo de proliferación celular de BrdU, la fracción 1 potenció significativamente la proliferación de NHAC de una manera dependiente de la dosis. Otras fracciones estimularon significativamente la proliferación celular a conc ≤ 8 µg/ml pero fueron citotóxicas a concentraciones superiores (figuras 14 y 15).

Se encontró que la fracción 1 era soluble en agua y se investigó adicionalmente y se mostró que contenía cinco componentes separados mediante cromatografía analítica. La dilucidación estructural luego identificó cada uno de estos compuestos como sigue:

F1.1 ácido (9Z,13S,15Z)-12,13-epoxioctadeca-9,11,15-trienoico

F1.2a ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico (ALA);

F1.2b ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico (GLA); y

F1.3 ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico;

F1.4 ácido 9-octadecenoico

- 20 Cada una de las fracciones anteriores se sometió luego individualmente a ensayo otra vez para determinar la viabilidad/citotoxicidad, el crecimiento celular y la proliferación, la apoptosis/necrosis usando las pruebas tal como se mencionó anteriormente.

- 25 Se encontró que cada una de las fracciones 1.1-1.4 era soluble en agua y no mostraron citotoxicidad. Además, no hubo diferencia significativa entre el índice apoptótico (A/I) y el índice necrótico (índice necrótico (N/I) de células tratadas en comparación con células no tratadas, todas fueron menos de 10 unidades.

La figura 16 muestra el nivel de proliferación de condrocitos para F1.1-1.4 en las condiciones del ensayo de BrDu, y la F1.4 es la más activa en relación con el crecimiento celular. También se muestra el nivel de actividad de las fracciones combinadas, marcadas como F1.

- 30 Se ha mostrado que las fracciones F1.1-1.4, y la fracción F1 combinada, presentan alta eficacia en el aumento de proliferación de condrocitos de la rodilla humana

Discusión

- 35 Estos datos presentan evidencia para un modelo reversible de grado mínimamente invasivo de una inflamación articular de fase temprana que puede usarse para evaluar supuestos nutraceuticos antiinflamatorios. Se eligió la IL-1 como exposición intraarticular debido a su papel central en la propagación de la respuesta inflamatoria en artritis (Jacques *et al.*, 2006), y la PGE₂ se seleccionó como variable dependiente primaria debido a su importancia en la regulación del metabolismo de la matriz (Pavlovic *et al.*, 2006). Con el fin de establecer un programa de muestreo, se investigó el transcurso del tiempo de la producción de PGE₂ posterior a la inyección intraarticular de IL-1. Se predijo una respuesta de PGE₂ máxima a aproximadamente 8 h tras la inyección basándose en la evidencia de que la [IL-1] intraarticular se eleva de manera máxima en el líquido sinovial equino a aproximadamente 4 h tras la
- 40 provisión de IL-1 exógena (Hardy *et al.*, 1998). La PGE₂ se eleva posteriormente a aproximadamente 6 h (Sedgewick y Lees 1986). Por tanto, se predijo que una muestra de 8 h proporcionaría una estimación razonable de un aumento máximo en la [PGE₂] en el líquido sinovial.

- 45 La inyección de 10 ng inicial proporcionada a los caballos fue por mucho en exceso de la concentración de IL-1 conocida por asociarse con una enfermedad articular en caballos ($\geq 4,5$ pg/ml; Bertone *et al.*, 2001) y se esperó que produzca una respuesta de PGE₂ significativa. Sin embargo, aunque eficaz en el reclutamiento primario de inicio de

células inflamatorias al espacio articular y que eleva la [GAG] en el líquido sinovial, se demostró que una sola inyección de IL-1 de 10 ng dio como resultado una escasa respuesta de PGE₂ de 8 h. Esto puede atribuirse, al menos en parte, a diferencias específicas de las especies en la estructura de la proteína de IL-1 y su interacción con los tejidos diana. La secuencia de proteína de IL-1 β humana (LOCUS CAG28607; Ebert *et al.*, 2004) comparte sólo el 66% de la identidad con la IL-1 equina (LOCUS Q28386; Kato *et al.*, 1995), proporcionando alguna explicación del porqué el tejido equino puede ser menos sensible a la estimulación con IL-1 humana que con IL-1 equina. Se notifica que la provisión de 175 ng de IL-1 β humana recombinante intraarticular exógeno da como resultado una respuesta inflamatoria aguda en preparaciones de extremidades aisladas de caballos (Hardy *et al.*, 1998). En un esfuerzo por limitar la respuesta inflamatoria hasta una magnitud subclínica, se inyectó una dosis de IL-1 “de cebado” con el fin de establecer la expresión de los receptores de IL-1 en condrocitos y sinoviocitos, y seguido por una segunda dosis de IL-1 “de exposición” inferior a 175 ng para producir una respuesta de PGE₂ significativa.

El protocolo de la inyección de IL-1 doble dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en la PGE₂ a las 8 h tras la 2ª inyección. Ninguno de los caballos alimentados con CON eran abiertamente cojos al caminar o al trote breve en cualquier momento durante el experimento, a pesar de que la [PGE₂] en el líquido sinovial de pico media (498 pg/ml) es acorde con la asociada con la cojera en caballos (488 pg/ml; de Grauw *et al.*, 2006). El aumento en la PGE₂ no fue acompañado de un aumento concomitante en el NO. Esto proporciona una posible explicación respecto al porqué estos caballos no eran cojos, puesto que la transmisión y percepción de dolor nociceptivo se producía predominantemente como resultado del efecto combinado de PGE₂ y NO elevados. Los caballos alimentados con CON pueden haber demostrado una cojera de bajo grado si se hubieran sometido a ejercicio moderado, pero esto no se emprendió debido al efecto de confusión del ejercicio sobre la [PGE₂] en el líquido sinovial (van den Boom *et al.*, 2005). El aumento observado en la [PGE₂] en el líquido sinovial en caballos alimentados con CON proporcionó buena evidencia de una inflamación inducida por IL-1 de bajo grado dentro de la articulación.

La movilización de células inflamatorias y la liberación de glucosaminoglicano en el líquido sinovial fueron más sensibles a la estimulación con IL-1 que la producción de PGE₂, ya que se observó un aumento en la [GAG] y la [neutrófilos] en el líquido sinovial 24 h tras la inyección de IL-1 de 10 ng inicial. La [proteína] en el líquido sinovial también se elevó inmediatamente tras la 1ª inyección de IL-1. Estos parámetros no aumentaron adicionalmente por la provisión de una exposición a IL-1 superior. Estas respuestas concuerdan con un estado inflamatorio “preartrítico” (Adarichev *et al.*, 2006). Los genes activados en la fase temprana de artritis son predominantemente aquéllos asociados con transcripción de quimiocinas, citocinas (particularmente, IL-1) y metaloproteinasas, particularmente, MMP-13 y MMP-9. Las quimiocinas son señales potentes para la migración de células inflamatorias al espacio sinovial. Puesto que los sinoviocitos y las células endoteliales de la membrana sinovial pasa a activarse para expresar moléculas de adhesión celular y producir quimiocinas, la extravasación de neutrófilos al espacio articular aumenta enormemente, tal como se observó en el estudio como un aumento considerable en la [neutrófilos] en el líquido sinovial. Las células de la membrana sinovial también pasan a ser más permeables a las proteínas séricas (Middleton *et al.*, 2004) dando como resultado el aumento rápido observado en la [proteína] en el líquido sinovial. MMP-13 (Yammani *et al.*, 2006) y MMP-9 (Soder *et al.*, 2006) son enzimas degradantes clave en el cartílago articular, y el aumento en la [GAG] en el líquido sinovial inducida por IL-1 observado en el estudio actual respalda los estudios que demuestran regulación por incremento sustancial de genes que codifican estas enzimas en artritis temprana (Adarichev *et al.*, 2006; Kydd *et al.*, 2007). El análisis de microalineamiento de cartílago preartrítico en ratones estimulados con PG reveló que los genes que codifican para fosfolipasa C₂, la enzima que cataliza la liberación de ácido araquidónico de membranas nucleares, no se elevó (Adarichev *et al.*, 2006). Esto puede explicar, al menos en parte, por qué la PGE₂ requirió un transcurso de tiempo mayor para la elevación posterior a la estimulación con IL-1 que con migración celular y liberación de GAG.

