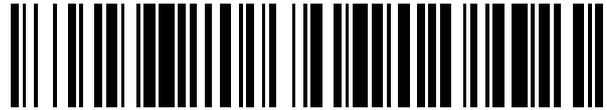


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 461**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A23J 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010** **E 10710358 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2413952**

54 Título: **Mejora en la promoción del crecimiento compensatorio sano**

30 Prioridad:

**03.04.2009 EP 09157244**

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

**18.05.2016**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**APRIKIAN, OLIVIER;  
BLANCHER, FLORENCE;  
MACE, CATHERINE y  
SHAHKHALILI, YASSAMAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 570 461 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

Mejora en la promoción del crecimiento compensatorio sano

## 5 Antecedentes de la presente invención

La presente invención se refiere al uso de ciertas proteínas para mejorar el crecimiento sano y reducir el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina como consecuencia de un crecimiento compensatorio incontrolado (insano) en bebés y niños y de la recuperación de peso en adultos.

10 Durante muchos años se ha observado que el patrón de crecimiento de los mamíferos jóvenes que padecen estrés suele interrumpirse, ya sea como resultado de una enfermedad o lesión corporal o de un trauma psicológico. Si el joven mamífero se recupera rápidamente y dispone de nutrición adecuada puede compensar el crecimiento que debería haber tenido durante el periodo de estrés. Esta aceleración repentina del crecimiento es conocida como  
15 "crecimiento compensatorio". Sin embargo no siempre tiene lugar. Por ejemplo, el joven mamífero puede padecer anorexia durante la enfermedad o el trauma y como secuela inmediata puede tener limitada su ingesta de alimento. En los casos graves puede ser que el animal no llegue nunca a la estatura corporal que habría alcanzado de no haber padecido el estrés.

20 Este fenómeno se puede ver en los mamíferos jóvenes, incluyendo los humanos, desde la infancia y a lo largo del periodo de su vida en que aún están creciendo. Puede ser particularmente notorio en el caso de los mamíferos jóvenes nacidos prematuramente, así como en el de aquellos que, por la causa que sea, no alcanzan los patrones normales de crecimiento antes de nacer. En el caso de los bebés humanos, estos individuos se pueden describir como sujetos a una restricción del crecimiento intrauterino (RCIU).

25 Aunque es deseable asegurar la compensación del crecimiento disminuido durante los periodos de estrés físico o mental, también es importante reducir el riesgo de desarrollar con posterioridad una enfermedad metabólica como consecuencia de un crecimiento compensatorio insano. Con independencia de la teoría se cree asimismo que el crecimiento compensatorio no debe ser excesivo, pues hay indicios, sobre todo durante la infancia, de que los  
30 periodos de crecimiento compensatorio muy rápido y/o muy extenso pueden estar relacionados con un riesgo de obesidad futura. También es importante que el crecimiento compensatorio no vaya acompañado de un depósito excesivo de grasa ni de hiperinsulinemia, ya que estas características del crecimiento compensatorio pueden estar relacionadas con el riesgo de padecer obesidad y diabetes en el futuro.

35 Ciertamente cada vez hay más evidencias indicativas de que las personas que nacieron con poco peso o tuvieron falta de desarrollo durante la infancia o la niñez, pero luego recuperaron el crecimiento, son más propensas a la obesidad abdominal, a la diabetes de tipo 2 y a las enfermedades cardiovasculares en su vida posterior (Cianfarani S, Germani D, Branca F: Low birth weight and adult insulin resistance: the 'catch-up growth' hypothesis [*Bajo peso al nacer y resistencia adulta a la insulina: hipótesis del "crecimiento compensatorio"*]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 81:F71-3 (1999), Levy-Marchal C, Jaquet D, Czernichow P: Long-term metabolic consequences of being born small for gestational age [*Consecuencias metabólicas a largo plazo de haber nacido pequeño para la edad gestacional*]. Semin Neonatol 9:67-74 (2002)). Recientemente se ha sugerido que la fase del crecimiento compensatorio puede  
40 corresponder a un estado hiperinsulinemia concomitante con una velocidad de recuperación de la grasa corporal desproporcionadamente superior a la de recuperación del tejido magro (Dulloo AG. Regulation of fat storage via suppressed thermogenesis: a thrifty phenotype that predisposes individuals with catchup growth to insulin resistance and obesity [*Regulación del depósito de grasa mediante la supresión de la termogénesis: un fenotipo ahorrativo que predispone a los individuos con crecimiento compensatorio a padecer resistencia a la insulina y obesidad*]. Hormone Research 65, Suppl 3: 90-7 (2006)).

50 La resistencia a la insulina aparece cuando el cuerpo no es capaz de responder adecuadamente a la acción de la insulina producida por el páncreas. Se da con mayor frecuencia en los adultos, pero cada vez se observa más en adolescentes y también en niños pequeños. El cuerpo intenta vencer esta resistencia secretando más insulina desde el páncreas. El desarrollo de la diabetes de tipo 2 o diabetes no dependiente de insulina ocurre cuando el páncreas no puede mantener esta mayor secreción de insulina.

55 Esta tasa desproporcionada de recuperación de grasa corporal respecto al tejido magro aparece en el adulto durante la fase de "crecimiento compensatorio" tras una pérdida de peso debida a enfermedad, a un periodo de dieta, etc.

60 Por consiguiente se requiere claramente una intervención diseñada específicamente para abordar las necesidades nutricionales de los bebés y niños pequeños que pasan por periodos de crecimiento compensatorio y al mismo tiempo reducir el riesgo de padecer resistencia a la insulina, diabetes de tipo 2 u obesidad en su vida posterior.

65 Análogamente se requieren intervenciones diseñadas específicamente para abordar las necesidades nutricionales de sujetos jóvenes o adultos que están recuperando peso y al mismo tiempo reducir el riesgo de padecer resistencia a la insulina, diabetes de tipo 2 u obesidad más adelante en la vida.

Resumen de la presente invención

Utilizando un modelo de semiinanición-realimentación y restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) en ratas los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la intolerancia a la glucosa y la hiperinsulinemia – que habitualmente caracterizan periodos de crecimiento acelerado o compensatorio y se han relacionado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de resistencia a la insulina y por último con diabetes de tipo 2 en la vida posterior – se pueden mejorar aportando como alimento un tipo específico de proteína durante o tras los periodos de crecimiento compensatorio o de recuperación de peso. La proteína específica también mejora el crecimiento saludable durante la fase de crecimiento temprano.

Por tanto la presente invención ofrece el uso de una fuente proteica que comprende proteínas de caseína bovina para la preparación de una composición nutricional que debe administrarse a un bebé o niño pequeño que pasa por un periodo de crecimiento compensatorio tras un periodo de restricción del crecimiento, durante o después de dicho periodo de crecimiento compensatorio, a fin de reducir el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina o diabetes de tipo 2 en la vida posterior del bebé o del niño pequeño y promover su crecimiento saludable.

