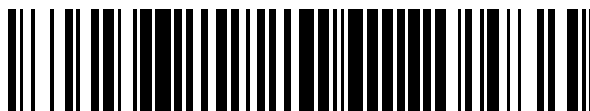


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 777**

51 Int. Cl.:

A23K 20/158 (2006.01)
A23K 20/10 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)
A23K 50/70 (2006.01)
A23K 50/30 (2006.01)
A23K 50/80 (2006.01)
A23L 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2010 PCT/NL2010/050428**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11002298**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2010 E 10734567 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2448425**

54 Título: **Pienso animal o comida para humanos para mejorar las propiedades de la barrera intestinal**

30 Prioridad:

03.07.2009 EP 09164557
09.04.2010 EP 10159564

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2019

73 Titular/es:

NUTRECO NEDERLAND B.V. (100.0%)
Veerstraat 38
5831 JN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SMITS, COENRAAD, HENRICUS, MARIA y
VAN DAM, JOHANNES, TEUNIS, PIETER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 700 777 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

Pienso animal o comida para humanos para mejorar las propiedades de la barrera intestinal

5 La presente descripción se dirige a un pienso animal o alimento humano para mejorar las propiedades de barrera de la mucosa intestinal, en particular para el uso en animales de granja monogástricos tales como cerdos, aves de corral, incluyendo pavos, y mascotas tales como perros, gatos, así como caballos, conejos y ruminantes jóvenes y especies de peces. La descripción se dirige adicionalmente a modificaciones dietéticas para humanos para mejorar las propiedades de barrera.

10 La mucosa intestinal es la primera capa del tracto gastrointestinal en el lado luminal. Esta capa entra en contacto directo con el alimento ingerido, y los microorganismos que residen en el intestino. Por lo tanto, esta capa es responsable de procesos importantes en la digestión tales como la absorción, la secreción y en la función de barrera.

La mucosa gastrointestinal comprende células epiteliales, las cuales se mantienen unidas con las denominadas uniones estrechas.

15 La unión estrecha, también denominada *zona occludens*, es una interacción especializada célula-célula que se encuentra en casi todos los tipos de líneas de células epiteliales en diferentes órganos en el cuerpo. Las uniones estrechas son las áreas estrechamente asociadas de dos células adyacentes cuyas membranas se unen formando una barrera virtualmente impermeable a los contenidos gastrointestinales. Una unión estrecha comprende complejos proteicos densamente compactados que proporcionan contacto entre las membranas de dos células adyacentes.

20 Una de las funciones de las uniones estrechas es la regulación del paso de iones y moléculas a través del espacio entre las células. La unión estrecha representa una barrera importante para el transporte paracelular, es decir, el transporte a través de los espacios intercelulares entre las células epiteliales, y puede impedir el paso de moléculas y de iones. Por consiguiente, los materiales deben entrar en las células epiteliales, a través de, por ejemplo, difusión o transporte activo, con el fin de pasar a través del tejido. Esto se denomina transporte transcelular y dicho transporte brinda control sobre qué sustancias se permite que pasen a través de, por ejemplo, la mucosa intestinal. Los epitelios se clasifican como “impermeables” o “permeables” dependiendo de la capacidad de las uniones estrechas para impedir el movimiento del agua y de solutos a través del espacio intercelular.

30 Una tarea importante del intestino es formar una barrera defensiva para impedir la absorción de sustancias dañinas del ambiente externo. Esta función protectora depende principalmente de las propiedades de barrera de la mucosa intestinal. La permeabilidad de la mucosa intestinal se determina, al menos en parte, por la fuerza de las uniones estrechas de las células epiteliales intestinales.

35 Existen numerosos factores que pueden afectar a las uniones estrechas, incluyendo componentes del alimento tales como el gluten y la caseína en algunos individuos. Los organismos infecciosos tales como las cepas patogénicas específicas de *E. coli*, *Salmonella* y *C. difficile* tienen la capacidad de alterar los complejos proteicos de la unión estrecha entre la células epiteliales y establecer una infección. La alteración de las uniones estrechas puede dar como resultado una disminución de las propiedades de barrera del epitelio mucosal intestinal, lo que conduce a un intestino permeable.