La exposición intraarticular con IL-1 no dio como resultado un aumento constante en el NO del líquido sinovial. El NO inducido por IL-1 se ha notificado frecuentemente en modelos de explantes de cartílago (Pearson *et al.*, 2007; Petrov *et al.* 2005), en células tomadas de modelos animales de inflamación articular aguda (Kumar *et al.*, 2005) y en casos clínicos de inflamación articular (Karatay *et al.*, 2005). Los datos descritos en el presente documento proporcionan respaldo para la evidencia de que los genes que codifican la NO sintasa inducible no se regulan por incremento en la artritis de fase temprana (Kydd *et al.*, 2007), lo que retrasa la formación de NO inducida por IL-1.

Sasha’s EQ proporcionó protección a las articulaciones estimuladas con IL-1 como se evidencia mediante: 1) ningún aumento significativo en la [PGE₂] en el líquido sinovial; 2) [GAG] aumentada en el líquido sinovial antes de la exposición a IL-1, impidiendo luego el aumento inducido por IL-1 en GAG; y 3) derrame limitado al espacio articular posterior a la exposición a IL-1. Este producto se seleccionó como nutracéutico de prueba debido a la evidencia reciente de que sus componentes individuales reducen significativamente la PGE₂, la liberación de GAG y la producción de NO en explantes de cartílago (Pearson *et al.*, 2007). Como parte de la dieta durante 2 semanas antes de una exposición a IL-1 intraarticular, SEQ impidió la elevación significativa en PGE₂ inducida por IL-1. Similar a los caballos alimentados con CON, la respuesta de PGE₂ a IL-1 en caballos alimentados con SEQ produjo un pico a las 8 h tras la segunda inyección de IL-1, pero el pico fue inferior, y no dio como resultado cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo o diferencias significativas entre la inyección de IL-1 y de solución salina. Esto proporciona evidencia para el potencial de la SEQ para reducir la inflamación y el dolor asociados con la PGE₂ elevada en caballos con artritis de fase temprana, e implica que alimentar con SEQ a los caballos antes del daño

articular puede impedir la progresión de la enfermedad a una fase más avanzada.

El aumento observado en la [GAG] en el líquido sinovial de caballos alimentados con SEQ tanto en articulaciones en las que se inyectó solución salina como en las que se inyectó IL-1 entre la pre y la iny-1 – es decir antes de la exposición inflamatoria - proporciona evidencia para la acumulación posabsortiva de GAG dietéticos dentro del espacio sinovial. Sería útil cuantificar la [GAG] del plasma tras la provisión dietética de SEQ con el fin de determinar si los GAG de la SEQ se secuestran preferencialmente en el espacio sinovial, o se distribuyen uniformemente por todo el cuerpo del animal. De importancia es la falta de un aumento significativo en la [GAG] posterior a la exposición a IL-1, que proporciona respaldo para un papel condroprotector de SEQ en caballos con artritis de fase temprana. Puesto que las metaloproteinasas 13 y 9 se regulan por incremento rápida y sustancialmente en la artritis de fase temprana (Adarichev *et al.*, 2006; Kydd *et al.*, 2007), la acción de la SEQ sobre la actividad enzimática y/o la producción de proteína enzimática, y también sobre la expresión/actividad de agregcanasas proporcionaría información útil sobre un posible mecanismo de acción condroprotectora.

La eficacia de Sasha's EQ en impedir indicadores bioquímicos de artritis de fase temprana probablemente resulta de un efecto combinado de sus 4 componentes. Un estudio previo mostró que un digesto simulado de NZGLM y SC es eficaz en la inhibición de la producción de PGE₂ inducida por IL-1 en explantes de cartílago (Pearson *et al.*, 2007). Este estudio también mostró que SC aumentó significativamente la [GAG] en los medios a través de la provisión de GAG exógenos, y el NZGLM impidió la liberación de GAG inducida por IL-1 de la matriz del cartílago. Estos datos respaldan los de otros autores quienes notifican una mejora significativa en signos artríticos en perros a los que se les proporciona NZGLM dietético (Pollard *et al.*, 2006), y protección significativa mediante glucosamina y condroitina - los mayores constituyentes bioactivos de SC - de explantes de cartílago frente a la degradación mediante IL-1 (Dechant *et al.*, 2005).

La eficacia del extracto de aceite de Biota F1.2-1.4 y F1 en el aumento de la proliferación celular de condrocitos en el cartílago de la rodilla humana no se ha conocido hasta ahora. El uso de los compuestos de F1.1-1.4 o bien por separado o bien como mezcla con una o más de las otras fracciones proporciona para una mejora notable en el tratamiento de estados, tales como osteoartritis.

Cualquier mejora puede realizarse en parte o de todas las etapas del método y componentes de los sistemas.

Bibliografía

Adarichev VA, Vermes C, Hanyecz A, Ludanyi K, Tunyogi-Csapo M, Finnegan A, Mikecz K, Giant TT. (2006) Antigen-induced differential gene expression in lymphocytes and gene expression profile in synovium prior to the onset of arthritis. *Autoimmunity*; 39(8):663-73.

Akarasereenont P, Techatrisak K, Chotewuttakom S, Thawom A. (1999) The induction of cyclooxygenase-2 in IL-1beta-treated endothelial cells is inhibited by prostaglandin E2 through cAMP. *Mediators Inflamm*; 8(6):287-94.

Aoyama T, Liang B, Okamoto T, Matsusaki T, Nishijo K, Ishibe T, Yasura K, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. (2005) PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. *J Bone Miner Res*; 20(3):377-89.

Bolam CJ, Hurtig MB, Cruz A, McEwen BJ. (2006) Characterization of experimentally induced post-traumatic osteoarthritis in the medial femorotibial joint of horses. *Am J Vet Res*; 67(3):433-47.

Brochhausen C, Neuland P, Kirkpatrick CJ, Nusing RM, Klaus G. (2006) Cyclooxygenases and prostaglandin E2 receptors in growth plate chondrocytes in vitro and in situ - prostaglandin E2 dependent proliferation of growth plate chondrocytes. *Arthritis Res Ther*; 8(3):R78 [Publicación en línea antes de su impresión]

Bui LM, Bierer TL. (2003) Influence of green lipped mussels (*Perna canaliculus*) in alleviating signs of arthritis in dogs. *Vet Ther*; 4(4):397-407.

Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. (2005) Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*; 13(5):387-94.

Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA. (1987) Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal Biochem*; 161(1):103-108.

Dechant JE, Baxter GM, Frisbie DD, Trotter GW, Mcllwraith CW. (2005) Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism, *Equine Vet J*, 37, 227-31.

de Grauw JC, van de Lest CH, van Weeren R, Brommer H, Brama PA. (2006) Arthrogenic lameness of the fetlock: synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. *Equine Vet J*; 38(4):305-11.

Del Toro F Jr, Sylvia VL, Schubkegel SR, Campos R, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. (2000) Characterization of

