



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 144**

51 Int. Cl.:
A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05754077 .5**

96 Fecha de presentación : **26.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1750522**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Uso de composiciones alimenticias para animales domésticos.**

30 Prioridad: **27.05.2004 US 855080**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.09.2011

73 Titular/es: **THE IAMS COMPANY**
7250 Poe avenue
Dayton, Ohio 45414, US

72 Inventor/es: **Kelley, Russell, Lee;**
Lepine, Allan, John y
Watkins, Bruce, A.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 144 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

Uso de composiciones alimenticias para animales domésticos

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a composiciones alimenticias para animales domésticos que comprenden ácido estearidónico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La grasa dietética puede influir en el metabolismo del hueso al alterar las acciones IGF en la biosíntesis de prostaglandinas, además de la expresión de las proteínas y los genes. Las prostaglandinas, producidas localmente de precursores de ácidos grasos esenciales con 20 átomos de carbono (ácido aracídónico y ácido eicosapentaenoico) en células osteogénicas, regulan la formación de los huesos y la resorción de los mismos. En apoyo de la relación entre ácidos grasos poliinsaturados dietéticos, las prostaglandinas y el metabolismo de los huesos, se ha informado de que los lípidos dietéticos modulan la producción *ex vivo* de PGE₂ óseo y las concentraciones de IGF-I en los tejidos óseos, y conducen a índices de formación de hueso alterados en el crecimiento de pollos y ratas. En estos experimentos, los animales provistos de ácidos grasos de cadena larga n-3 demostraron un mayor índice de formación de hueso que sugiere un efecto estimulatorio en la actividad osteoblástica. El efecto favorable de los ácidos grasos n-3 en el modelado del hueso en los animales en fase de crecimiento fue apoyado por la observación de una pérdida reducida de los minerales del hueso en ratas ovariectomizadas suplementadas con ácido eicosapentaenoico (al que se suele hacer referencia como "20:5n-3" o "EPA") y ácido docosahexaenoico (al que se suele hacer referencia como "22:6n-3" o "DHA"). Véase Watkins y col., "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health", *P.S.E.B.M.*, vol. 226 (6), págs. 485-497 (2001). Estas investigaciones indican que un efecto de conservación ósea de los ácidos grasos de cadena larga n-3 puede estar asociado con una disminución de la resorción ósea y un aumento de la formación ósea. Las respuestas observadas en el tejido óseo indican que moderar la acción de los ácidos grasos n-6 (*p. ej.*, el ácido linoleico) con ácidos grasos de cadena larga n-3 o CLA puede beneficiar el remodelado óseo.

30 Los estudios realizados en perros, pollos, ovejas y ratas han mostrado que los lípidos dietéticos transforman la composición de ácidos grasos de compartimentos óseos y puede repercutir en la producción local de agentes (*p. ej.*, prostaglandinas) que influyen en el modelado/remodelado del hueso. También se ha descrito que el ácido graso poliinsaturado n-3 dietético (PUFA) disminuyó la concentración de ácido araquidónico (al que se suele referir como "20:4n-6" o "AA") en los tejidos de los cartílagos y los huesos, y redujo la producción *ex vivo* de PGE₂ en cultivos de órganos óseos. Véase Watkins y col., "Bioactive fatty acids: Role in bone biology and bone cell function", *Prog. Lipid Res.*, vol. 40, págs. 125-148 (2001). En otro estudio realizado con ratas, la producción *ex vivo* de PGE₂ en cultivos de órganos óseos disminuyó significativamente en las ratas a las que se dieron dietas con un índice dietético inferior de ácidos grasos n-6/n-3 (n-6/n-3 = 1,2 ~ 2,6) en comparación con aquellas que tenían dietas con un índice dietético superior (n-6/n-3 = 10 ~ 24).