La presente invención ofrece un método para reducir la posibilidad de que un bebé o niño un pequeño que pasa por un periodo de crecimiento compensatorio tras un periodo de restricción del crecimiento, y que por lo tanto está en riesgo de desarrollar resistencia a la insulina o diabetes de tipo 2 en su vida posterior, padezca estos trastornos más adelante. Dicho método consiste en administrar una composición nutricional que incluye una fuente proteica con proteínas de caseína bovina al bebé o al niño pequeño que corre este riesgo, durante o después del periodo de crecimiento compensatorio.

La presente invención también describe una solución nutricional basada en proteína bovina para reducir el riesgo de que un adulto desarrolle una diabetes durante o tras una recuperación de peso después de perderlo.

Preferiblemente, al menos el 30% en peso de la fuente proteica es caseína bovina. Más preferiblemente, la caseína bovina constituye entre el 40% y el 100% de la fuente proteica.

Los periodos de crecimiento compensatorio pueden darse en cualquier momento de la vida de un individuo, desde el nacimiento hasta la edad en la cual se ha alcanzado la plena estatura física, a consecuencia de una enfermedad o lesión corporal o de un trauma psicológico que ha ido acompañado de una limitación del crecimiento o ha sido causa de ella. Los bebés que nacen prematuros o que supuestamente han sufrido un retraso del crecimiento intrauterino antes de nacer (tanto si el nacimiento es prematuro como si no, por referencia al periodo normal de gestación de 40 semanas en el caso de humanos) parecen ser particularmente propensos a crecer con rapidez inmediatamente después del nacimiento y a tener un riesgo elevado de que dicho crecimiento conlleve una tasa desmedidamente alta del depósito de grasa y también de hiperinsulinemia. La presente invención tiene una utilidad particular para el cuidado y la nutrición de tales niños. Además la presente invención también es útil para adultos o jóvenes durante o tras un periodo de recuperación de peso.

Descripción breve de las figuras

La figura 1 representa la evolución en el tiempo del contenido de glucosa en el plasma de tres grupos de ratas realimentadas con dietas que llevan diferentes componentes proteicos;

la figura 2 representa la evolución en el tiempo del contenido de insulina en el plasma de tres grupos de ratas realimentadas con dietas que llevan diferentes componentes proteicos;

la figura 3 representa el peso medio al nacer y el peso medio al final del periodo de lactancia y hasta los 190 días de edad de tres grupos de crías de rata, dos de los cuales habían nacido de madres a las que se había limitado la comida durante la gestación, a fin de provocar la restricción del crecimiento intrauterino de las crías;

la figura 4 muestra las respuestas medias en contenido de glucosa de los tres grupos a un ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal a la edad de 42 días;

la figura 5 muestra los valores basales medios de glucosa en sangre y de insulina en plasma, la relación de glucosa basal a insulina basal (índice de sensibilidad a la insulina) y el HOMA-IS (índice de resistencia a la insulina) de los tres grupos a la edad de 121 días.

Descripción detallada de la presente invención

En esta descripción las siguientes expresiones tienen los significados asignados a continuación: “periodo de crecimiento compensatorio” significa una tasa de crecimiento más rápida que la esperada en un bebé o en un niño pequeño sano de la misma edad por referencia a datos publicados, incluyendo por lo que respecta a los bebés las tasas de crecimiento de lactantes expuestas en Acta Paediatrica, vol. 95, abril 2006, suplemento 450 “Patrones de crecimiento infantil de la OMS”.

“Periodo de restricción del crecimiento” significa una tasa de crecimiento menos rápida que la esperada en un bebé o en un niño pequeño sano de la misma edad por referencia a datos publicados, incluyendo por lo que respecta a los bebés las tasas de crecimiento de lactantes expuestas en Acta Paediatrica, vol. 95, abril 2006, suplemento 450

5 “Patrones de crecimiento infantil de la OMS”; “bebé” significa un niño de edad inferior a 12 meses; “restricción del crecimiento intrauterino” o RCIU significa cualquier limitación del crecimiento de un individuo en el útero, haciendo referencia a su edad gestacional y a su potencial de crecimiento; “contenido de proteína” significa el contenido total de material proteico, incluyendo los aminoácidos libres (en caso de haberlos); “niño joven” se refiere a un niño de edad comprendida entre 1 y 12 años.

10 La expresión “crecimiento compensatorio insano o incontrolado” significa recuperación excesiva de la grasa corporal e hiperinsulinemia excesiva, que podrían constituir mecanismos importantes en la conexión entre el crecimiento compensatorio y la susceptibilidad a una posterior obesidad y/o diabetes de tipo 2. Por el contrario, “crecimiento compensatorio sano” es un crecimiento controlado que no induce efectos perjudiciales o que disminuye el riesgo de efectos perjudiciales.

Todos los porcentajes y relaciones están expresados en peso, a no ser que se especifique de otra manera.

15 En el contexto de los productos en polvo, las referencias a la densidad energética de la composición nutricional en un número especificado de kilocalorías por litro aluden al producto reconstituido de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el mismo.

20 Preferiblemente, la composición nutricional es apta para ser consumida por bebés y niños jóvenes. La composición puede ser una fórmula nutricional completa, como por ejemplo una fórmula infantil, una fórmula de continuación o una leche de crecimiento. Como alternativa para el grupo seleccionado de bebés y niños pequeños de mayor edad la composición puede ser una bebida a base de zumos u otra bebida refrigerada o de larga duración, una sopa o alimentos infantiles, por ejemplo.

25 La composición general de una fórmula infantil para usar según la presente invención se describe a continuación mediante un ejemplo.

30 La fórmula contiene una fuente proteica que incluye proteínas de caseína bovina. Preferiblemente, al menos el 30% en peso de la fuente proteica es caseína, con mayor preferencia al menos el 40%. El resto de la fuente proteica puede ser cualquier proteína adecuada para el consumo infantil, siempre que se cumplan los mínimos requisitos del contenido de aminoácidos esenciales. Así, se pueden usar fuentes proteicas basadas en mezclas de caseína bovina y proteínas de suero de leche. En caso de usar proteínas de suero de leche, pueden ser de suero de leche ácido o de suero de leche dulce o mezclas de ambos, y pueden incluir alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualquier proporción deseada. La relación caseína : suero de leche puede estar comprendida en el intervalo de 70:30 a 30:70. Además la fuente proteica se puede suplementar con aminoácidos libres, si es necesario, para cumplir los mínimos requisitos del contenido de aminoácidos esenciales. Estos requisitos están publicados por ejemplo en la directiva 2006/141/CE de la CE.

40 Tal como se ha indicado arriba, la fuente proteica puede ser una mezcla de caseína y proteínas de suero de leche. La proteína de suero de leche puede ser un producto aislado de proteína de suero de leche, suero de leche ácido, suero de leche dulce o suero de leche dulce del cual se ha eliminado el glicomacropéptido de caseína (suero de leche dulce modificado). No obstante, la proteína de suero de leche es preferentemente un suero de leche dulce modificado. El suero de leche dulce es un producto secundario de la elaboración de queso fácilmente asequible y suele emplearse en la preparación de composiciones nutricionales basadas en leche de vaca. Sin embargo el suero de leche dulce incluye un componente indeseablemente rico en treonina y pobre en triptófano conocido como glicomacropéptido de caseína (GMPC). La eliminación del GMPC del suero de leche dulce da como resultado una proteína con un contenido de treonina más parecido al de la leche humana. En la patente EP 880902 se describe un proceso para eliminar GMPC del suero de leche dulce.