- prostaglandin E(2) receptors and their role in 24,25-(OH)(2)D(3)-mediated effects on resting zone chondrocytes. *J Cell Physiol*; 182(2):196-208.
- Duke JA, Ayensu ES. *Medicinal Plants of China Reference Publications, Inc.* (1985) ISBN 0-917256-20-4
- 5 Ebert L, Schick M, Neubert P, Schatten R, Henze S, Kom B. Direct Submission (07-MAYO-2004) RZPD Deutsches Ressourcenzentrum fuer Genomforschung GmbH Im Neuenheimer Feld 580, D-69120 Heidelberg, Alemania.
- Fehrenbacher A, Steck E, Rickert M, Roth W, Richter W. (2003) Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants *in vitro*. *Arch Biochem Biophys*; 410(1):39-47
- 10 Frisbie DD, Kawcak CE, Werypy NM, Park RD, McIlwraith CW. (2007) Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res*; 68(3):290-6.
- Green DM, Noble PC, Ahuero JS, Birdsall HH. (2006) Cellular events leading to chondrocyte death after cartilage impact injury. *Arthritis Rheum*; 54(5):1509-17.
- 15 Hardy J, Bertone AL, Weisbrode SE, Muir WW, O'Dorisio TM, Mastly J. (1998) Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joints. *Am J Vet Res*; 59(1):88-100.
- Huakinsson EC, Berry H, Gishen P. (1995) Effects of anti-inflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*, 22:1941-1946.
- 20 Hungin AP, Kean WF. (2001) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: overused or underused in osteoarthritis? *Am J Med*; 110(1A):8S-11S.
- Iimoto S, Watanabe S, Takahashi T, Shimizu A, Yamamoto H. (2005) The influence of Celecoxib on matrix synthesis by chondrocytes under mechanical stress *in vitro*. *Int J Mol Med*; 16(6):1083-8.
- Jacobsen S, Niewold TA, Halling-Thomsen M, Nanni S, Olsen E, Lindegaard C, Andersen PH. (2006) Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet Immunol Immunopathol*; 110(3-4):325-30
- 25 Karatay S, Kiziltunc A, Yildirim K, Karanfil RC, Senel K. (2005) Effects of different hyaluronic acid products on synovial fluid NO levels in knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*; 24(5):497-501.
- Kato H, Ohashi T, Nakamura N, Nishimura Y, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A. (1995) Molecular cloning of equine interleukin-1 alpha and -beta cDNAs. *Vet Immunol Immunopathol*; 48(3-4):221-231.
- 30 Kumar DA, Raju KV, Settu K, Kumanan K, Puvanakrishnan R. (2005) Effect of a derivatized tetrapeptide from lactoferrin on nitric oxide mediated matrix metalloproteinase-2 production by synovial fibroblasts in collagen-induced arthritis in rats. *Peptides*; 27(6):1434-42.
- Kydd AS, Reno CR, Tsao HW, Hart DA. (2007) Early inflammatory arthritis in the rabbit: the influence of intraarticular and systemic corticosteroids on mRNA levels in connective tissues of the knee. *J Rheumatol*; 34(1):130-9.
- 35 Marciani L, Bush D, Wright P, Wickham M, Pick B, Wright J, Faulks R, Fillery-Travis A, Spiller RC, Gowland PA. (2005) Monitoring of gallbladder and gastric coordination by EPI. *J Magn Reson Imaging*; 21(1):82-85.
- Mesa Garcia MD, Aguilera Garcia CM, Gil Hernandez A. (2006) Importance of lipids in the nutritional treatment of inflammatory diseases. *Nutr Hosp*; 21 Suppl. 2:28-41, 30-43.
- 40 Nishimoto S, Takagi M, Wakitani S, Nihira T, Yoshida T. (2005) Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid on gene expression in a three-dimensional culture of chondrocytes. *J Biosci Bioeng*; 100(1):123-6.
- Pavlovic S, Du B, Sakamoto K, Khan KM, Natarajan C, Breyer RM, Dannenberg AJ, Falcone DJ. (2006) Targeting prostaglandin E2 receptors as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. *J Biol Chem*; 281(6):3321-8.
- 45 Pearson W, Orth MW, Karrow NA, MacLusky N, Lindinger MI. (2007) Anti-inflammatory and chondroprotective effects of nutraceuticals in a cartilage explant model of inflammation. *Mol Nutr Food Res*; (2007), 51, 1020-1030.
- Petrov R, MacDonald MH, Tesch AM, Benton HP. (2005) Inhibition of adenosine kinase attenuates interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced alterations in articular cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*; 13(3):250-7.
- Pivnenko TN, Sukhoverkhova Glu, Epshtein LM, Somova-Isachkova LM, Timchenko NF, Besednova NN. (2005) [Experimental morphological study of the therapeutic effect of shark cartilage preparation in a model of infective

allergic arthritis] *Antibiot Khimioter*; 50(5-6):20-3.

Pollard B, Guilford WG, Ankenbauer-Perkins KL, Hedderley D. (2006) Clinical efficacy and tolerance of an extract of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) in dogs presumptively diagnosed with degenerative joint disease. *N Z Vet J*; 54(3):114-8.

- 5 Rashad S, Revell P, Hemingway A, Low F, Rainsford K, Walker F. (1989) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the course of osteoarthritis. *Lancet*; 2(8662):519-22.

Rininger JA, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. (2000) Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*; 68(4):503-10.

- 10 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*; 270:467-470.

Simmons EJ, Bertone AL, Weisbrode SE. (1999) Instability-induced osteoarthritis in the metacarpophalangeal joint of horses. *Am J Vet Res*; 60(1):7-13.

- 15 Soder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T. (2006) MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol*; 24(3):302-4.

Steel CM, Hopper BJ, Richardson JL, Alexander GR, Robertson ID. (2006) Clinical findings, diagnosis, prevalence and predisposing factors for lameness localised to the middle carpal joint in young Standardbred racehorses. *Equine Vet J*; 38(2):152-7.

- 20 Su XQ, Antonas KN, Li D. (2004) Comparison of n-3 polyunsaturated fatty acid contents of wild and cultured Australian abalone. *Int J Food Sci Nutr*; 55(2):149-54.

Toutain PL, Cester CC. (2004) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. *Am J Vet Res*; 65(11):1533-41.

- 25 van den Boom R, van de Lest CH, Bull S, Brama RA, van Weeren PR, Bameveld A. (2005) Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. *Equine Vet J*; 37(3):250-6.

Welch RD, Watkins JP, DeBowes RM, Leipold HW. (1991) Effects of intra-articular administration of dimethylsulfoxide on chemically induced synovitis in immature horses. *Am J Vet Res*; 52(6):934-9.

- 30 Yammani RR, Carlson CS, Bresnick AR, Loeser RF. (2006) Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum*; 54(9):2901-11.

Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. (2002) Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol*; 3(11):0062.

- 35 Yashura R, Miyamoto Y, Akalke T, Akuta T, Nakamura M, Takami M, Morimura N, Yasu K, Kamijo R. (2005) Interleukin-1 β induces death in chondrocyte-like ATDC5 cells through mitochondrial dysfunction and energy depletion in a reactive nitrogen and oxygen species-dependent manner. *Biochem J*; 389:315-323.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DACY TECH PTY LTD

<120> COMPOSICIÓN NUTRACÉUTICA Y MÉTODOS DE USO

- 40 <130> P6143EPPC

<140> documento EP 08860286,7

<141> 12-12-2008

<150> documento AU 20070906770

<151> 12-12-2007

- 45 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 487 513 T3

<210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador directo para el gen Cox1 porcino (AF207823)
 <400> 1
 gggagtcctt ctccaatgtg 20
 <210> 2
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para el gen Cox1 porcino (AF207823)
 15 <400> 2
 cataaatgtg gccgaggtct 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para el gen Cox2 porcino (AF207824)
 <400> 3
 atgatctacc cgcctcacac 20
 25 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador inverso para el gen Cox2 porcino (AF207824)
 <400> 4
 aaaagcagct ctgggtcaaa 20
 <210> 5
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 487 513 T3

	<223> Cebador directo para el gen iNOS porcino (x98196)	
	<400> 5	
	tcggttatgc caccaacaat g	21
	<210> 6	
5	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso para el gen iNOS porcino (x98196)	
10	<400> 6	
	actctccagg atgtgtag	19
	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para el gen de agrecano porcino (AF201722)	
	<400> 7	
	caggagaaga gatgccaac	19
20	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador inverso para el gen de agrecano porcino (AF201722)	
	<400> 8	
	caggatgatcc gaggctcc	18
	<210> 9	
	<211> 17	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para el gen de beta-actina porcino (SSU07786)	
	<400> 9	
35	tcgaggatgac catggcc	17
	<210> 10	
	<211> 21	

ES 2 487 513 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para el gen de beta-actina porcino (SSU07786)

5 <400> 10

cggtaatgga acacaacccc t

21

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cantidad terapéutica de un extracto de una planta *Biota orientalis* para su uso en el tratamiento de degradación de cartílago en un organismo, estimulando el crecimiento o la reparación de cartílago a través de la estimulación de la proliferación de condrocitos.
- 5 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la estimulación es *in vitro* o *in vivo*.
3. Composición para su uso según la reivindicación 2, caracterizada además porque la composición incluye un extracto adicional tal como extracto de mejillón perna, extracto o polvo de abulón o combinaciones de los mismos.
- 10 4. Composición para su uso según la reivindicación 3, caracterizada además porque la composición incluye polvo de cartílago de tiburón.
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, caracterizada además porque el extracto de una planta *Biota orientalis* es un extracto de las semillas de la planta *Biota orientalis*.
- 15 6. Composición que incluye un extracto de una planta *Biota orientalis* para su uso para aumentar la actividad de al menos un receptor prostanoide implicado en la proliferación de condrocitos, en la que la administración de la composición a un paciente estimula la proliferación de condrocitos y el crecimiento y/o la reparación de cartílago.
7. Composición para su uso según la reivindicación 6, caracterizada además porque incluye administrar el extracto en combinación con un extracto tal como cartílago de tiburón, extracto de mejillón perna, extracto de abulón o combinaciones de los mismos.
- 20 8. Extracto de la planta *Biota orientalis* para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de estados degenerativos de cartílago.
9. Extracto para su uso según la reivindicación 8, caracterizado además porque incluye un extracto adicional tal como extracto de mejillón perna, extracto o polvo de abulón, polvo de cartílago de tiburón o combinaciones de los mismos.
- 25 10. Composición que incluye al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácido (9Z,13S,15Z)-12,13-epoxioctadeca-9,11,15-trienoico, ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico (ALA), ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico (GLA), ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico y ácido 9-octadecenoico para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de estados degenerativos de cartílago.
- 30 11. Composición para su uso según la reivindicación 10, caracterizada además porque incluye un extracto adicional tal como extracto de mejillón perna, extracto o polvo de abulón o combinaciones de los mismos.
12. Composición para su uso según la reivindicación 11, caracterizada además porque la composición incluye polvo de cartílago de tiburón.
- 35 13. Preparación farmacéutica para su uso en el tratamiento de estados degenerativos de cartílago en un mamífero, que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de una planta *Biota orientalis*.
14. Preparación farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, caracterizada además porque la preparación incluye un extracto adicional tal como extracto de mejillón perna, extracto o polvo de abulón, polvo de cartílago de tiburón o combinaciones de los mismos.
- 40 15. Preparación farmacéutica para su uso según la reivindicación 14, caracterizada además porque el ácido graso poliinsaturado se selecciona del grupo que consiste en ácido (9Z,13S,15Z)-12,13-epoxioctadeca-9,11,15-trienoico, ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico, ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico, ácido 9-octadecenoico, ácido undecanoico, ácido icosa-5,8,11,14-tetraenoico o mezclas de los mismos.