40 El análisis de regresión reveló una correlación positiva significativa entre la producción *ex vivo* de PGE₂ y el índice de AA/EPA en el hueso pero una correlación negativa significativa entre el índice de formación del hueso y el índice de AA/EPA o PGE₂ en el hueso. Además, la actividad de fosfatasa alcalina específica del hueso en suero fue superior en las ratas a las que se dio una dieta alta en ácidos grasos n-3 que apoya todavía más la acción positiva de estos ácidos grasos en la formación ósea. Estos resultados demostraron que el índice dietético de ácidos grasos n-6/n-3 modula la producción de PGE₂ en el hueso y la actividad de fosfatasa alcalina específica del hueso en suero en las ratas que se encuentran en fase de crecimiento.

50 La patente WO 03/075670 se refiere a métodos para tratar y prevenir trastornos asociados con un TNF- α elevado y/o 1L-1 β , como trastornos inflamatorios al administrar ácido estearidónico.

La patente WO 98/46764 describe composiciones y métodos para preparar ácidos grasos poliinsaturados entre los que se incluye el ácido estearidónico, en plantas o en partes de las mismas. Los ácidos grasos poliinsaturados son útiles para el tratamiento de varios estados patológicos, entre los que se incluye la inflamación y el cáncer.

55 La patente WO 01/60356 describe un método de mejorar el modelado de los huesos y el funcionamiento del condrocito en los caninos en fase de crecimiento.

A pesar de estos avances, sigue existiendo una necesidad en la técnica de entender todavía más los ácidos grasos que están implicados en el incremento de la salud ósea y la salud de las articulaciones, entre los que se incluye el control de la inflamación y ventajas relacionadas.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a composiciones que utilizan ácido estearidónico (SDA), que es un ácido graso omega-3.

10 La presente invención está dirigida al uso de una composición alimenticia para animales domésticos que comprende ácido estearidónico para incrementar el funcionamiento del condrocito, incrementar y/o mantener la concentración de tejidos de ácido graso omega-3 y combinaciones de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso salvo que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y relaciones se calculan con respecto a la composición total salvo que se indique lo contrario.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender, consistir prácticamente en o consistir en cualquiera de los elementos descritos en la presente memoria.

20 En la presente memoria, la expresión "animal doméstico" significa un perro o gato domésticos.

En la presente memoria, el término "animal geriátrico" o similares significa un animal doméstico que se considera de mediana edad o mayor según los estándares comúnmente utilizados en la técnica, con la siguiente estipulación: un perro geriátrico es un perro doméstico con una edad de 5 años o más; y un gato geriátrico es un gato doméstico con una edad de 6 años o más.

25 En la presente memoria, el término "perro de raza grande" significa un perro doméstico que pesa, o tiene un peso estimado, de aproximadamente 14 kg (30 libras) o más al llegar a los 3 años. De forma opcional, el término "perro de raza grande" significa un perro doméstico que pesa, o tiene un peso estimado, de aproximadamente 18 kg (40 libras) o más al llegar a los 3 años. De este modo, los perros de raza grande incluirán perros que no hayan llegado a los 3 años de edad, siempre que se estime que dichos perros alcancen el peso definido al llegar a los 3 años de edad. Ejemplos no limitativos de perros de raza grande pueden incluir los que se encuentran en el grupo de perros deportivos, el grupo de perros de caza, el grupo de perros de trabajo, grupo de perros de caza, grupo de perros de pastoreo, o diversas clases según se describe en el American Kennel Club.

30 En la presente memoria, el término "gatito" se refiere a un gato doméstico que tiene aproximadamente 3 años o menos, de forma alternativa aproximadamente 2 años o menos, de forma alternativa aproximadamente 1 año o menos.

40 En la presente memoria, el término "cachorro" se refiere a un perro doméstico que tiene aproximadamente 3 años o menos, de forma alternativa aproximadamente 2 años o menos, de forma alternativa aproximadamente 1 año o menos.

Composiciones de la presente invención

45 Las presentes composiciones son útiles para varios propósitos. Aunque estos métodos están previstos para perros y gatos domésticos, los métodos pueden ser especialmente útiles para animales geriátricos, perros de raza grande, o cachorros y gatitos en fase de crecimiento.