50 Si se usa suero de leche dulce modificado como proteína de suero de leche en una mezcla de 60% de suero de leche y 40% de caseína, la fuente proteica se puede suplementar con triptófano, isoleucina, histidina y fenilalanina libres en proporciones de hasta el 0,34% de triptófano, 0,92% de isoleucina, 0,19% de histidina y 2,2% de fenilalanina (en cada caso como porcentaje en peso del contenido total de proteína). Si se usa suero de leche dulce intacto como proteína de suero de leche en una mezcla de 60% de suero de leche y 40% de caseína, la fuente proteica se puede suplementar con triptófano, leucina, histidina y fenilalanina libres en proporciones de hasta el 0,5% de triptófano, 0,37% de leucina, 0,3% de histidina y 2,5% de fenilalanina (en cada caso como porcentaje en peso del contenido total de proteína). Si se desea, la fuente proteica también puede suplementarse con aminoácidos ricos en azufre, tales cisteína y metionina.

60 Las proteínas pueden ser intactas o hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas, aunque se prefieren las proteínas intactas. El contenido de proteína de la fórmula infantil puede ser inferior a 2,2 g/100 kcal, preferiblemente entre 1,6 y 2,0 g/100 kcal.

65 Una fórmula infantil para usar según la presente invención contiene una fuente de hidratos de carbono. Se puede usar cualquiera de las fuentes de hidratos de carbono presentes convencionalmente en las fórmulas infantiles, tales como lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón y sus mezclas, aunque la fuente preferida de hidratos de carbono es

la lactosa. El contenido de hidratos de carbono de la fórmula infantil está comprendido preferiblemente entre 9 y 14 g/100 kcal.

5 Una fórmula infantil para usar según la presente invención contiene una fuente de lípidos. La fuente de lípidos puede ser cualquier lípido o grasa apropiado para utilizar en fórmulas infantiles. Las fuentes adecuadas de grasa incluyen oleína de palma, aceite de girasol rico en ácido oleico, aceite de linaza y aceite de cártamo rico en ácido oleico, aunque es preferible una combinación de aceite de linaza y aceite de cártamo rico en ácido oleico, proporciones pequeñas de aceites que llevan grandes cantidades de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico preformados, como los aceites de pescado o los aceites microbianos. En total el contenido de lípidos puede estar comprendido entre 4,4 y 6 g/100 kcal. La relación de ácido linoleico (C18:2n-6) : ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n-3) en la fuente de lípidos es preferiblemente menor que 7:1 y con mayor preferencia está comprendida entre 7:1 y 5:1.

15 La fórmula infantil también contendrá todas las vitaminas y minerales que se consideran esenciales para la dieta diaria en proporciones nutricionalmente significativas. Se han establecido unos mínimos requerimientos para ciertas vitaminas y minerales. Como ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes opcionalmente presentes en la fórmula infantil cabe citar vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, cinc, manganeso, cloruro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Los minerales se añaden usualmente en forma salina. La presencia de minerales específicos y de otras vitaminas y sus proporciones variará en función de la población infantil elegida.

Si es necesario la fórmula infantil puede contener emulsionantes y estabilizantes tales como lecitina de soja, ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos, y similares.

25 La fórmula infantil puede llevar opcionalmente otras sustancias de probable efecto beneficioso tales como bacterias probióticas de ácido láctico, oligosacáridos prebióticos, lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos y similares.

30 La fórmula se puede preparar de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, se puede preparar mezclando la proteína, la fuente de carbohidratos y la fuente de grasa en proporciones apropiadas. En caso de usarse, los emulsionantes se pueden incorporar en este momento. Las vitaminas y los minerales también se pueden añadir en este momento, pero suelen incorporarse más tarde para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina lipófila, los emulsionantes y sustancias similares se pueden disolver en la fuente de lípidos antes de mezclar. Luego se puede agregar agua para formar una mezcla líquida, preferiblemente agua que haya sido sometida a ósmosis inversa. Es conveniente que la temperatura del agua sea de unos 50°C hasta 80°C para ayudar a dispersar los ingredientes. Para formar la mezcla líquida se pueden usar licuefactores comercialmente disponibles. Después la mezcla líquida se homogeniza, por ejemplo en dos etapas.

40 Luego la mezcla líquida se puede tratar térmicamente para reducir la carga bacteriana, calentando la mezcla líquida a una temperatura comprendida aproximadamente en el intervalo de 80°C a 150°C durante unos 5 segundos hasta unos 5 minutos, por ejemplo, lo cual se puede llevar a cabo por inyección de vapor, por esterilización en autoclave o por intercambio de calor, por ejemplo en un intercambiador de calor de placas.

45 Después la mezcla líquida se puede enfriar a unos 60°C hasta 85°C, por ejemplo mediante enfriamiento instantáneo. Luego la mezcla líquida se puede homogenizar de nuevo; por ejemplo en dos etapas, a unos 10 MPa hasta 30 MPa en la primera etapa y a unos 2 MPa hasta 10 MPa en la segunda etapa. A continuación la mezcla homogenizada se puede seguir enfriando para proteger cualquier componente termosensible como las vitaminas y minerales. En este punto se ajusta convenientemente el pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogenizada.

50 La mezcla homogenizada se transfiere a un aparato de secado adecuado tal como un secador por pulverización o un liofilizador y se convierte en polvo. El polvo de debería tener un contenido de humedad inferior al 5% en peso aproximadamente.

55 Si se prefiere un producto líquido, la mezcla homogenizada se puede esterilizar y luego envasar asépticamente en recipientes adecuados o bien envasarla primero en los recipientes y luego autoclavarlos.

A continuación la presente invención se ilustra más detalladamente haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

**Ejemplo 1**

60 Seguidamente se indica un ejemplo de la composición de una fórmula infantil para usar según la presente invención:

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	630
Proteína (g) (leche descremada en polvo, suero de leche dulce modificado)	1,5	9,45
fenilalanina libre (mg)	30	189