40 La disfunción de la barrera intestinal de la mucosa intestinal, encontrada en animales, incluyendo peces, debido a la alteración de las uniones estrechas en situaciones estresantes y/o durante la inmunosupresión, puede dar como resultado septicemia, y/o toxemia, llevando a una menor eficacia en la ingesta de pienso en animales o de alimento en seres humanos.

45 En la actualidad, se presta poca o ninguna atención a la nutrición animal en relación con las propiedades de la barrera intestinal. En buena parte, se desconocen los tratamientos o complementos nutricionales para mejorar la integridad mucosal. Sin embargo, ha habido informes esporádicos que sugieren que nutrientes específicos, tales como el aminoácido glutamina, pueden ayudar a disminuir la permeabilidad intestinal y pueden llevar a un mejor funcionamiento de la barrera mucosal.

50 Sin embargo la desventaja de dichos compuestos es su eficacia limitada y también los problemas con respecto al manejo y almacenamiento. Lassiter *et al.* (Journal of Animal Science 1958; 17: 358-362) describen el efecto del ácido valérico y una combinación de ácidos valérico e isovalérico en vacas lecheras. Se mostró que el ácido valérico aumentaba la digestión de la materia seca, materia orgánica, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno. Se cree que estas mejoras se asocian con procesos que solo se llevan a cabo en el rumen. Sin embargo, no se encontró este efecto cuando se empleó ácido valérico en combinación con ácido isovalérico.

55 Papas *et al.* describen en el Journal of Dairy Science 1984, vol. 67 (2), p 276-293 los efectos de alimentar vacas con una mezcla de sales de amonio del ácido valérico, ácido isovalérico, ácido 2-metilbutírico y ácido isobutírico sobre la producción, reproducción y salud de vacas lecheras. La mezcla parece ser efectiva para aumentar la

producción de leche.

CA-A-1 184 416 describe una composición de suplemento alimenticio para animales rumiantes para aumentar la producción de leche en vacas, dicha composición comprende isobutirato de amonio, valerato de amonio, isovalerato de amonio y 2-metilbutirato de amonio.

- 5 WO2008/135180 describe un alimento para mascota que tiene una concentración de ácido butírico de 5 ppm a 10 ppm y/o una concentración de ácido 3-metilbutírico de 4 ppm a 10 ppm, y/o una sal del mismo.

EP 1 661 574 describe una composición para suministrar un ácido graso beta-hidroxi de cadena corta-media o un oligómero del mismo al intestino grueso, que comprende un polímero del ácido graso beta-hidroxi de cadena corta-media.

- 10 Galfi y Bokori (1990, Acta Veterinaria Hungarica 38 (1-2), pp. 3-17) describe ensayos de alimentación en cerdos con una dieta que contiene n-butirato de sodio.

Deetz et al. (1985, J. Anim. Sci. 61, pp. 1539-1549) describen el rendimiento del engorde en corral y las características de la canal de novillos alimentados con dietas que contienen sales de amonio de los ácidos grasos de cadena ramificada y ácido valérico.

- 15 Las uniones estrechas disfuncionales en humanos pueden llevar a condiciones tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn y enfermedad celiaca, como se describe por Edelblum y Turner (Current Opinion in Pharmacology, 9(6) (2009) 715-720); Shen *et al.* (Digestive Diseases, 27(4) (2009) 443-449); y Pizzuti et al. (Digestive and Liver Disease, 36(5) (2004) 337-341), respectivamente.

- 20 El objetivo de la presente invención es proporcionar un pienso animal que resuelve, al menos en parte, el problema de la disfunción de la barrera intestinal como se describió anteriormente.

Proporcionando el uso de ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en un pienso animal para alimentar animales de granja monogástricos o mascotas, en donde la dosis de dicho ácido valérico, sal del ácido valérico, éster del ácido valérico, o combinaciones del mismo en dicho pienso animal es del 0,025% en peso, con base en el peso total del dicho pienso animal.