50 Las presentes composiciones de la invención son composiciones alimenticias para animales domésticos que comprenden ácido estearidónico (al que se suele mencionar en la presente memoria como "SDA"). El SDA es un ácido graso omega-3. Como es bien comprendido en la técnica, los ácidos grasos omega-3 son aquellos materiales de ácido graso que tiene un enlace doble omega-3, en donde el primer enlace doble en la cadena de carbono está colocado entre el tercer átomo y el cuarto átomo de carbono de la cadena de ácido graso, contando a partir del átomo de carbono metil omega (distal) de la cadena. El SDA es un ácido graso omega-3 de 18 átomos de carbono, al que se hace referencia en la técnica como 6Z, 9Z, 12Z, 15Z-ácido octadecatetraenoico o ácido moróctico.

En la presente memoria se contemplan todas las formas de SDA. Por ejemplo, el SDA se puede suministrar como un ácido exento de grasa o como un triglicérido. En este sentido, cuando en la presente memoria se menciona el SDA o cualquier otro ácido graso, dicho ácido graso incluye la forma libre del ácido graso además de otras formas como etil (u otros) ésteres o el triglicérido natural u otra forma. Los términos SDA u otros términos específicos se utilizan por comodidad de uso como se conocen comúnmente en la técnica con el fin de incluir todas las formas de dichos materiales así designados.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones comprenden una fuente concentrada de SDA para proporcionar toda o una parte del SDA presente en la composición. En la presente memoria, el término "fuente concentrada de ácido estearidónico", "fuente concentrada de SDA", o similares se refiere a un componente que es un aditivo para la composición que comprende al menos 0,1% de SDA, en peso de la fuente concentrada. De forma opcional, la fuente concentrada comprende al menos 0,4%, o al menos 0,7%, o al menos 1% del SDA, en peso de la fuente concentrada.

Las fuentes concentradas que se pueden encontrar fácilmente incluyen, por ejemplo, nueces, semillas, extractos de las mismas (por ejemplo, un aceite de semillas), aceites transformados de planta y semillas oleaginosas, diversos aceites de pescado, o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones en la presente memoria, la fuente concentrada puede seleccionarse de familias de plantas seleccionadas del grupo que consiste en *Cannabis sativa* (por ejemplo, que comprende de 0,3% a 2% de SDA), *Ribes nigium* (por ejemplo, que comprende de 2% a 4% de SDA), *Echium plantagineum* (por ejemplo, que comprende de 12% a 14% de SDA), o *Echium vulgare* (por ejemplo, que comprende de 18% a 20% de SDA). Las fuentes concentradas ilustrativas en la presente memoria incluyen aquellas seleccionadas del grupo que consiste en aceite de semillas de grosella negra, aceite de semillas de cáñamo, aceite de echium, y mezclas de los mismos (que incluyen todas las variedades). El aceite de echium está comercializado por Croda International PLC de Gran Bretaña, y otras fuentes concentradas ilustrativas están ampliamente disponibles en diversas fuentes comerciales.

En realizaciones alternativas o adicionales en la presente memoria, la composición alimenticia para animales domésticos comprende una cantidad de SDA efectiva para proporcionar una función seleccionada del aumento de la función de condrocito, mantenimiento de la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3, aumento de la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3, y combinaciones de los mismos en un animal doméstico tras la administración (preferiblemente la administración oral) al animal doméstico. Estas funciones se describen en más detalle en la presente memoria a continuación en relación a *Métodos de la presente invención*. En la presente memoria, el término "cantidad eficaz", en referencia al SDA utilizado en la presente memoria, significa la cantidad de SDA suficiente para proporcionar el mencionado beneficio. La "cantidad eficaz" específica variará con factores tales como la condición física del animal doméstico, el estado fisiológico, la edad, el género, raza, duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concomitante (si la hay), la forma específica de la composición que se utilizará, o similares, que será bien conocida por el experto en la técnica dadas las descripciones que se proporcionan en la presente memoria.