ES 2 570 461 T3

isoleucina libre (mg)	13,5	85
triptófano libre (mg)	4,9	30,9
histidina libre (mg)	2,5	15,8
relación caseína:suero de leche	40:60	40:60
Grasa (g)	5,3	33,4
Ácido linoleico (g)	0,7	4,4
Ácido $\alpha$ -linolénico	106	668
DHA (mg)	11,5	72,5
ARA (mg)	11,5	72,5
Ácido linoleico:ácido $\alpha$ -linolénico	6,5	6,5
Lactosa (g)	11,6	73,1
Minerales y electrolitos		
Na (mg)	25	158
K (mg)	89	561
Cl (mg)	64	403
Ca (mg)	64	403
P (mg)	32	202
Ca/P	2,0	2,0
Mg (mg)	6,9	43,5
Mn ( $\mu$ g)	8,0	50,4
Vitaminas y oligoelementos		
Vitamina A (UI)	350	2205
Vitamina D (UI)	60	378
Vitamina E (UI)	1,2	7,6
Vitamina K ( $\mu$ g)	8,0	50,4
Vitamina C (mg)	10	63
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,44
Vitamina B2 (mg)	0,15	0,95
Niacina (mg)	1,0	6,3
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,47
Ácido fólico ( $\mu$ g)	12	75,6
Ácido pantoténico (mg)	0,45	2,83
Vitamina B12 ( $\mu$ g)	0,3	1,89
Biotina ( $\mu$ g)	2,2	13,9
Colina (mg)	10	63
Inositol (mg)	5,0	31,5
Taurina (mg)	7,0	44,1
Carnitina (mg)	1,6	10,1
Fe (mg)	1,2	7,56
I ( $\mu$ g)	15	94,5
Cu (mg)	0,07	0,44
Se ( $\mu$ g)	2,0	12,6
Zn (mg)	0,75	4,72
Nucleótidos		
CMP (mg)	2,3	14,5
UMP (mg)	1,5	9,5
AMP (mg)	0,7	4,4
GMP (mg)	0,3	1,9
Probióticos		
<i>B. lactis</i> CNCM 1-3446	2 x 10 <sup>7</sup> ufc/g de polvo	
<i>L. rhamnosus</i> CGMCC 1.3724	2 x 10 <sup>7</sup> ufc/g de polvo	

Esta composición nutricional se puede administrar a un niño durante un periodo de crecimiento compensatorio tras un periodo de crecimiento limitado, como única fuente de nutrición, desde el nacimiento hasta la edad de seis meses y luego como parte de una dieta mixta durante la introducción de alimentos sólidos, hasta el destete completo hacia la edad de 12 meses aproximadamente.

5

### Ejemplo 2

Este ejemplo estudia el efecto del tipo de proteína en la composición corporal y en la sensibilidad a la insulina, utilizando un modelo de semiinanición-realimentación en ratas.

10

*Animales y dietas*

Todas las ratas se obtuvieron de Elevag Janvier (Francia), se enjaularon individualmente en un recinto con la temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y un ciclo luz/oscuridad de 12 h, y se mantuvieron con una dieta convencional de comida (Kliba, Cossonay, Suiza) consistente en 24% de proteína, 66% de hidratos de carbono y 10% de grasa por energía, y tuvieron acceso libre a agua corriente. Se dividieron en 3 grupos ( $n = 6-8$ ) unas ratas Sprague-Dawley macho de 6 semanas de edad y similar peso medio corporal y se les restringió la alimentación durante un periodo de 2 semanas, en el cual recibieron diariamente una ración fija de comida que correspondía aproximadamente al 50% de su ingesta diaria de alimento *ad libitum* espontánea. Tras esta fase de semiinaniación, durante la cual se detuvo prácticamente el crecimiento, los animales fueron realimentados durante 2 semanas según las dietas de ensayo indicadas en la siguiente tabla 1. Cada grupo de ratas recibió una dieta con un componente proteico diferente – en la dieta del grupo 1 la proteína fue caseína bovina, en la dieta del grupo 2 la proteína fue suero de leche bovina y en la dieta del grupo 3 la proteína fue suero de leche bovina en una estructura micelar. Todas las dietas de ensayo se prepararon en unas cantidades isocalóricas (90 kcal diarias por rata) correspondientes a la ingesta media de energía metabolizable de las ratas Sprague-Dawley macho creciendo espontáneamente en su margen de peso (220-350 g) bajo condiciones de laboratorio. Todas las dietas se prepararon en forma de pasta en recipientes de plástico fijados a las jaulas de las ratas, ya que este modo de suministrar la dieta evita derrames.

*Determinación de la composición corporal*

Tras el sacrificio por decapitación se practicaron incisiones en el cráneo, en el tórax y en la cavidad abdominal y el intestino se limpió de comida no digerida. Luego las carcasas enteras se secaron hasta un peso constante en un horno mantenido a  $70^\circ\text{C}$  y a continuación se homogeneizaron. Se analizaron muestras por duplicado de la carcasa homogeneizada para determinar el contenido de grasa por el método de extracción Soxhlet. El agua del cuerpo se calculó por diferencia entre el peso final del cuerpo y el peso de la carcasa seca, mientras que la masa corporal magra se determinó por diferencia entre el peso de la carcasa seca y la grasa de la carcasa.

*Ensayo de tolerancia a la glucosa*

Al día 14 de la realimentación se efectuaron ensayos de tolerancia a la glucosa según el protocolo descrito con anterioridad (Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG. "A role for suppressed thermogenesis favouring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth" [*La termogénesis suprimida favorece el aumento de la grasa, su papel en la patofisiología del crecimiento compensatorio*] Diabetes 52, 1090-1097 (2003)). La comida se retiró por la mañana temprano (7 a 8:00 A.M.) y unas 6 h más tarde (alrededor de las 13-14h) se extrajo sangre de la vena caudal e inmediatamente se puso una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg de peso corporal). Durante el siguiente periodo de 2 h se tomaron muestras de sangre (de unos 0,5 ml) por la vena caudal a intervalos de 30 minutos y se pusieron sobre hielo. Luego se centrifugaron las muestras de sangre y el plasma se congeló y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  para las posteriores pruebas de insulina (por ELISA, Crystal Chem) y de glucosa (utilizando un analizador de glucosa Beckman).

*Estadísticas*

Todos los datos están presentados como promedios y error estándar (ES). Los datos de la composición corporal se examinaron por análisis de la varianza de un factor, seguido de ensayos de comparación post-hoc; Los valores de  $p$  inferiores a 0,5 se tomaron como nivel de significación estadística de los resultados. Los datos de glucosa e insulina en plasma durante el ensayo de tolerancia a la glucosa se analizaron por ANOVA de 2 factores, tomando la dieta como un factor y el tiempo como el otro factor.

Tabla 1

COMPOSICIÓN DE LA DIETA (EN PESO)	%
PROTEÍNA	30-31
MEZCLA DE MINERALES AIN 93M	4,5
MEZCLA VITAMÍNICA AIN 93VX	1,3
T-BHQ	0,08
BITARTRATO DE COLINA	0,25
CELULOSA	6,5
AZÚCAR EN POLVO	10
ALMIDÓN DE MAÍZ	19,4-20,5
ACEITE DE MAÍZ	13
ACEITE DE SOJA	13,5

No se observó ninguna diferencia de peso o composición corporal entre los tres grupos. Sin embargo el examen de los datos procedentes de los ensayos de tolerancia a la glucosa revelaron que el grupo realimentado con la dieta de caseína (grupo 1) tenía una respuesta de glucosa en plasma significativamente menor que los grupos realimentados con la proteína dietética derivada del suero de leche o de micelas de suero de leche (figura 1). Además, aunque no

se observó ninguna diferencia estadística de insulina en plasma entre los tres grupos, el grupo 1 mostró un perfil de insulina en plasma inferior (figura 2). Estos datos, tomados en conjunto, sugieren que la dieta de caseína puede mejorar la sensibilidad a la insulina durante la realimentación, aun sin tener un impacto en la composición corporal.