- 25 Sorprendentemente, los inventores encontraron que los compuestos de ácido C5 tienen un efecto positivo sobre las propiedades de barrera de la mucosa intestinal de los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Sin desear estar vinculado a ninguna teoría particular, se espera que los compuestos de ácido C5 fortalezcan las uniones estrechas en las células epiteliales intestinales, aumentando así la barrera para el transporte paracelular. Se encontró que al alimentar a los animales con los compuestos de ácido C5 se mejora tanto la tasa de conversión del pienso como la salud de los animales. Además se espera que la presencia de los compuestos de ácido C5 en el pienso animal disminuya el riesgo de septicemia y toxemia en animales por materiales ingeridos y contenidos gastrointestinales.

- 30 Se encontró que el compuesto de ácido C5 mejora la condición general de los animales. En particular, se cree que la alimentación con el compuesto de ácido C5 como se describe aquí, da como resultado una mejora en las propiedades de la barrera mucosal, lo que a su vez previene la colonización/translocación de los patógenos transmitidos por los alimentos, tales como *Salmonella* y *Campylobacter*.

- 40 El término "compuestos de ácido C5" como se utiliza aquí, se define como un compuesto elegido del grupo que consiste en ácidos C5, sales de ácidos C5, ésteres de ácidos C5 y combinaciones de ellos. De manera preferible, los iones de amonio y de calcio se utilizan como cationes en sales de ácidos C5, tales como valerato de amonio o isovalerato de calcio. De manera preferible, los ésteres de ácidos C5 se forman con etanol y metanol, por ejemplo metil y etil ésteres de ácidos C5. Los ejemplos de ésteres de ácidos C5 son etil valerato y butil isovalerato.

El término "ácidos C5" como se utiliza aquí se define como ácidos que comprenden exactamente cinco átomos de carbono. Los ácidos C5 típicamente tienen la fórmula $C_5H_{10}O_2$.

- 45 Los ejemplos de ácidos C5 son ácido valérico (ácido pentanoico), ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico) y ácido 2-metilbutanoico. Preferiblemente, los compuestos de ácido C5 se basan en ácido valérico o ácido isovalérico.

- 50 Los compuestos de ácido C5 como se enseñó aquí, en particular si el pienso animal se ha sometido a fermentación. Sin embargo, estos niveles "naturales" de compuestos de ácido C5 en general son mucho menores al 0,025% en peso. Según la presente descripción, los niveles de compuestos de ácido C5 se ajustan a las concentraciones requeridas añadiendo compuestos de ácido C5, preferiblemente de origen sintético. Por lo tanto, la presente invención también enseña un proceso para producir un pienso animal, cuyo proceso comprende una etapa de adición de un compuesto de ácido C5, preferiblemente de origen sintético a un pienso animal, de tal manera que el nivel total de compuestos de ácido C5 en dicho pienso animal es de 0,025% en

peso o mayor, con respecto al peso total de dicho pienso animal.

La tasa de conversión del pienso (FCR) es una medida de una eficiencia del animal en la conversión de la masa de pienso en una mayor masa corporal y se puede definir como la masa del alimento ingerido dividida por la ganancia de la masa corporal tomada durante un periodo específico de tiempo.

- 5 Un valerato, isovalerato, 2-metilbutirato y butirato se definen aquí como una sal o éster del ácido valérico, ácido isovalérico, ácido 2-metilbutanoico y ácido butanoico respectivamente.

Preferiblemente, el pienso animal como se enseña aquí, comprende uno o más compuestos de ácido C5 elegidos del grupo que consiste en ácido valérico, valerato, ácido isovalérico, e isovalerato.

El pienso animal puede comprender una combinación de diferentes compuestos de ácido C5.

- 10 La cantidad del compuesto de ácido C5 en el pienso animal como se enseña aquí preferiblemente es mayor que 0,025% en peso y más preferiblemente no mayor que 1% en peso, incluso más preferiblemente de 0,1-0,75% en peso.