En realizaciones alternativas o adicionales en la presente memoria, la composición alimenticia para animales domésticos puede comprender al menos 0,001% de SDA, de forma alternativa al menos 0,01% de SDA, de forma alternativa al menos 0,1% de SDA, todo en peso de la composición. Además, la composición alimenticia para animales domésticos puede comprender de 0,001% a 75%, de forma alternativa de 0,001% a 5%, de forma alternativa de 0,001% a 1%, o de forma alternativa de 0,01% a 0,5% de SDA, todo en peso de la composición. Las composiciones alimenticias para animales domésticos que son suplementos pueden tender a tener niveles más altos de SDA en relación a composiciones alimenticias para animales domésticos nutricionalmente equilibradas previstas para su alimento diario. Aún es más, las formas de suplemento como pastillas, cápsulas, o similares por ejemplo, suelen comprender niveles más altos de SDA en relación a las galletas, dulces, salsas u otras golosinas similares, entre las que se incluye la leche o sustitutivos de la leche, o en relación a composiciones alimenticias para animales domésticos previstas para su alimento diario. El experto en la materia podrá realizar la determinación que considere más adecuada.

En otras realizaciones alternativas o adicionales en la presente memoria, la composición alimenticia para animales domésticos comprende un nivel de SDA con respecto al peso de los ácidos grasos poliinsaturados totales de la composición; por ejemplo, en una realización, la composición puede comprender de 0,1% a 5% de SDA, en peso de los ácidos grasos poliinsaturados totales de la composición. Los ácidos grasos poliinsaturados son bien conocidos en la técnica, e incluyen, aunque no están limitados a, ácidos grasos omega-3 y ácidos grasos omega-6.

La composición alimenticia para animales domésticos puede presentarse en cualquier forma, preferiblemente en una forma que se pueda administrar oralmente. Por ejemplo, la composición puede ser una composición alimenticia para animales domésticos nutricionalmente equilibrada o un suplemento. En la presente memoria, la expresión "nutricionalmente equilibrada", en referencia a una composición alimenticia para animales domésticos,

significa que la composición tiene nutrientes necesarios conocidos para el sustento en cantidades y proporción adecuadas según las recomendaciones de autoridades reconocidas en materia de nutrición de animales domésticos. Las composiciones alimenticias para animales domésticos nutricionalmente equilibradas son fácilmente conocidas en la técnica, por ejemplo, alimentos secos, alimentos semi-húmedos, y alimentos húmedos, todos se utilizan como alimentación diaria para animales domésticos. Los suplementos pueden incluir formas de dosificación tales como pastillas, cápsulas, o similares, u otras formas como galletas, dulces, salsas (u otros condimentos), yogures, sustitutivos de la leche u otras formas. Aunque los suplementos, de forma típica, no son nutricionalmente equilibrados, es completamente aceptable si dichos suplementos son nutricionalmente equilibrados.

Otros componentes son ventajosos para ser incluidos como composiciones usadas en la presente invención, pero son opcionales para los propósitos de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones alimenticias para animales domésticos previstas para la alimentación diaria son preferiblemente nutricionalmente equilibradas. En una realización, dichas composiciones alimenticias para animales domésticos pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 50% de proteínas, o de 22% a 40% de proteínas, en peso de la composición alimenticia para animales domésticos. En otro ejemplo, las composiciones alimenticias para animales domésticos pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, o de 10% a 30% de grasa, en peso de la composición alimenticia para animales domésticos. En otra realización, las composiciones suplementarias como galletas, dulces, y otras formas pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 50% de proteínas, o de 22% a 40% de proteínas, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo, estos tipos de composiciones suplementarias pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, o de 10% a aproximadamente 30% de grasa, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo, las composiciones suplementarias como salsas u otros condimentos pueden a menudo comprender desde aproximadamente al menos 0,5% de proteínas, o al menos 0,8% de proteínas, en peso de la composición suplementaria. En un ejemplo adicional, las composiciones suplementarias como salsas u otros condimentos puede a menudo comprender desde aproximadamente al menos 1% de grasa, o al menos 2% de grasa, o de 1% a 5% de grasa, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo más, las composiciones suplementarias como salsas u otros condimentos pueden a menudo comprender desde aproximadamente al menos aproximadamente 50% de humedad, o al menos 70% de humedad, o de 70% a 99% de humedad. La alimentación diaria y las composiciones suplementarias previstas para su uso en animales domésticos son, por supuesto, conocidas comúnmente en la técnica.