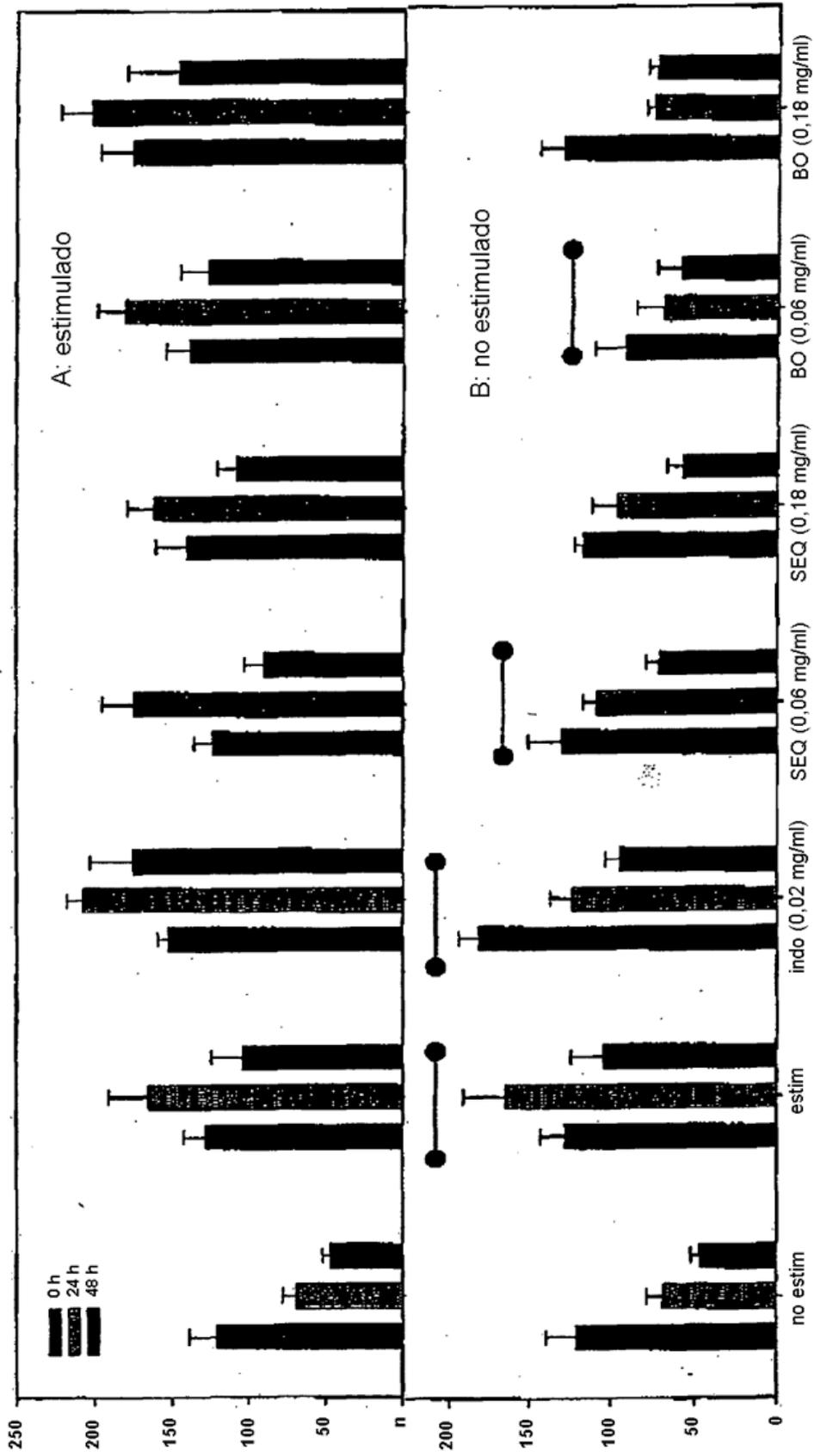


FIG 1

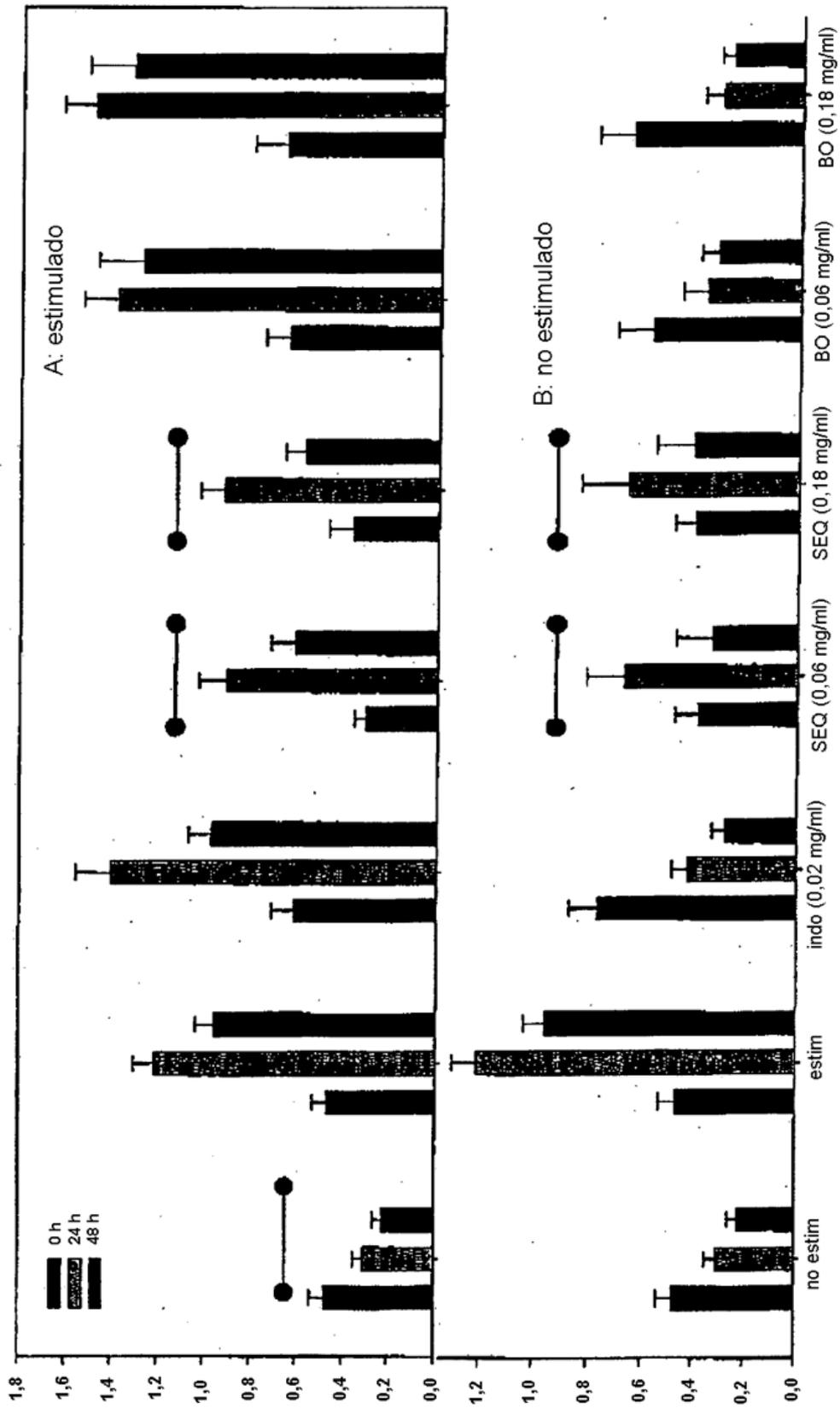


FIG 2

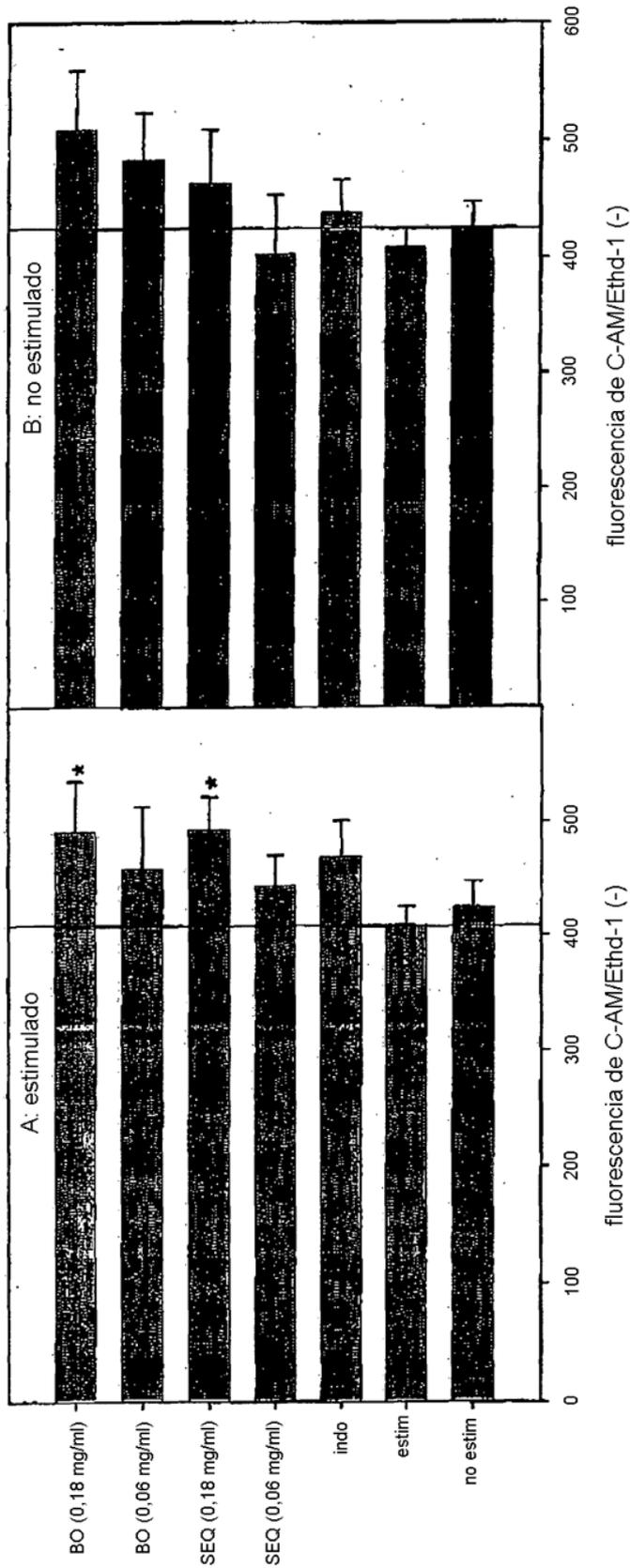


FIG 3

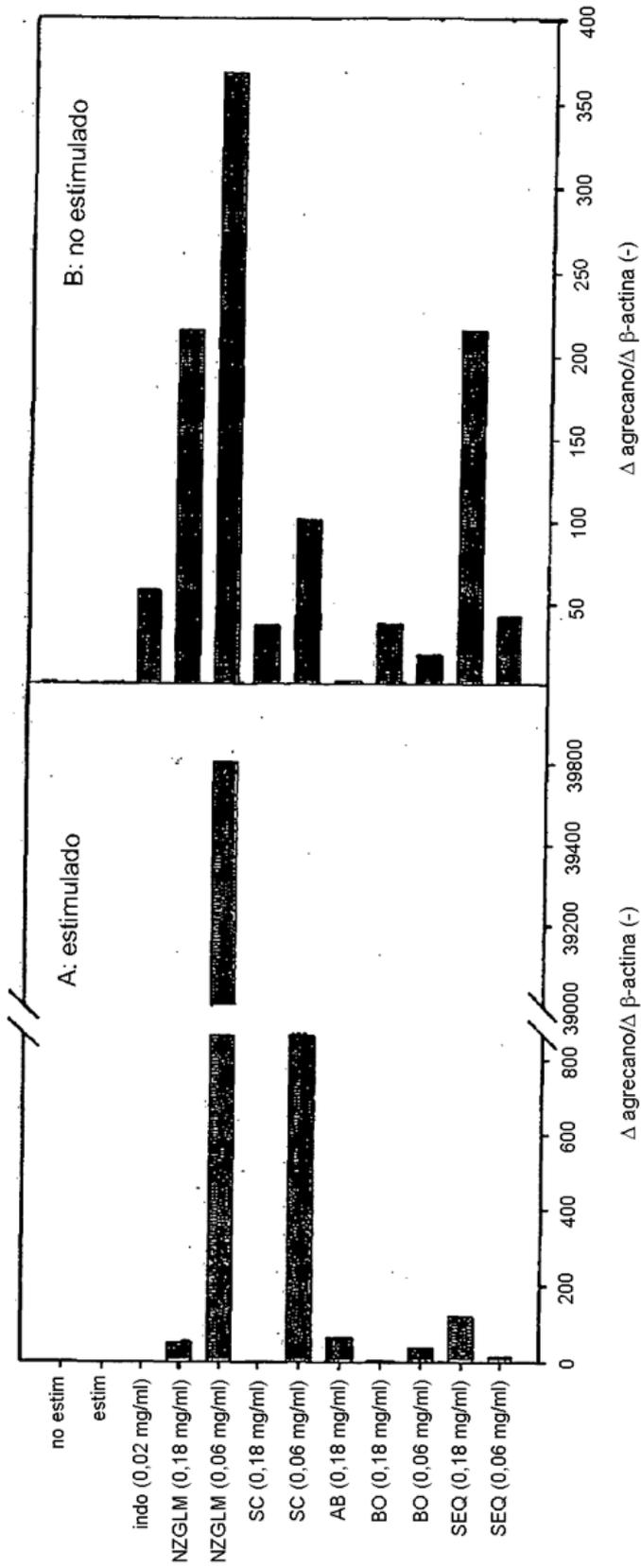


FIG 4

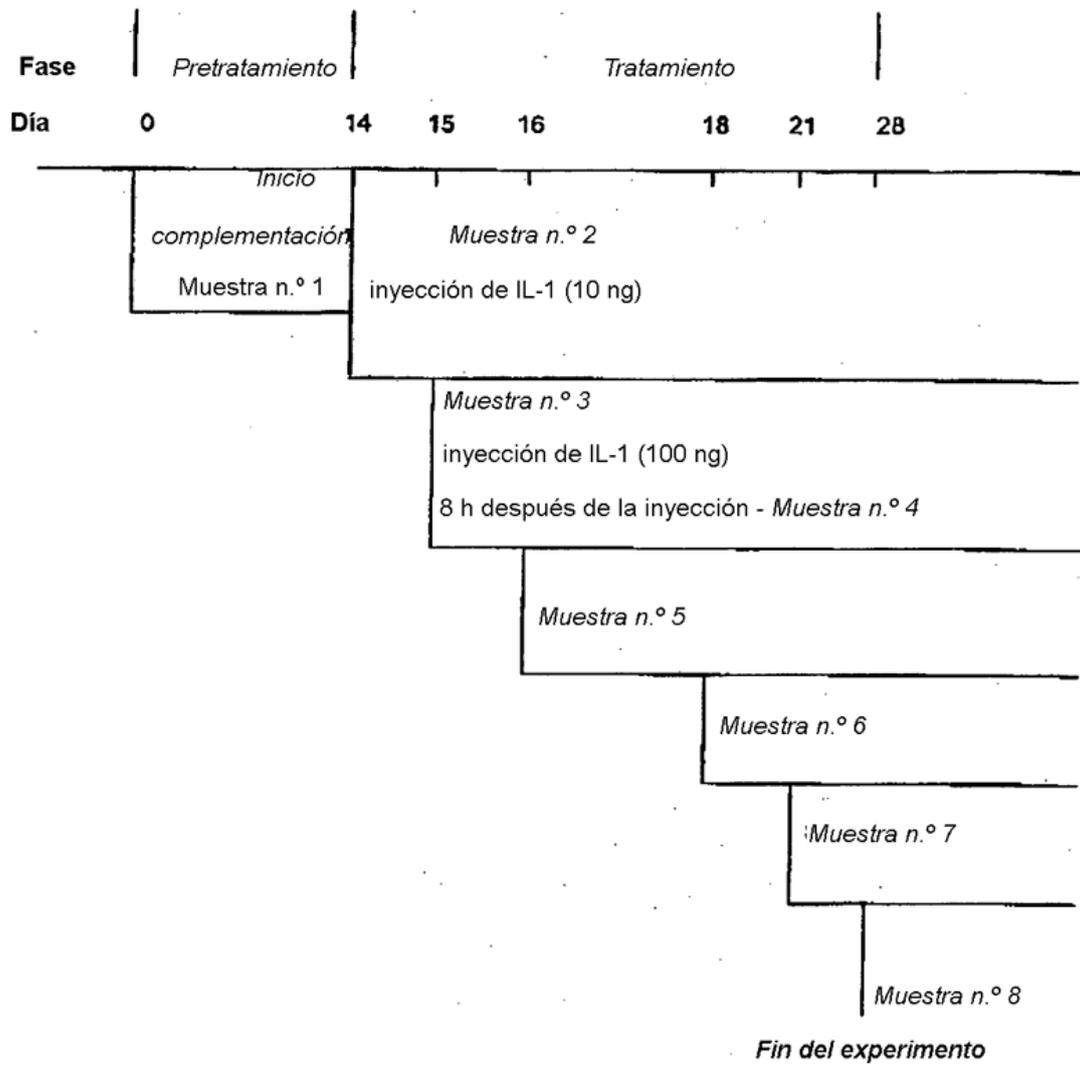


FIG 5

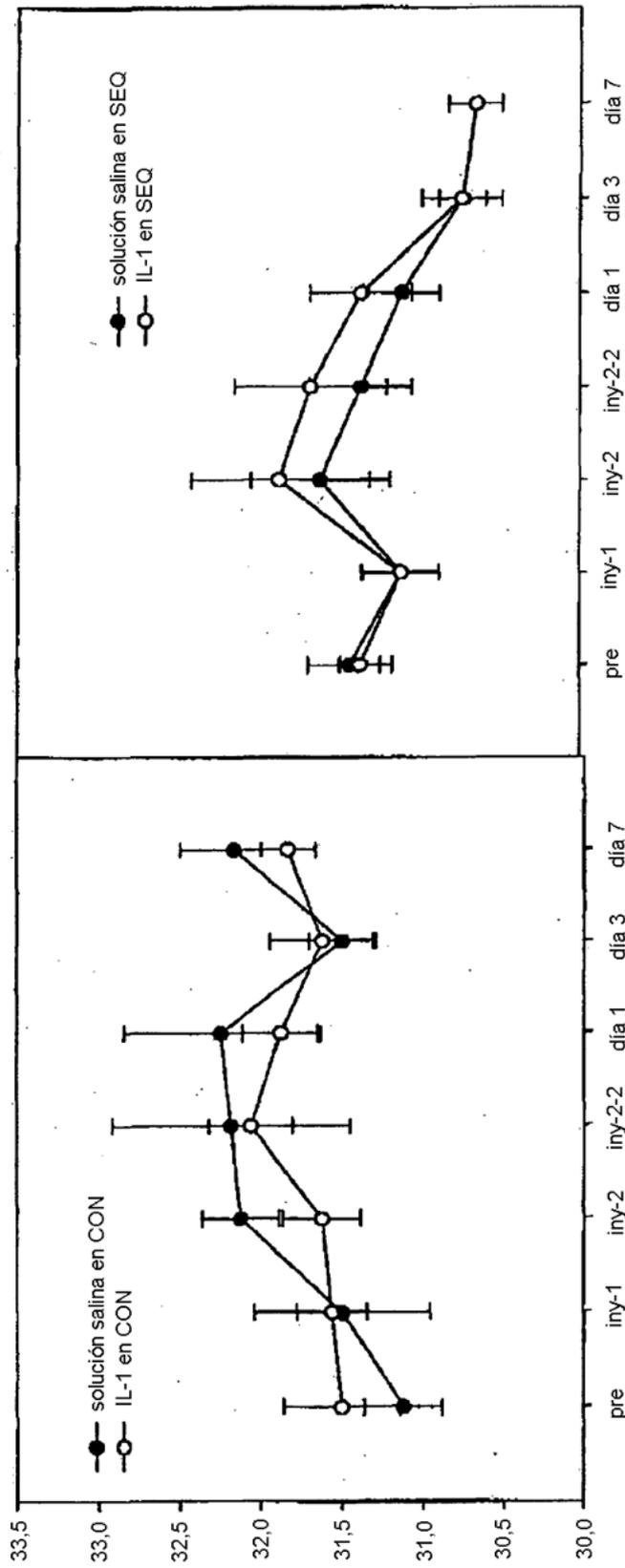


FIG 6