- 15 El pienso animal como se enseña aquí puede comprender adicionalmente ácido butírico (ácido butanoico) o butirato. Dicho compuesto, en combinación con un compuesto de ácido C5, puede tener un efecto sinérgico sobre las propiedades de barrera de la mucosa intestinal cuando se proporciona en el pienso animal como se enseña aquí.

La dosis de dicho ácido butírico o butirato en dicho pienso animal preferiblemente es de 0,01% en peso o superior, con base en el peso total de dicho pienso animal, más preferiblemente de 0,02 a 0,75% en peso, incluso más preferiblemente de 0,025 a 0,15% en peso, incluso más preferiblemente de 0,03 a 0,1% en peso.

- 20 El pienso animal como se enseña aquí, se puede proporcionar enriqueciendo un pienso animal básico con un compuesto de ácido C5, de tal manera que se obtiene una dosis diaria deseada. La dosis deseada depende de varios factores, tales como el tipo de animal y la edad del animal. Se encontró que las concentraciones anteriormente mencionadas y las concentraciones preferidas del pienso proporcionan un pienso animal versátil con el que se puede alimentar a los animales de manera fácil.

- 25 Las concentraciones deseadas del compuesto de ácido C5 en el pienso animal, requeridas para obtener las dosis adecuadas del compuesto de ácido C5, se obtienen de manera más conveniente mediante el uso de una premezcla. Dicha premezcla puede comprender otros suplementos dietéticos y se puede mezclar con pienso animal convencional para obtener el pienso animal como se enseña aquí. Una premezcla, según la presente descripción, típicamente puede contener de 1 a 50% en peso del compuesto de ácido C5, pero esto depende principalmente de la cantidad de premezcla que se va a utilizar para proporcionar la composición final del pienso. Todas las cantidades expresadas en proporciones de peso en la presente descripción y las reivindicaciones se calcularon con base en materia seca. La cantidad de premezcla utilizada varía usualmente entre 0,1 a 20%, preferiblemente de 1 a 10% con base en el peso total del pienso mezclado.

- 30 Se puede utilizar un pienso animal convencional como una materia prima para el pienso animal como se enseña aquí. La base de dicho pienso se determina principalmente en función del animal que va a ser alimentado y de las consideraciones comunes tales como el precio y la disponibilidad.

Como se ha mencionado, el pienso como se enseña aquí, usualmente se complementa de manera adicional con otros componentes tales como vitaminas, minerales y aminoácidos.

- 35 Una vitamina adecuada para añadirse según la presente enseñanza es, por ejemplo, la vitamina E, la cual se puede aplicar en cantidades típicamente de 20 – 100 UI (unidades internacionales) por kg de pienso.

Un mineral adecuado para añadirse según la presente enseñanza es, por ejemplo, selenio, el cual se puede aplicar en cantidades típicamente de 0,1 – 0,5 mg por kg de pienso.

- 40 Un aminoácido adecuado para añadirse según la presente enseñanza es, por ejemplo, triptófano, el cual se puede aplicar en cantidades típicamente de 10 a 30% en relación con el contenido total de lisina presente en el pienso.

Otros aditivos son, por ejemplo, productos de levaduras. Los productos de levaduras adecuados para añadirse según la presente enseñanza son uno o más productos de levadura que contienen 1,3/1,6-glucano. Estos compuestos se pueden aplicar en cantidades típicamente de 50 a 5000 mg por kg de pienso.

- 45 Las consideraciones anteriores para el pienso animal como se enseña aquí, se aplican *mutatis mutandis* para productos alimenticios para consumo humano. Cuando se utilizan en productos alimenticios, el producto puede contener un componente básico, por ejemplo un producto seleccionado de bebidas, pan, cereales y otros productos con granos, lácteos/huevos, pescado y mariscos, fruta y productos relacionados, carne y carne de aves de corral, pasta, arroz y otros granos, productos cárnicos procesados, sopas, vegetales y combinaciones de