Métodos de la presente invención

Los métodos de la presente invención comprenden la administración, preferiblemente la administración oral (*es decir*, a través de la ingestión) de una composición de la presente invención a un animal doméstico para proporcionarle uno o más beneficios para la salud descritos en la presente memoria. En especial, los presentes métodos son aquellos seleccionados del grupo que consiste en el aumento del funcionamiento del condrocito, el mantenimiento de la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3, el aumento de la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3, y combinaciones de los mismos, incluidos similares, en un animal doméstico que comprende la administración de una composición que contiene SDA al animal doméstico. Aunque estos métodos están previstos para perros y gatos domésticos, los métodos pueden ser especialmente útiles para animales geriátricos, perros de raza grande, o cachorros y gatitos en fase de crecimiento. Las composiciones que contienen el SDA pueden ser cualquiera de una variedad de composiciones descritas anteriormente en la presente memoria.

Como se ha descubierto sorprendentemente en la presente memoria, el suministro de SDA al animal doméstico da como resultado el mantenimiento o aumento de concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3. En este sentido, en una realización, los métodos presentes están dirigidos a este descubrimiento. Los ácidos grasos omega-3 se conocen comúnmente en la técnica, e incluirán ácido docosahexaenoico (comúnmente referido como "DHA") y ácido eicosapentaenoico (comúnmente referido como "EPA").

De forma alternativa o de forma adicional, la invención está dirigida a métodos de aumentar el funcionamiento del condrocito. Como es bien conocido en la técnica, el cartílago que ha crecido en huesos largos contiene condrocitos que inician la mineralización del hueso a través de vesículas de matriz que han sido descritas como microentornos encerrados en lípidos que contienen fosfolípidos ácidos que exhiben una alta afinidad para unir iones de calcio.

En la presente memoria, con respecto a los métodos de la presente invención, los términos "administrar", "administración" o similares significan que se proporciona al animal doméstico mencionado una o más composiciones de la presente invención; dicho suministro debe ser intenso o sistemático. En la presente memoria con respecto a los procesos de esta invención, los términos "administrar oralmente", "administración oral" o similares significan que el animal doméstico mencionado ingiere o se le indica que ingiera (interpretado ampliamente como que incluye el mero suministro de la composición al animal doméstico) una o más de las composiciones descritas en la presente memoria, o se indica al propietario o a la persona que está a cargo de dicho animal que suministre una o más composiciones al animal doméstico.

Si se indica al dueño que administre la composición, dicha indicación puede ser una que informe al dueño de que el uso de la composición puede proporcionar y/o proporcionará una o más de las ventajas descritas en la presente memoria, como el aumento del funcionamiento del condrocito (incluyendo la salud del cartílago el mantenimiento de la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3, el aumento de la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3, combinaciones de los mismos, incluidos similares. Por ejemplo, tal indicación puede ser una indicación oral (p. ej., a través de la instrucción oral, por ejemplo, de un veterinario o de otro profesional de la salud, un profesional o una organización de ventas y/o medios de radio o televisión (es decir, publicidad) o indicación escrita (p. ej., a través de las indicaciones escritas de, por ejemplo, un veterinario o de otro profesional de la salud (p. ej., guiones), un profesional o una organización de ventas (p. ej., mediante, por ejemplo, folletos de marketing, panfletos u otros medios instructivos), medios escritos (p. ej., Internet, correo electrónico u otros medios relacionados con el ordenador) y/o dispositivos de contención asociados a la composición (p. ej., una etiqueta presente en el envase que contiene la composición).