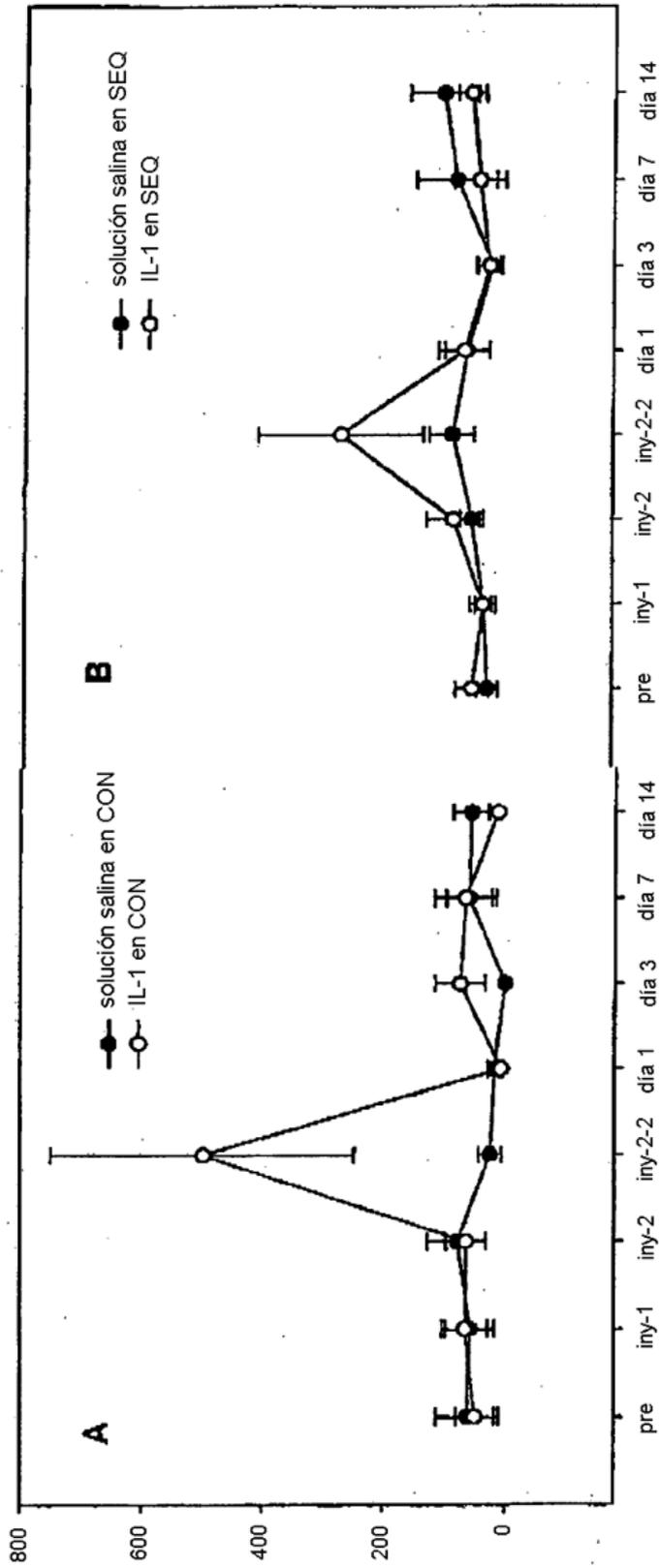


FIG 7

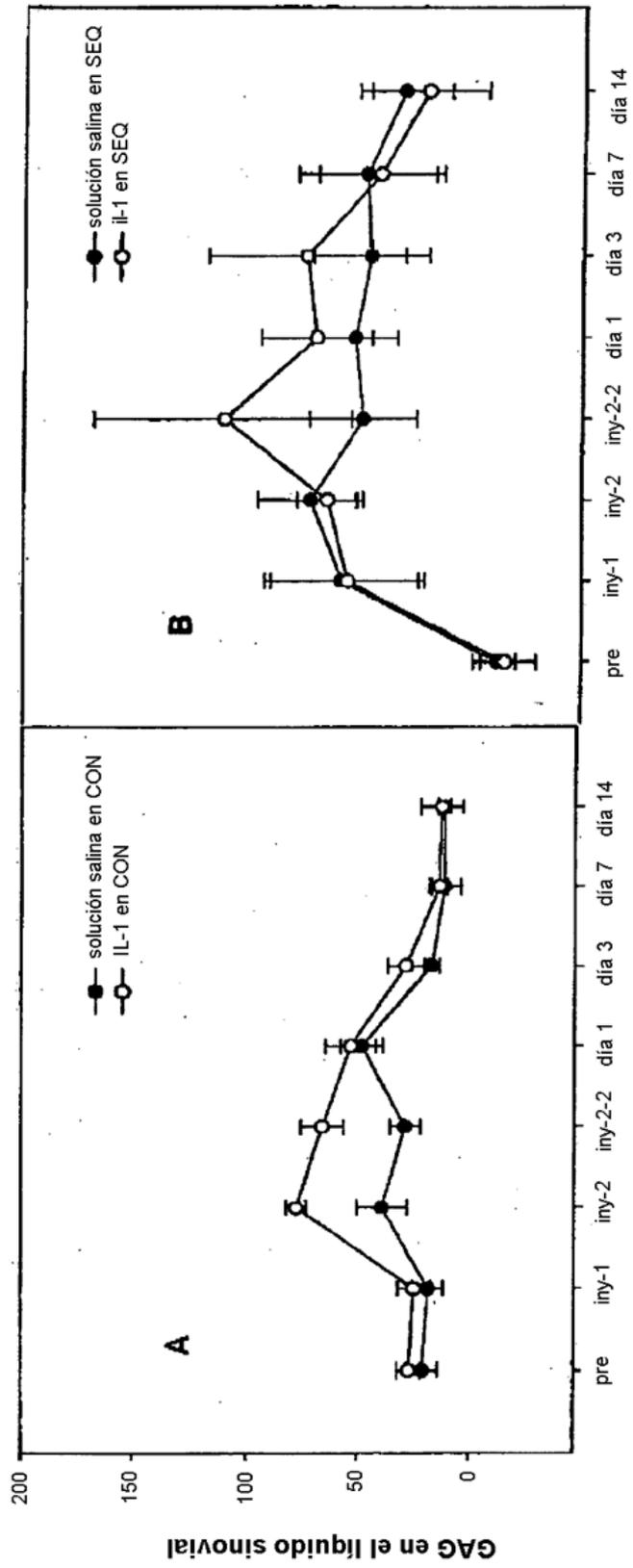


FIG 8

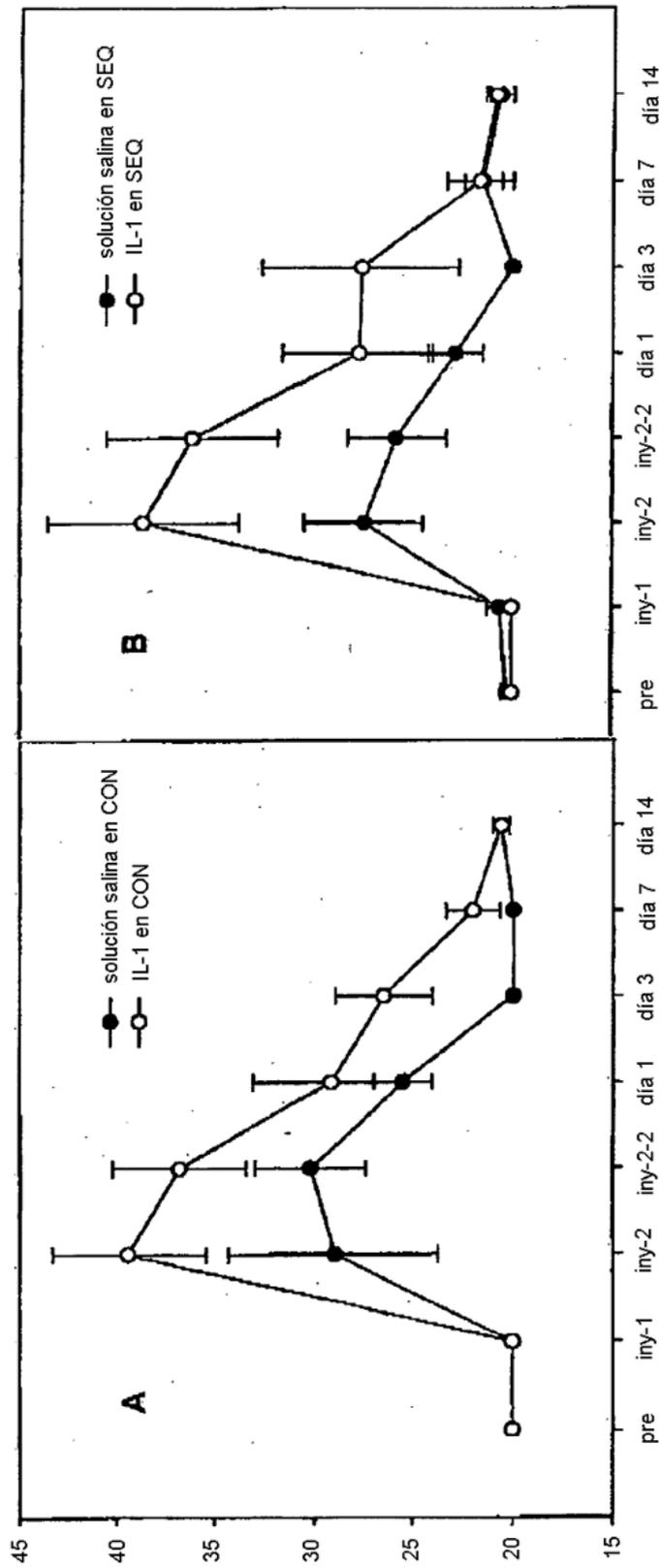


FIG 9

Gen porcino	N.º de registro	Cebador directo	Cebador inverso
Cox1	AF207823	GGGAGTCTTCTCCAATGTG	CATAAATGTGGCCGAGGTCT
Cox2	AF207824	ATGATCTACCCGCCCTCACAC	AAAAGCAGCTCTGGGTCAAA
iNOS	X98196	TGCGTTATGCCACCACCAACAATG	ACTCICCAGGATGTTGTAG
Agrecano	AF201722	CAGGAGAAGAGATGCCAAC	CAGGTGATCCGAGGCTCC
β -actina	SSU07786	TGCAGGTGACCATGGCC	CGGTAATGGAACACACACCCCT

TABLA 1

FIG 10

COMPONENTE	% en peso
Mejillón de labios verdes de Nueva Zelanda	50,90
Abulón	16,98
Saborizante de miel	7,47
Polvo de cartilado de tiburón	21,23
" Constituyente 4"	6,67

TABLA 2

FIG 11

Nutriente		
Proteína bruta	min	12,5%
Grasa bruta	min	2,5%
Fibra bruta	máx	8,5%
Sodio (Na)	real	0,3%
Calcio (Ca)	real	0,65%
Fósforo (P)	real	0,55%
Cobre (Cu)	real	30 mg/kg
Vitamina A	min	4.550 U.I./kg
Vitamina D ₃	min	840 U.I./kg
Vitamina E	min	70 U.I./kg