5 **Ejemplo 3**

Este ejemplo investiga el efecto del tipo de proteína en el crecimiento, en la tolerancia a la glucosa, en la glucemia basal posterior, en la insulinemia y en la sensibilidad a la insulina (valorada mediante la relación de glucosa basal a insulina basal) en un modelo de restricción del crecimiento intrauterino en ratas.

10

*Animales y dietas*

Se adquirieron 27 ratas gestantes y 6 ratas vírgenes de Charles River (France). Después de llegar, los animales se enjaularon individualmente en un recinto a 25°C con 55% de humedad relativa y un ciclo luz/oscuridad de 12 h y tuvieron libre acceso a agua y a una dieta de comida comercial de ratas (Kliba 3434; Provimi, CH-4303 Kaiseraugst, Suiza). Tras 10 días de gestación los animales gestantes se dividieron aleatoriamente en dos grupos de similar peso corporal. Un grupo continuó teniendo acceso libre a la comida (grupo no RCIU, n = 7) y el otro grupo se expuso a la RCIU por limitación de la comida al 50% (respecto a las ratas no gestantes), desde el día 11 de gestación hasta el nacimiento (grupo RCIU, n = 20).

20

Dentro de las 24 h siguientes al nacimiento se registró el peso corporal de las crías y el número de crías se limitó a 8 en cada camada. Las crías mamaron leche de su propia madre hasta la edad de 21 días.

25

A la edad de 21 días las crías RCIU macho se dividieron aleatoriamente en dos grupos (RCIU caseína y RCIU suero de leche, n = 20/grupo) de peso corporal y origen materno similares (igual número de crías de cada camada en cada grupo). Todos los animales (de los grupos RCIU y no RCIU) se enjaularon individualmente y se alimentaron durante 4 semanas con sus respectivas dietas, como se indica a continuación. (Fase I del estudio).

30

- Grupo no RCIU: dieta de comida (Kliba 3437)
- RCIU caseína: dieta semisintética con caseína (tabla 2)
- RCIU suero de leche: dieta semisintética con suero de leche (tabla 2)

Tabla 2

PRODUCTOS	Caseína g/100 g	Suero de leche g/100 g
Almidón de maíz	53	53
Caseína	20	
Suero de leche		20,3
Sacarosa	10	10
Aceite de soja	7	7
Celulosa	5	5
Min. Mix AIN93 G*	3,5	3,5
Vit. Mix AIN93	1,0	1,0
L-cistina	0,3	
Bitartrato de colina	0,25	0,25
Terc-butilhidroquinona	0,014	0,014
Total (peso húmedo)	100	100
kcal/100 de dieta	365,0	365,0
% de energía		
Proteína	20	20
CHO	64	64
Grasa	16	16

35

Durante el seguimiento (fase II: 47-120 días de edad) todos los grupos recibieron una dieta comercial con bajo contenido de grasa (Kliba 3437, 10% de la energía procedente de la grasa).

40

El peso corporal y la ingesta de alimento de los animales se midieron al menos 2 veces por semana a lo largo del estudio. La composición corporal (grasa corporal, masa magra y contenido de agua corporal) se midió a los 42 y 119 días por resonancia magnética nuclear (EchoMRI TM 2004, Echo Medical Systems, Houston, USA).

*Ensayo de tolerancia a la glucosa*

45

A la edad de 47 días se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ETGIP) 6 h después de la hora de privación de la comida (a las 13.30 pm desde las 7.30 am). En 10 minutos se tomaron dos muestras de sangre como referencia por la vena caudal y luego se administró mediante inyección intraperitoneal una solución de glucosa

con una dosis de 2 g de glucosa/kg de peso corporal. Se tomaron seis muestras más de sangre por la vena caudal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos de la administración de la glucosa. La glucosa en las muestras de sangre se midió con un glucómetro (Bayer, Ascensia ELITE XL, IN 46544, USA). Se centrifugaron las muestras de sangre y el plasma se congeló y se conservó a  $-40^{\circ}\text{C}$  para analizar después la insulina por un método ELISA, utilizando un kit de Crystal Chem.Inc (II,USA).

Asimismo se determinó la glucemia y la insulinemia basal tomando una muestra de sangre por la vena caudal a la edad de 119-120 días. La relación de glucosa basal a insulina basal se calculó como índice de la sensibilidad a la insulina.

## 10 *Resultados*

El peso corporal de las crías RCIU con caseína fue significativamente mayor que el de las crías RCIU con suero de leche (y más parecido al del grupo de control no RCIU) desde la edad de 21 días hasta la edad de 90 días, pero no por más tiempo (figura 3C). Las composiciones corporales de todos los grupos fueron similares durante la fase I y la fase II.

Como puede verse en la figura 3A, el peso al nacer del grupo de la comida restringida fue un 15% inferior al del grupo no restringido ( $p < 0,001$ ), lo cual confirma que la RCIU ha sido inducida con éxito por la restricción prenatal de comida, tanto en el grupo de caseína como en el de suero de leche. Todas las crías de los grupos de madres con RCIU tuvieron un crecimiento acelerado o compensatorio durante el periodo de lactancia y el peso corporal de todos los grupos fue similar al final del periodo de lactancia (figura 3B).

Ambos grupos RCIU tuvieron una mayor respuesta de glucosa en el ETGIP (en comparación con los grupos no RCIU) (figura 4), pero sin diferencias significativas en la respuesta de insulina al final de la intervención dietética (edad de 42 días). Así, como era de esperar, los dos grupos RCIU con rápido crecimiento compensatorio tuvieron una menor sensibilidad a la insulina en comparación con los grupos no RCIU.

No obstante, la figura 4 también muestra que la respuesta de glucosa al ETGIP (área bajo la curva 2-h) fue bastante menor en el grupo alimentado con caseína, respecto al alimentado con la dieta de suero de leche ( $p < 0,05$ ). Este efecto beneficioso de la dieta de caseína sobre la tolerancia a la glucosa va acompañado de un ligero aunque no importante incremento de la respuesta de insulina ( $p > 0,05$ ). De manera más importante, la figura 5 muestra que a la edad de 121 días – cuando todos los grupos estaban tomando la misma dieta – el grupo previamente alimentado con la dieta a base de caseína tuvo unos niveles basales de glucemia en sangre (fig. 5A) y de insulinemia en plasma (fig. 5B) significativamente menores en comparación con el grupo que había sido alimentado con la dieta a base de suero de leche ( $p < 0,05$  en ambos casos). El HOMA IR (fig. 5D), el índice de resistencia a la insulina, también fue significativamente menor en los animales RCIU que habían sido alimentados con la dieta de caseína, comparado con el de aquellos que habían sido alimentados con la dieta de suero de leche. Además la relación de glucosa basal a insulina basal (fig. 5C), el índice de sensibilidad a la insulina, fue significativamente mayor en los animales RCIU que habían sido alimentados con la dieta de caseína, en comparación con aquellos que habían sido alimentados con la dieta de suero de leche.