Las composiciones se pueden administrar según una variedad de frecuencias o duraciones. Por ejemplo, cuando las composiciones son composiciones alimenticias previstas para la alimentación diaria, las composiciones se administran de forma típica de una vez al día a aproximadamente cuatro veces al día, de forma alternativa de una vez al día a aproximadamente tres veces al día, de forma alternativa de una vez al día a aproximadamente dos veces al día, de forma alternativa a voluntad. Sin embargo, no es necesaria la administración diaria para ninguna de las composiciones alimenticias para animales domésticos en la presente memoria. Por ejemplo, las composiciones alimenticias para animales domésticos nutricionalmente equilibradas de la presente invención se pueden intercambiar con composiciones alimenticias nutricionalmente equilibradas que no estén de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, el suministro de ambas en una programación predeterminada o rotativa). Los suplementos se pueden suministrar diariamente o no.

Para conseguir los beneficios que se mencionan en la presente memoria, se prefiere que las composiciones se administren durante al menos una semana, de forma alternativa al menos dos semanas, de forma alternativa al menos tres semanas, de forma alternativa al menos cuatro semanas, de forma alternativa al menos 6 semanas, de forma alternativa al menos ocho semanas o en una duración ilimitada.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y no están previstos en absoluto para limitar el ámbito de la misma. Los ejemplos describen metodologías experimentales que se pueden emplear para determinar la ventaja del SDA según las reivindicaciones.

Se llevan a cabo experimentos para determinar cuánto tratamiento de SDA de células similares al osteoblasto en el cultivo influyen en la composición de ácido graso poliinsaturado (PUFA). La línea celular de osteoblasto MC3T3-E1 se cultiva en un medio de crecimiento (GM) que consiste en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), ácido ascórbico, β -glicerol-fosfato, y 1% de solución antimicrobiana. Las células se colocan en placas de 24 pocillos con una densidad de $1,2 \times 10^4$ células por ml durante 3 días hasta que son confluentes. Una vez que son confluentes, en correspondencia con la inicialización del fenotipo osteoblástico, el medio o bien se cambia para el tratamiento con SDA o ácido linoleico (LNA) o se cultiva todavía más en un GM hasta que se somete a varios tratamientos. Al final del período de tratamiento de ácidos grasos de 3 días, los cultivos se exponen a agentes que inducen la expresión COX-2. Los dos agentes que se utilizan son forskolina (FSK) e interleucina-1 (IL-1). Estos agentes se seleccionan en función de sus acciones respectivas en el gen COX-2. La forskolina, un activador del adenilato ciclasa, aumenta las concentraciones de AMP cíclico (cAMP). La interleucina-1, en sí misma es un agente de resorción ósea que se une a su receptor en la membrana celular, lanza una cascada que da como resultado la activación del factor de transcripción factor-nuclear k-B (NFkB). El AMP cíclico y NFkB activan la expresión del gen COX-2. El AMP cíclico activa la expresión del gen COX-2 a través de la proteína de unión del elemento de respuesta cAMP (CREBP), que se une al elemento de respuesta cAMP (CRE) en el estimulador COX-2. El estimulador COX-2 también contiene un elemento de unión NFkB. De este modo, estos dos compuestos inducen COX-2 y aumentan los niveles de la proteína COX-2 a través de la activación de genes, aunque a través de dos diferentes vías, ofreciendo una oportunidad única de demostrar la interacción de los ácidos grasos nutracéuticos con las vías de señalización pertinentes a la expresión COX-2.

Los siguientes elementos se determinan como medidas de resultados:

Análisis compositivo de ácidos grasos de osteoblastos. Las células osteoblásticas expuestas a los tratamientos PUFA (SDA y LNA) se someten a un análisis cromatográfico de gas del FAME de los lípidos extraídos de las células lavadas.

