

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 570**

51 Int. Cl.:

A23L 33/00 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2012 PCT/US2012/051519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055444**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2012 E 12753327 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2765871**

54 Título: **Composición y método de fitonutrientes para efectos de programación metabólica**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201113273652

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

29.11.2017

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
225 North Canal Street 25th Floor
Chicago, Illinois 60606, US**

72 Inventor/es:

**JOUNI, ZEINA,;
HANLEY, BRYAN, y
CASSIDY, AEDIN,**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 644 570 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y método de fitonutrientes para efectos de programación metabólica

5 Campo de la invención

Esta divulgación se refiere a métodos de promover la expresión del gen de la enzima fase II en sujetos pediátricos, el método comprende administrar a un sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un fitonutriente. La presente divulgación también se refiere a composiciones nutricionales a base de leche para uso en expresión de gen de enzima fase II en sujetos pediátricos. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a composiciones nutricionales para sujetos pediátricos, especialmente formulas infantiles y leches de crecimiento, dichos productos que comprenden fitonutrientes, tal como polifenoles, isotiocianatos, carotenoides, y mezclas de los mismos. Las composiciones son capaces de promover la expresión del gen de la enzima fase II en los sujetos. La descripción también se refiere a suplementos nutricionales para mujeres embarazadas o lactantes, los suplementos comprenden los fitonutrientes mencionados anteriormente. Los suplementos son capaces de promover la expresión de gen de enzima fase II en infantes prenatales de mujeres embarazadas o en los niños lactantes de mujeres en periodo de lactancia.

20 Antecedentes de la invención

Los fitonutrientes, tal como polifenoles, carotenoides e isotiocianatos, son compuestos bioactivos derivados de plantas que se han asociado con diversos beneficios para la salud en adultos, incluyendo actividad antioxidante, salud cardiovascular mejorada, anti-inflamación, anti-vejecimiento, y beneficios neurológicos. Por ejemplo, los fitonutrientes se cree que proporcionan importantes beneficios para la salud de los seres humanos, que incluye protección contra el estrés oxidativo, inflamación, y muchas enfermedades crónicas y degenerativas.

Por ejemplo, polifenoles, tal como flavonoides, flavonoles, flavonas, isoflavonas antocianinas y proantocianidinas, han demostrado actividad antioxidante y antiinflamatoria consistente con la promoción de la salud vascular, salud ósea y función cognitiva. Del mismo modo, los carotenoides son conocidos por sus beneficios para la salud, en particular beneficios para la salud ocular. Determinados carotenoides, como la luteína, zeaxantina y licopeno también están siendo investigados por los beneficios adicionales para la salud, que incluye actividad antioxidante, protección cardiovascular y salud dérmica y ocular. Por otra parte, los isotiocianatos, que se encuentran en los vegetales crucíferos, son conocidos por tener actividad anticáncer, antidiabética y antimicrobiana.

Adicionalmente, los fitonutrientes están presentes en la leche humana en diversos grados. Por ejemplo, el contenido de carotenoides de la leche humana ha sido objeto de muchos estudios con la conclusión general de que el contenido de la leche humana sigue siendo proporcional a la dieta de la madre y se correlaciona bien con los niveles de carotenoides en plasma. Por lo tanto, los infantes alimentados con leche humana están expuestos rutinariamente a fitonutrientes.

Aunque los mecanismos subyacentes a los potenciales beneficios de la salud siguen sin estar claros, se considera que los fitoquímicos que poseen efectos antiinflamatorios, actúan como moléculas de señalización celular, detienen el ciclo celular, y manipulan la desintoxicación de las enzimas fase I y fase II. Las enzimas de fase I incluyen enzimas citocromo responsables de la actividad oxidasa de función mixta, mientras que las enzimas de fase II están implicadas con frecuencia en reacciones de conjugación necesarias para el metabolismo de fármacos o adicionalmente el metabolismo de productos de la enzima fase I. Por lo menos 10 familias de enzimas Fase I han sido descritas en los seres humanos. Las enzimas de metabolismo Fase II tal como transferasas glutatióna (GST), UDP-glucuronosiltransferasas (UGT), sulfotransferasas, N- & O-metil transferasas, y NAD(P)H: oxidoreductasa de quinona 1 (NQO1) permiten el metabolismo y la posible excreción de sustancias potencialmente nocivas (xenobióticos) en adultos. Las reacciones de conjugación Fase II generalmente siguen la activación de la Fase I, transforman sustancias nocivas en compuestos solubles en agua que pueden ser excretados por la orina o la bilis. Diversos tipos de reacciones de conjugación están presentes en el cuerpo, incluyendo glucouronidación y sulfatación. Antes de la presente divulgación, no había sugerencia de que fitoquímicos dietéticos pueden modular la expresión de estas enzimas de fase II en diferentes etapas de desarrollo en sujetos pediátricos, tal como niños y lactantes, para proporcionar efectos de programación metabólica.