ellos mismos. Además del componente básico, el producto alimenticio, como se enseña aquí, contiene el compuesto de ácido C5 como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, la presente enseñanza se puede utilizar para proporcionar una terapia (incluyendo un profiláctico) para condiciones tales como la enfermedad de intestino inflamatorio (IBD), enfermedad de Crohn y enfermedad celiaca anteriormente mencionadas, así como otras condiciones, tales como enteropatía ambiental en niños, en donde se dificulta la función de la barrera intestinal y aumenta la permeabilidad intestinal. Se cree que todas estas condiciones están asociadas con las uniones estrechas disfuncionales. Además, se puede utilizar la presente enseñanza para proporcionar un complemento nutricional como un tratamiento de apoyo para la recuperación de cirugías gastrointestinales y enfermedades diarreicas, ocasionadas por patógenos gastrointestinales y/o las infestaciones parasitarias gastrointestinales, que se sabe que ocasionan la alteración de la mucosa gastrointestinal y dificultan la función de la barrera intestinal.

Las dosis adecuadas para aplicación en humano típicamente son de 5 mg/kg BW (mg por kg de peso corporal) o superiores.

La presente enseñanza también se dirige a un método para mejorar la eficacia del pienso y/o la salud en animales, que comprende alimentar a un animal con un compuesto de ácido C5.

El pienso animal y el método como se enseña aquí, se pueden aplicar a varios animales, en particular mamíferos. Los mamíferos preferidos son aquellos que son animales de granja, *v. gr.* animales que se crían para aspectos de producción como carne, y leche, especialmente aquellos seleccionados de especies bovinas, especies equinas, especies porcinas, especies caprinas y ovinas. También se considera la alimentación de mascotas. Se obtuvieron resultados particularmente buenos con animales monogástricos, en particular cerdos. También se obtuvieron resultados buenos con animales jóvenes. Los animales monogástricos jóvenes, en particular los cerdos jóvenes, se prefieren de manera particular.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se investigó la función de barrera intestinal de lechones expuestos a una dieta que contiene ácido valérico. El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la adición del ácido valérico a la dieta sobre la función de la barrera intestinal de lechones.

Animales

Doce cerdos macho en crecimiento, con un peso corporal promedio de casi 15 kg, que se asignaron al azar en dos tratamientos, se alimentaron con una dieta control y una dieta de ensayo (con el ingrediente activo ácido valérico al 0,1% en peso o 1 kg/ton). Los lechones se alimentaron con las dietas respectivas por dos semanas. Al término del periodo experimental, los lechones se sacrificaron y se recolectaron los tejidos intestinales (yeyuno) para el análisis de las proteínas de la unión estrecha intestinal.

Detección de dos proteínas de la unión estrecha (Claudina-4 y E-Cadherina) mediante transferencia western

Se obtuvieron las muestras intestinales de 12 animales en el Centro de investigación porcina de Boxmeer. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

El tejido congelado se lavó en un cóctel anti-proteasa (hidrocloruro de fluoruro de 4-(2-aminoetilbencenosulfonilo; aprotinina; leupeptina; antipaina; pepstatina A; benzamidina; Sigma) preparado en PBS-EGTA (0,25 M). Posteriormente las muestras se lisaron sobre hielo en un triturador de tejido Potter con tampón de pH para lisis (Tris-HCL 20 mM pH8, EDTA 5 mM, NaN₃ 0,02%, Triton X100 1%) complementado con anti-proteasas. La solución se homogenizó a través de una aguja 26G y se sonicó 3 veces por 20 segundos. El homogenizado se diluyó con el tampón de pH para muestra (Tris-HCl 200 mM pH 6.8, glicerol 30%, β-mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%) y se calentó a 100°C durante 10 minutos, seguido de cuantificación de la proteína como ha descrito Pinton *et al.* (Toxicol. Appl. Pharmacol. **237**(2009) 41-8).