Ensayo MTS. Para determinar si los tratamientos de ácidos grasos crecen de un modo inhibitorio para las células osteoblásticas, se utiliza un ensayo que emplea un compuesto de tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio, sal interna; también conocido como MTS (Cell Titer 96 Aqueous, Promega, Madison, WI). El MTS se convierte en un producto coloreado por células vivas. La absorción se mide fácilmente mediante la espectrometría, y está directamente relacionada con el número de células viables. Los resultados de este ensayo son comparables con los obtenidos utilizando un ensayo de incorporación de ³H-timidina. Las células osteoblásticas, MC3T3-E1, se cultivan en placas de 96 pocillos hasta su confluencia. Al producirse la confluencia, el medio se cambió a un GM suplementado con diversas concentraciones de los ácidos grasos durante 3 días. Después de 3 días, la solución de MTS se añade directamente a los pocillos, la placa se incubó a 37 °C durante 60 minutos y, a continuación, se lee A₄₉₀ utilizando un lector de microplacas (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, NJ).

Ensayo de ácido cis-parinárico. Como consecuencia de sus estructuras, PUFA son susceptibles a la oxidación y la posterior formación de compuestos de radicales libres, que pueden ser genotóxicos. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos para examinar si los tratamientos de enriquecimiento PUFA influyen en el deterioro oxidativo aguas abajo. Un método único de determinar la susceptibilidad al deterioro oxidativo es a través del uso de ácido cis-parinárico [cPnA, tetraeno conjugado 18:4 (9,11,13,15)], un ácido graso que es fluorescente de un modo natural al incorporarse a las membranas celulares y se utiliza para comprobar la oxidación lípida. En estos experimentos, las células se cultivan para confluir y el medio se cambia a un GM suplementado con PUFA durante 24 horas, después de lo cual se añade 20 µM cPnA directamente al medio de 2 a 4 horas para permitir la esterificación en fosfolípidos de membrana. Tras la carga de cPnA, las células se lavan 2x en una solución salina tampón fosfato (PBS). Después de lavadas, se añade peróxido de hidrógeno 100 µM (H₂O₂, un inductor de la tensión oxidativa) en el PBS y se mide la fluorescencia cPnA durante 30 minutos utilizando un lector de microplacas fluorescentes.

Immunoensayo Western Blot. Se lleva a cabo un análisis de proteínas COX y PLA₂ en cultivos celulares después de la confluencia. El método de inducción es variado para evaluar la influencia de FBS (que puede inducir la expresión de COX-2, el tiempo de inducción, el tipo de inductor, y la concentración de inductor) en la expresión de COX-1, COX-2, y proteína fosfolipasa citoplásmica A₂ (cPLA₂). La densidad óptica se determina utilizando el software de análisis de imagen Optimus (versión 6.1). Los valores de densidad óptica para las bandas de proteína COX-1, COX-2, y cPLA₂ se normalizan ante los obtenidos para la actina.

Expresión génica COX. Los niveles de expresión génica COX se evalúan mediante una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar el RNA total. El RNA celular total se aísla con un kit (Ambion, Austin, Texas) y se combina de 3 pocillos idénticos de una placa de 24 pocillos. Se añaden 100 ng de RNA total y 100 ng de cada imprimador específico de un gen para COX-1, COX-2, y actina a un kit Ready-To-Go RT-PCR bead (Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de COX-1 y COX-2 mRNA se normalizan a la expresión de actina y se utiliza el software UN SCAN-IT (Versión 5.1, Silk Scientific Inc., Orem, UT) en el análisis de las bandas PCR, que se resuelven a través de un 3% de gel de agarosa y se manchan con bromuro de etidio.

Formación de PGE₂. En los experimentos ya detallados en el apartado correspondiente al Western blotting, los niveles de PGE₂ en el medio de células inducidas y no inducidas se determinan utilizando un kit de inmunoensayo de enzimas (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Actividad enzimática: La actividad de fosfatasa alcalina (ALP) se determina mediante el método de Lowry.