Estos datos confirman el efecto beneficioso que la alimentación con una dieta proteica a base de caseína tiene para la tolerancia a la glucosa (beneficio a corto plazo), los posteriores niveles basales de glucemia e insulinemia y la sensibilidad a la insulina durante y tras el periodo de crecimiento compensatorio.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una fuente proteica que lleva proteínas de caseína en la preparación de una composición nutricional para un bebé o un niño pequeño que atraviesa un periodo de crecimiento compensatorio después de un periodo de restricción del crecimiento, durante o tras dicho periodo de crecimiento compensatorio, a fin de reducir el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina o diabetes de tipo 2 en la vida posterior del bebé o un niño pequeño.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 para mejorar el crecimiento a temprana edad y reducir el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina o diabetes de tipo 2 en la vida posterior del bebé o un niño pequeño.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en que la caseína bovina proporciona entre el 40 y el 100% en peso de la fuente proteica.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el bebé es prematuro o ha sufrido un retraso del crecimiento intrauterino.
- 25 5. Uso según la reivindicación 4, en que la fuente proteica comprende tanto caseína como proteínas de suero de leche y la relación caseína:suero de leche está comprendida en el intervalo de 70:30 a 30:70.
- 30 6. Uso según la reivindicación 5, en que la proteína de suero de leche es suero de leche dulce del cual se ha eliminado el caseíno-glicomacropéptido y la composición incluye adicionalmente fenilalanina libre en una proporción de hasta el 2,2%, isoleucina libre en una proporción de hasta el 0,92%, triptófano libre en una proporción de hasta el 0,34% e histidina libre en una proporción de hasta el 0,19%, referida en cada caso al peso del contenido total de proteína.
- 35 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en que la densidad energética de la composición está comprendida entre 620 y 640 kcal/litro.
- 40 8. Uso según cualquier reivindicación anterior, en que la(s) proteína(s) están intactas.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en que la composición nutricional comprende además lactosa.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en que la composición nutricional comprende además una fuente de lípidos, incluyendo ácido linoleico (C18:2n-6) y ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n-3), de modo que la relación ácido linoleico:ácido  $\alpha$ -linolénico está comprendida entre 7:1 y 5:1.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la composición es una fórmula infantil y tiene un contenido de proteína comprendido entre 1,6 y 2,0 g/100 kcal.

Figura 1

\*:  $P < 0,02$  (caseína frente a suero de leche y micelas de suero de leche)