Se separaron 15 µg de proteína total de los tejidos mediante SDS-PAGE y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con PBS-Tween con 5% de leche descremada y se incubaron con los anticuerpos anti-claudina-4 de ratón (Zymed Laboratories), anti-E-Cadherina de conejo (Cell Signaling, Danvers, MA) y anti-β-actina de conejo (Cell Signaling, Danvers, MA) diluidos 1:500 o 1:1000 (anti-β-actina), en PBS con 0,5% de leche. Después del lavado, se incubaron con 1:10000 (detección de claudina-4) de IgG de cabra-anti-ratón CFTM680 (Biotium, Interchim) o con 1:10000 (detección de E-Cadherina y β-actina) de IgG de cabra anti-ratón CFTM780 (Biotium, Interchim). Las membranas se analizaron utilizando un Sistema de formación de imagen infrarroja Odyssey (LI-COR; ScienceTec, Les Ulis, Francia). Se determinaron las intensidades fluorescentes para dos canales (1 para la proteína de interés, 1 para la normalización de la β-actina) utilizando el software para formación de imagen LI-COR después de la corrección de fondo. El cociente resultante de la intensidad de la banda de la unión estrecha y de la intensidad de la banda de la β-actina en la misma muestra se comparó entre los diferentes grupos de lechones.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico utilizando Proc GLM en SAS (9.1). Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

- 5 Efecto del ácido valérico sobre la expresión intestinal de las proteínas de la unión estrecha.

Se encontró que la adición de ácido valérico a la dieta tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$). Las muestras intestinales se probaron para la expresión de la unión estrecha. La barrera intestinal está formada en gran parte por las uniones estrechas que sellan el extremo luminal del espacio intercelular y limitan el transporte por esta ruta paracelular a moléculas hidrófilas relativamente pequeñas.

- 10 Las uniones estrechas son múltiples proteínas transmembranales, de andamiaje y señalización, incluyendo las isoformas de la claudina. Una proteína de la unión estrecha que se evaluó fue la Claudina-4. También se investigó el efecto sobre la expresión de la Cadherina. Esa proteína pertenece a la unión adherente, que es inmediatamente subyacente a la unión estrecha, y desempeña un papel importante en la formación de la unión estrecha. La E-cadherina es la cadherina principal en el epitelio intestinal y su función se regula por los componentes dietéticos.
- 15

Se calculó el promedio de los cocientes resultantes de la intensidad de la banda de intensidad de la unión estrecha y de la banda de β -actina en la misma muestra: (proteína de unión estrecha / β -actina) x 10. Se compararon los diferentes promedios entre los diferentes grupos de lechones: véase las tablas y las gráficas a continuación.

- 20 **Tabla 1** Expresión de E-cadherina en la muestra yeyunal

Tratamiento animal (+/- ácido valérico)	Animal	Proteína diana	Proteína de mantenimiento	Cociente de E-cadherina/B actina	Cociente x 10
		Cadherina	B-actina		
0	1	11,32	35,73	0,32	3,1682
0	16	11,14	64,82	0,17	1,7186
0	17	10,64	38,26	0,28	2,781
0	19	10,91	61,68	0,18	1,7688
0	21	11,77	93,38	0,13	1,2604
0	24	11,51	78,85	0,15	1,4597
Ácido valérico	14	19,18	62,17	0,31	3,0851
Ácido valérico	15	14,07	47,6	0,3	2,9559
Ácido valérico	18	14,78	50,85	0,29	2,9066
Ácido valérico	20	17,59	27,04	0,65	6,5052
Ácido valérico	22	15,6	59,78	0,26	2,6096
Ácido valérico	23	19,79	68,35	0,29	2,8954

La Figura 1 resume estos resultados.

Tabla 2 Expresión de Claudina-4 en la muestra yeyunal

Tratamiento animal (+/- ácido valérico)	Animal	Proteína diana	Proteína de mantenimiento	Cociente de E-claudina/B actina	Cociente x 10
		Claudina-4	B-actina		
0	1	24,29	31,51	0,77	7,7
0	16	18,21	25,69	0,71	7,1
0	17	21,69	30,25	0,72	7,2
0	19	18,28	29,73	0,61	6,1
0	21	23,77	28,22	0,84	8,4
0	24	25,1	27,88	0,9	9
Ácido valérico	14	10,71	11,26	0,95	9,5
Ácido valérico	15	11,76	13,89	0,85	8,5
Ácido valérico	18	12,16	10,28	1,18	11,8
Ácido valérico	20	10,94	10,29	1,06	10,6
Ácido valérico	22	12,51	9,37	1,34	13,4
Ácido valérico	23	12,39	9,3	1,33	13,3

La Figura 2 resume estos resultados.