Síntesis de colágeno. La síntesis de colágeno es otro marcador que se utiliza comúnmente para la actividad de formación ósea osteoblástica. La producción de colágeno alcanza su nivel máximo durante la fase de maduración de la matriz. Las células osteoblásticas cultivadas en un GM suplementado con ácidos grasos durante 5 días una vez que han confluido (el tiempo de tratamiento de ácidos grasos más prolongado permite la acumulación de unidades de colágeno) se utilizan en los experimentos.

Los resultados de los anteriores ejemplos no limitativos indican que la adición de SDA a niveles de tratamiento mayores da como resultado un aumento de las concentraciones de ácidos grasos omega-3 totales en los osteoblastos. Estos resultados demuestran que el SDA especialmente eleva el EPA y 22:5n-3, que son dos ácidos grasos que pueden modificar directamente o indirectamente la síntesis de prostanoides en los tejidos óseos y osteoblastos. En otros cultivos celulares, el SDA es más eficaz en la modificación de las concentraciones de ácidos grasos omega-3 que el ácido linolénico (18:3n-3). Además, el SDA es un ácido graso que tiene actividad biológica para atenuar la producción de PGE₂ en los osteoblastos. Aún es más, el SDA da como resultado la actividad más alta de fosfatasa alcalina para todos los puntos temporales, en relación al ácido linolénico.

Los experimentos también están diseñados para evaluar el efecto de SDA en el animal doméstico, como un perro o un gato. Por ejemplo, a los sabuesos se les suministra una dieta en ácidos grasos esencialmente baja durante un período de 90 días. Las dietas suplementadas con SDA o ácido linolénico se suministran durante los 30 días posteriores. Los resultados indican concentraciones elevadas de EPA y 22:5n-3 en las membranas de los glóbulos rojos, plasma, y tejido del hígado en perros a los que se alimenta con las dietas suplementadas con SDA en comparación con aquellos perros a los que se ha alimentado con dietas suplementadas con ácido linolénico. También, una tendencia a la disminución del ácido araquidónico en el plasma y el hígado de los perros a los que se ha alimentado con las dietas suplementadas con SDA. Sin pretender imponer ninguna teoría, estos resultados indican que el SDA dietético da como resultado un aumento en las concentraciones de tejidos de ácidos grasos omega-3 clave en gran medida en relación al ácido linolénico al entrar en la vía metabólica posterior a la enzima delta-6-desaturase. Estos aumentos en ácidos grasos omega-3 y la tendencia a una disminución del ácido araquidónico en el perro representan cambios que sugieren un beneficio para la salud considerable para el animal doméstico y reflejan una ventaja por utilizar SDA como un componente dietético en las composiciones alimenticias para animales domésticos sobre fuentes existentes de ácidos grasos omega-3.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición alimenticia para animales domésticos que comprende ácido estearidónico para aumentar el funcionamiento del condrocito, aumentar y/o mantener la concentración de tejidos de ácidos grasos omega-3 y combinaciones de los mismos.
2. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según la reivindicación 1, que comprende una fuente concentrada de ácido estearidónico.
- 10 3. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según la reivindicación 2, en la que la fuente concentrada se selecciona del grupo que consiste en semillas, nueces, extractos de las mismas, y mezclas de las mismas.
4. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la fuente concentrada se selecciona del grupo que consiste en aceite de semillas de grosella negra, aceite de semillas de cáñamo, aceite de echium, y mezclas de los mismos.
- 15 5. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la fuente concentrada comprende al menos 0,4% de ácido estearidónico, en peso de la fuente concentrada;
6. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos 0,01% de ácido estearidónico, preferiblemente al menos 0,1% de ácido estearidónico, en peso de la composición.
- 20 7. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una composición alimenticia para animales domésticos nutricionalmente equilibrada.
8. Uso de la composición alimenticia para animales domésticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un suplemento.