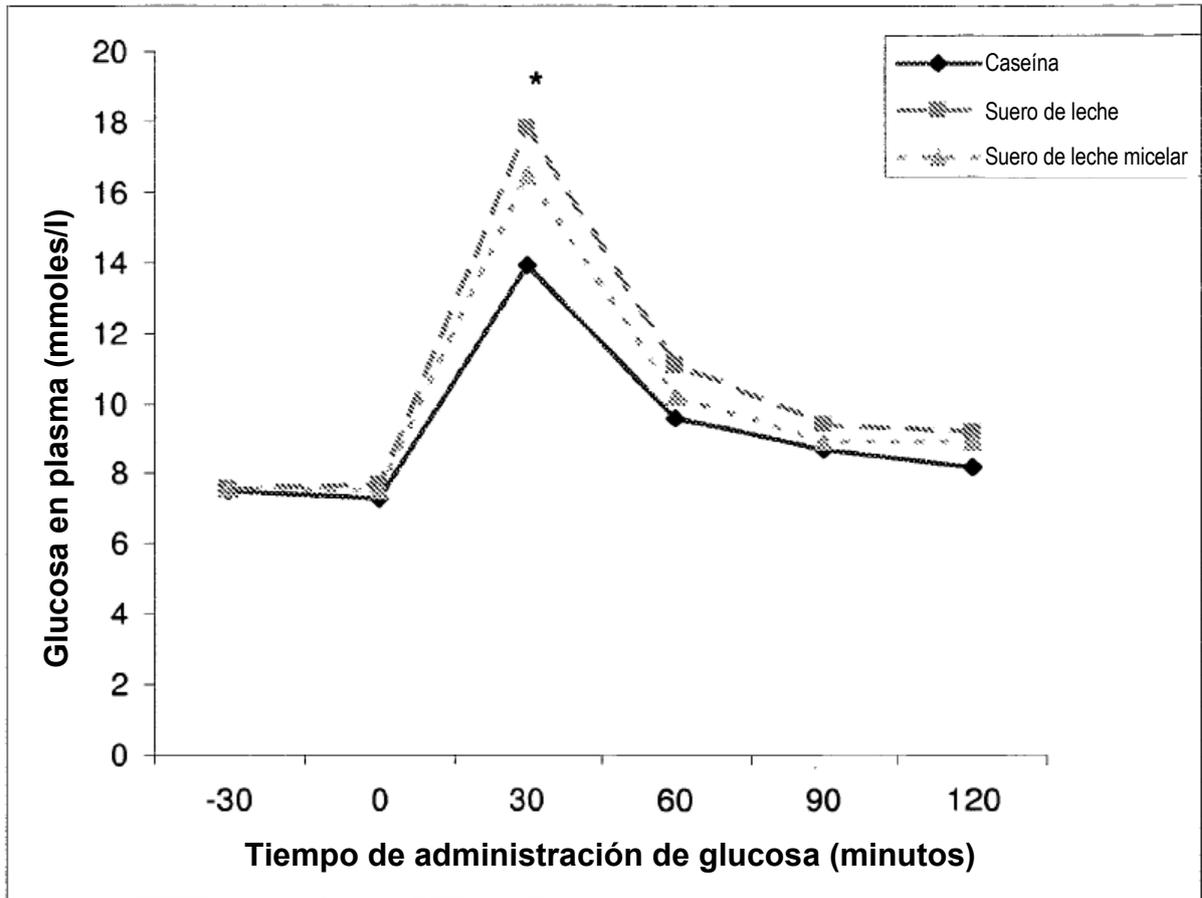


Figura 2

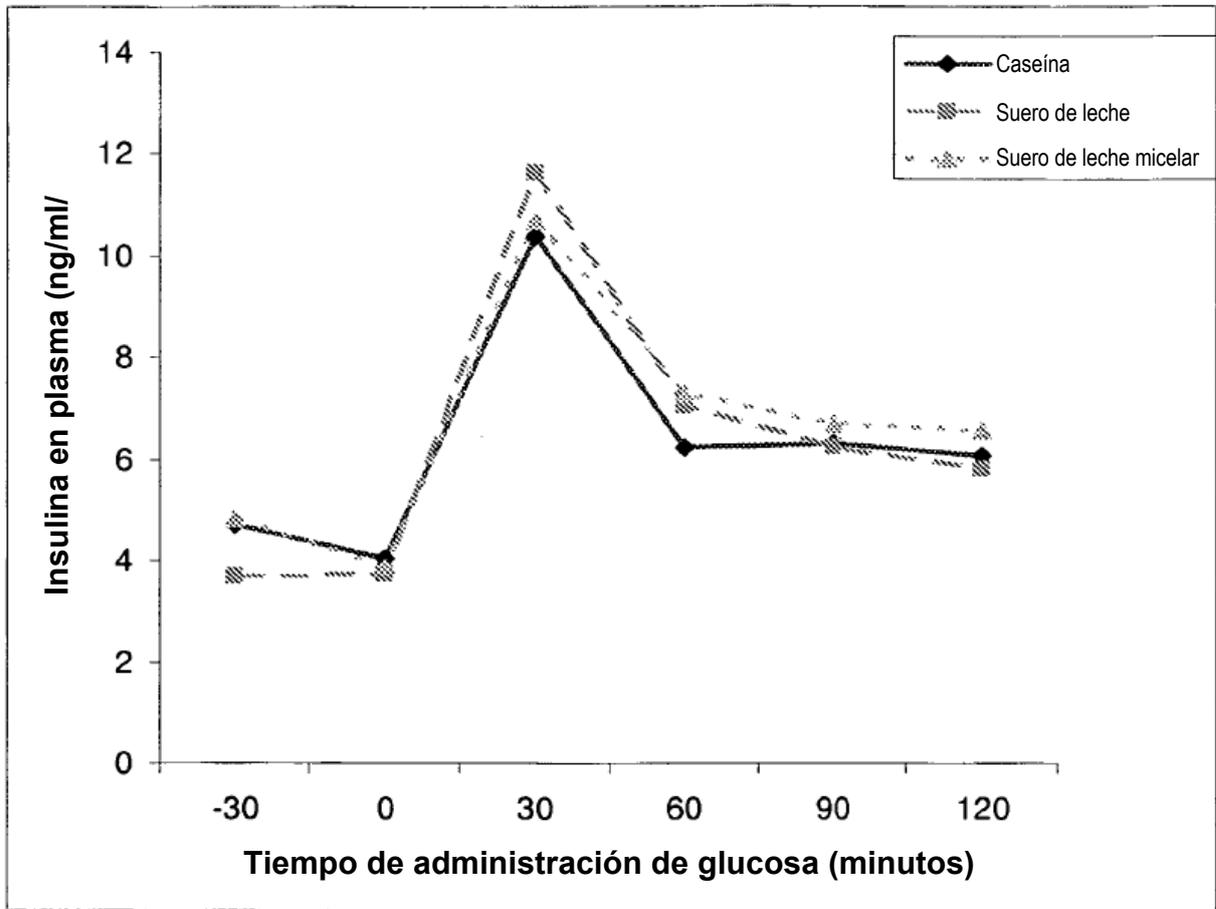
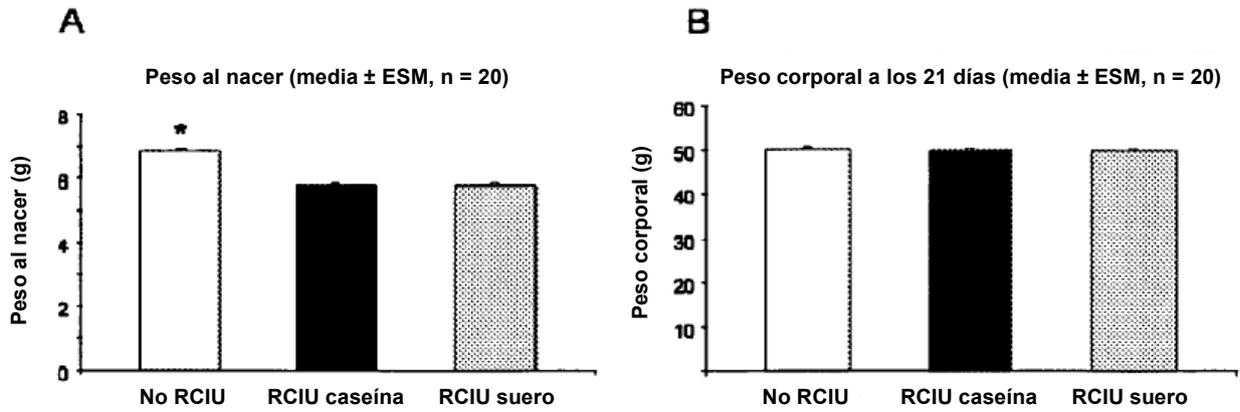
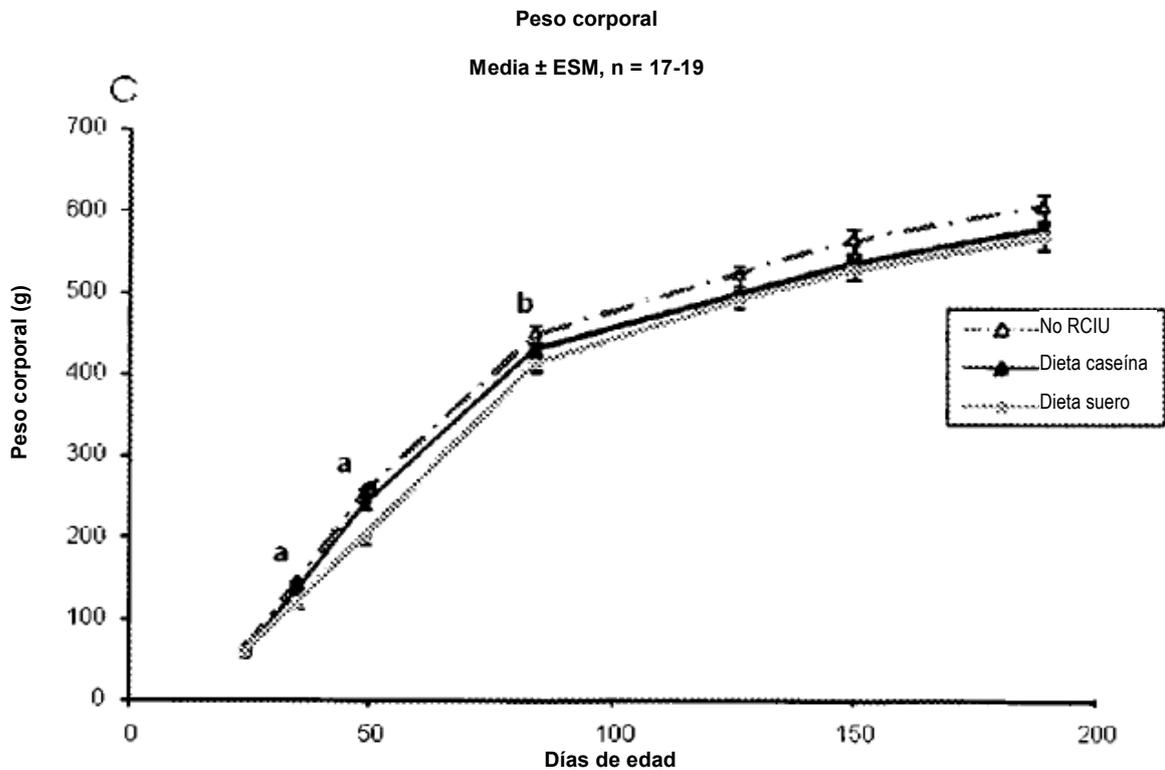