5 **Tabla 3** Efectos de diferentes dietas sobre las relaciones (relación de la proteína de unión estrecha / B actina). Se calcularon las relaciones promedio x 10, así como el error estándar.

	E-Cadherina	Claudina-4
- ácido valérico	2,026117 +/- 0,313163	7,583333 +/- 0,41906
+ ácido valérico	3,492967 +/- 0,605794	11,183333 +/- 0,819519

Como se indicó antes, para las dos proteínas, se observó un efecto del ácido valérico. La ingesta de la dieta se asoció con una mayor expresión de Claudina-4 y E-cadherina.

10 **Conclusión**

Los datos claramente indican que la adición del ácido valérico a la dieta tiene un efecto positivo sobre el fortalecimiento de la función de la barrera intestinal. Este efecto se observó sobre la expresión de las proteínas de la unión estrecha.

REIVINDICACIONES

1. Uso del ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en un pienso animal para alimentar animales de granja monogástricos o mascotas, en donde la dosis de dicho ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en dicho pienso animal es de 0,025% en peso o mayor, con respecto al peso total de dicho pienso animal.
2. El uso según la reivindicación 1, en donde los animales de granja monogástricos se seleccionan del grupo que consiste en especies equinas, especies porcinas, aves, peces o mascotas.
3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el pienso animal comprende además ácido butírico, butirato, o ambos.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la dosis de dicho ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en dicho pienso animal está en el rango de 0,1-1% en peso.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en donde la dosis de dicho ácido butírico, butirato, o ambos, es de 0,01% en peso o mayor, con base en el peso total de dicho pienso animal.
6. Uso de un pienso animal que comprende ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos, en donde la dosis de dicho ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en dicho pienso animal es de 0,025% en peso o mayor, con respecto al peso total de dicho pienso animal para mejorar la eficacia del pienso para animales de granja monogástricos o mascotas.
7. Pienso animal que comprende ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos, en donde la dosis de dicho ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en dicho pienso animal es de 0,025% en peso o mayor, con respecto al peso total de dicho pienso animal, para uso en el fortalecimiento de las uniones estrechas en las células epiteliales intestinales, y/o para mejorar las propiedades de barrera de la mucosa intestinal de mamíferos.
8. Pienso animal que comprende ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos, en donde la dosis de dicho ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en dicho pienso animal es de 0,025% en peso o mayor, con respecto al peso total de dicho pienso animal, para uso en la mejora de la salud de los animales de granja monogástricos o mascotas.
9. Pienso animal que comprende ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos, en donde la dosis de dicho ácido valérico, una sal del ácido valérico, un éster del ácido valérico, o combinaciones de ellos en dicho pienso animal es de 0,025% en peso o mayor, con respecto al peso total de dicho pienso animal, para uso en la disminución del riesgo de envenenamiento, septicemia o toxemia de animales por materiales ingeridos, contenidos gastrointestinales, o ambos.