TABLA 3

FIG 12

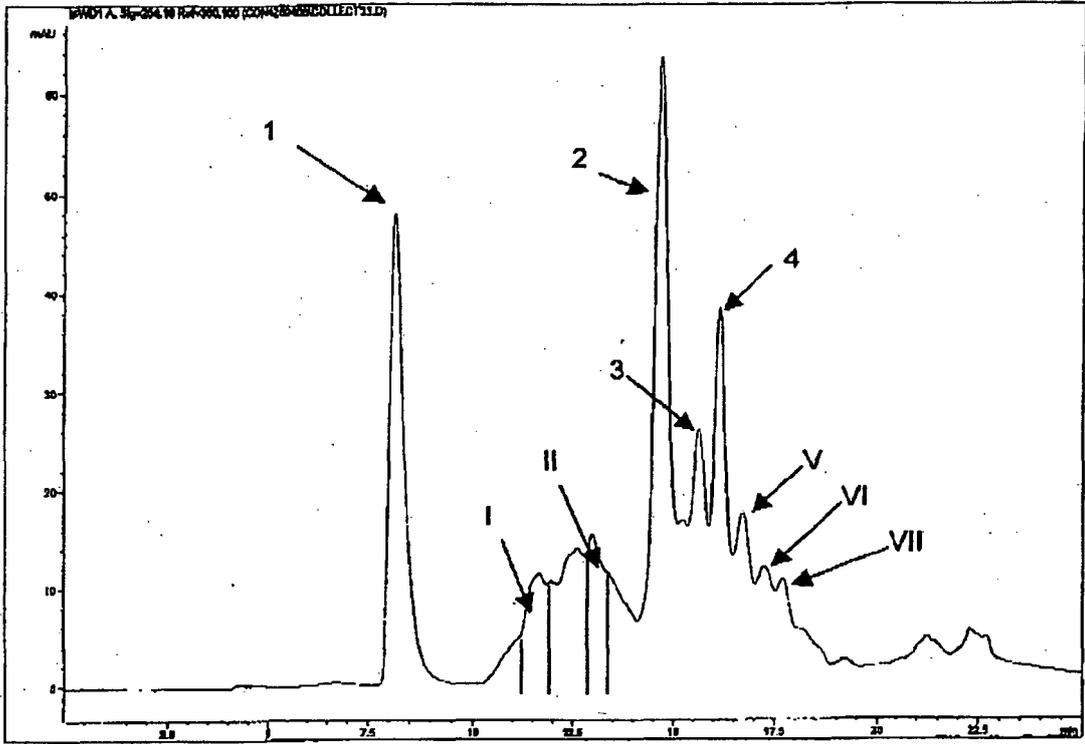


FIG 13

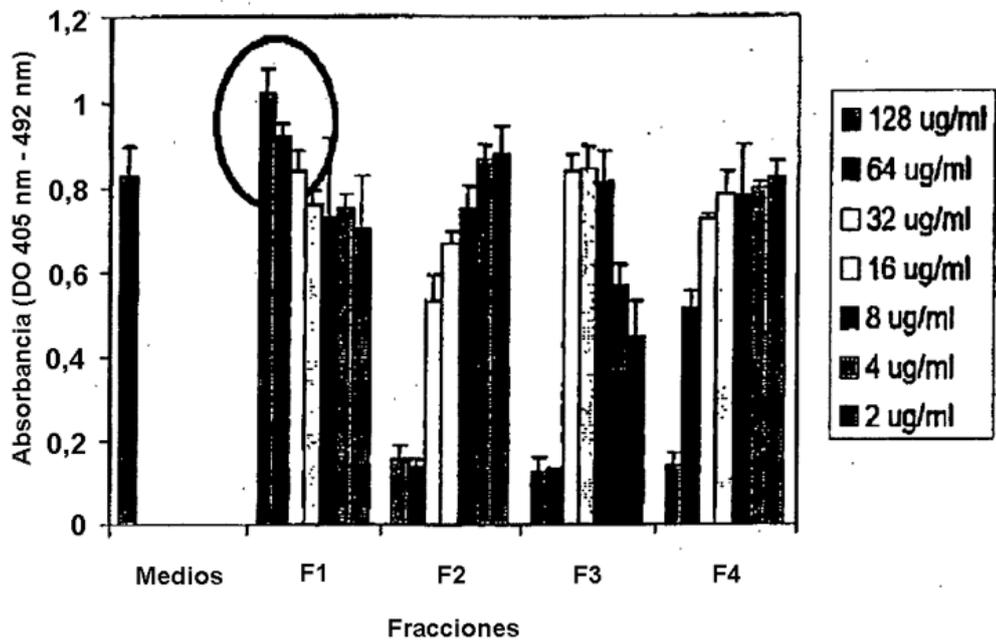


FIG 14

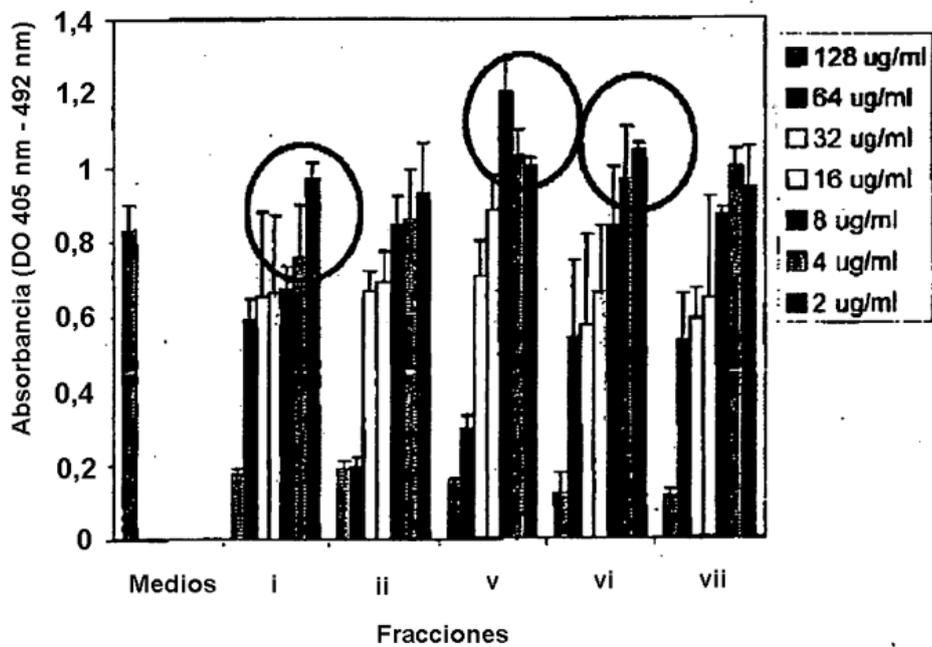


FIG 15

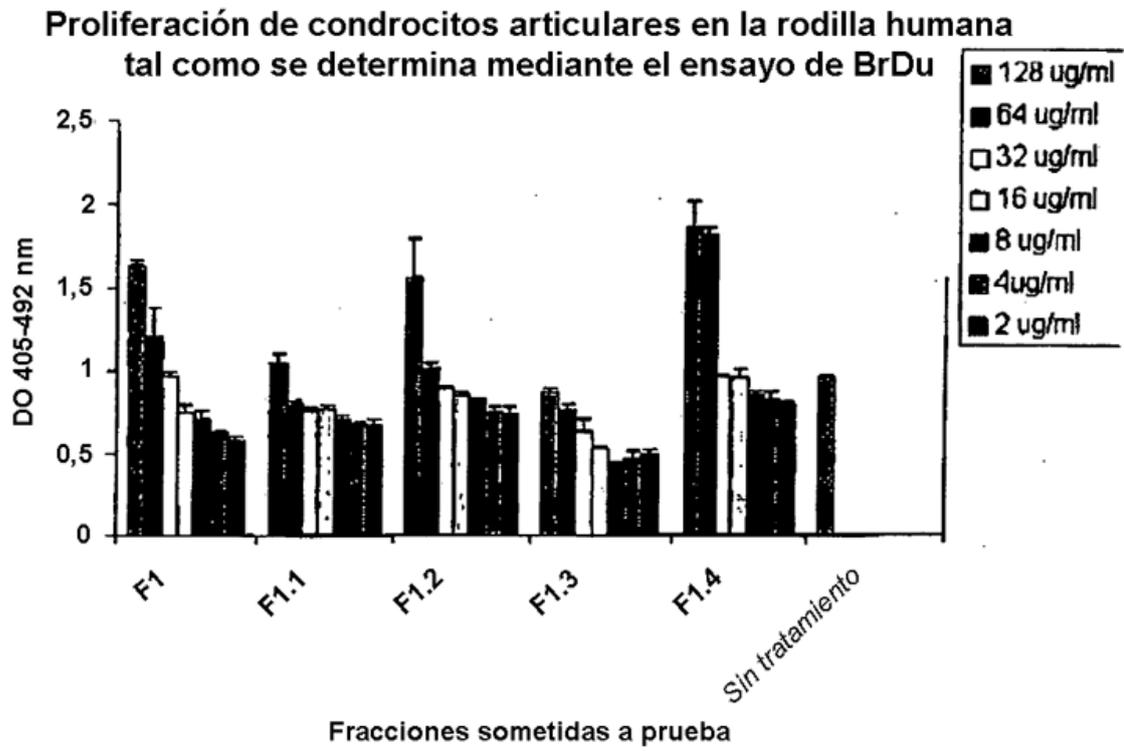


FIG 16