Figura 3

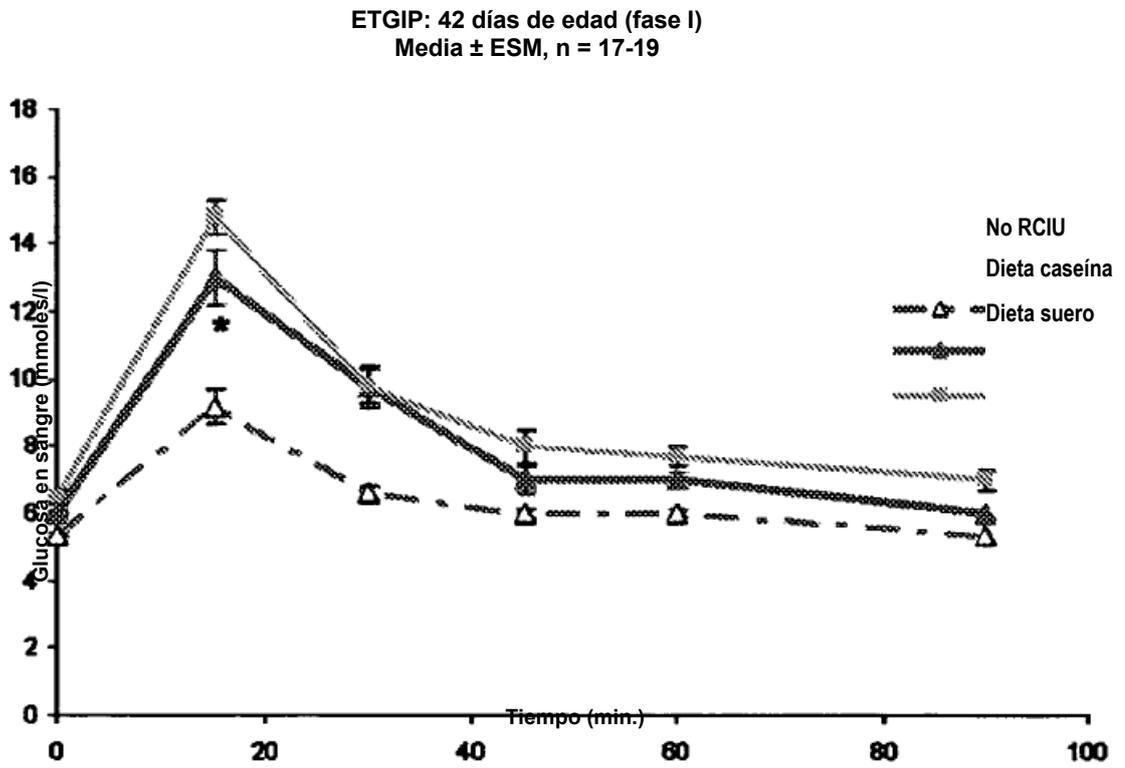


\* p < 0,01 entre los grupos RCIU y no RCIU (ANOVA)



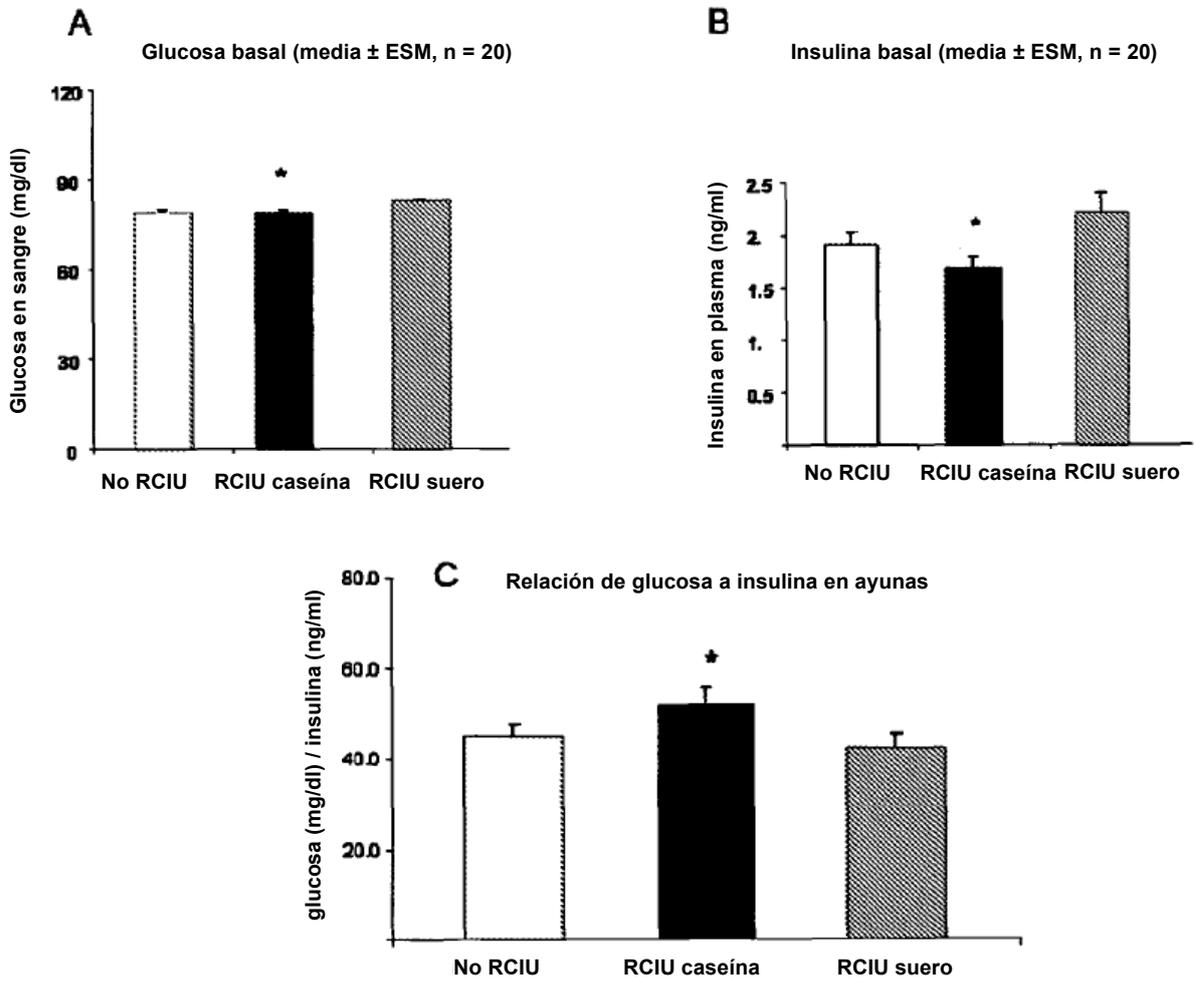
a: P < 0,0001 dieta de caseína frente a dieta de suero de leche  
b: P = 0,07 dieta de caseína frente a dieta de suero de leche

Figura 4



\*  $p \leq 0,05$  para ABC de glucosa 2-h entre los grupos de RCIU caseína y RCIU suero de leche (prueba t)

Figura 5



\*  $p \leq 0,05$  entre los grupos de RCIU caseína y RCIU suero de leche (prueba t)