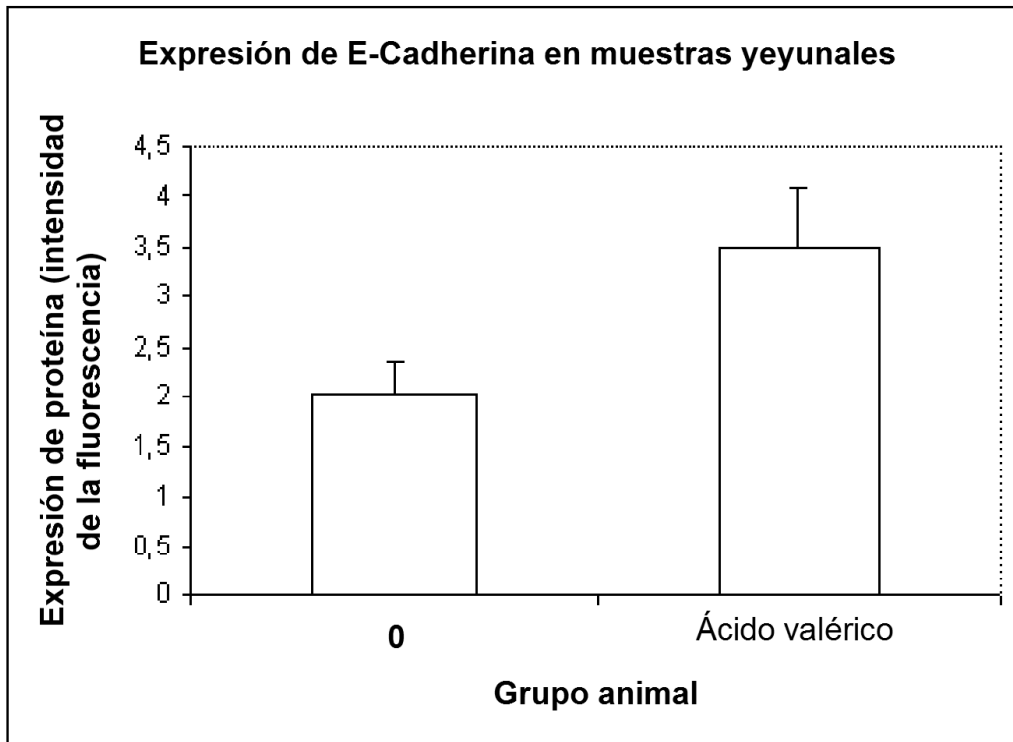


Fig. 1

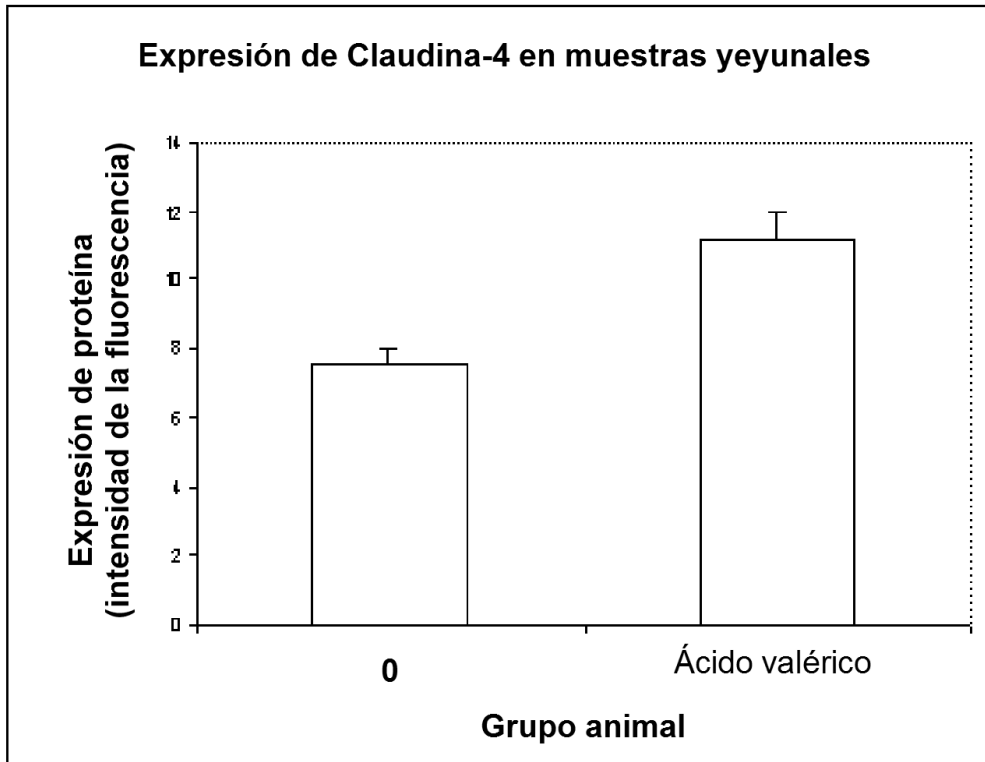


Fig. 2