Penn DA ("efectos de los fitoquímicos quercetina y genisteína en actividades de enzima fase I y fase II"; Master of Science Thesis) está dirigido a la investigación de la función potencial de fitonutrientes con respecto a cáncer y describe que la quercetina y genisteína incrementan la actividad de enzima fase II. Surh YJ (Nat Rev Cancer. 2003;3(10):768-80) se dirige a efectos quimioprotectores contra el cáncer de quimiopreventivos dietarios y describe que se ha mostrado que una serie de fitoquímicos induce la expresión de enzimas fase II a través de NFR2. Premier R (Asia Pacific J Clin Nutr. 2002;11(S6):S197-201) describe métodos para aumentar la concentración de fitonutrientes en determinados productos de alimentos vegetales. Se describe que los isotiocianatos presentes en vegetales crucíferos como precursores de glucosinilato han mostrado que tienen una actividad de inductor de enzimas fase II.

La programación metabólica (impresión) ha ganado amplia aceptación en las últimas dos décadas, pero muchos de los estudios se han concentrado en eventos metabólicos principales que conducen a la obesidad más adelante, y otros trastornos metabólicos. El efecto potencial de la exposición temprana a los componentes de dieta de los fitoquímicos se ha estudiado relativamente poco.

5 A pesar de los beneficios para la salud del consumo de frutas y vegetales, los niveles dietéticos de fitonutrientes en los adultos y los niños son frecuentemente sub-óptimos. Los lactantes no han sido expuestos con la mayoría de los compuestos bioactivos de plantas hasta que se dejan de amamantar, cuando se introducen los alimentos no lácteos. Pero, el cuerpo del lactante tiene que ser capaz de expresar las enzimas de metabolismo fase II para evitar la
10 acumulación de toxinas potenciales. De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de optimizar la nutrición de pacientes pediátricos, como lactantes y/o niños, en una etapa temprana de desarrollo a través de la inclusión de fitonutrientes en la dieta de los lactantes, niños y/o mujeres embarazadas y lactantes para lograr efectos protectores contra sustancias nocivas.

15 Breve descripción de la invención

En una realización, la presente divulgación se dirige a un método no terapéutico de promoción de expresión de gen de enzima fase II en un sujeto pediátrico, que comprende administrar al sujeto un componente nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11. En otra realización, la presente
20 divulgación se dirige a un método no terapéutico de promoción de la expresión de gen de enzima fase II en un lactante que se alimenta de una mujer lactante, que comprende administrar a la mujer lactante una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y alimentar el lactante con leche humana de la mujer lactante. En otra divulgación, la presente divulgación se dirige a un método para promover la expresión de gen de enzima de fase II en un feto, que comprende administrar a una mujer embarazada con un feto una cantidad efectiva de una composición nutricional que tiene una composición como se
25 define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11. En una realización, los métodos mencionados anteriormente promueven adicionalmente y/o modulan la expresión de proteína de enzima fase II en un sujeto.

En una realización, la presente divulgación se dirige a una composición nutricional a base de leche, para uso en promover expresión de gen de enzima fase II en un sujeto pediátrico, que comprende una fuente de grasa, una
30 fuente de carbohidratos, una fuente de proteínas y una fuente de fitonutrientes, que comprende un polifenol, un isotiocianato un carotenoide o una mezcla de los mismos en el que la composición comprende 50 a 1300 nmol/L de la fuente de fitonutrientes. En otra realización, las composiciones nutricionales a base de leche son capaces adicionalmente de promover la expresión de proteína de la enzima fase II en un sujeto. La fuente de fitonutrientes
35 puede comprender un polifenol, un isotiocianato, un carotenoide o una mezcla de los mismos. La composición nutricional puede comprender adicionalmente, entre otros ingredientes, una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, por lo menos un prebiótico, una fuente de β -glucano, por lo menos un probiótico, una cantidad de colina, una fuente de hierro, o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se dirige a un suplemento nutricional para una mujer lactante o embarazada, el suplemento comprende una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el suplemento es capaz de promover la expresión de gen de
40 enzima fase II en un feto de la mujer embarazada o en un lactante de la mujer lactante. En una realización, el suplemento promueve adicionalmente la expresión de proteína de enzima fase II. La fuente de fitonutrientes puede comprender un polifenol, un isotiocianato, un carotenoide o una mezcla de los mismos.
45

Se debe entender que tanto la descripción general anterior y las siguientes realizaciones de la presente descripción detallada están destinadas a proporcionar una visión general o marco para entender la naturaleza y carácter de la divulgación como se reivindica. La descripción sirve para explicar los principios y operaciones de la materia objeto
50 reivindicada. Otras características y ventajas de la presente divulgación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica luego de la lectura de la siguiente divulgación.

Breve descripción de las figuras

55 Figuras 1A-C: Viabilidad celular en modelos celulares de 1 mes de edad (A), 2 años de edad (B) y un adulto (C) después de los tratamientos fitoquímicos. Las figuras 1A-C representan la viabilidad celular en sujetos de diferentes edades después del tratamiento fitoquímico. Más específicamente, la figura 1A representa la viabilidad celular en un modelo de célula de 1 mes de edad (figura 1A), la figura 1B representa la viabilidad celular en un modelo de célula de 2 años (figura 1B), y la figura 1C representa la viabilidad celular en un modelo de célula de adulto (figura 1C) en la presencia de sulforafano (◆), catequina (■) y quercetina (▲) en comparación con las células de control. Después
60 de tratamiento con sulforafano, se observa pérdida significativa de viabilidad celular en modelo celular de 2 años de edad (figura 1B) en comparación con células de control. No se observaron otros cambios significativos en la viabilidad celular en respuesta al tratamiento con catequina (■) o quercetina (▲). Los resultados se presentan como porcentaje de control y representan la media \pm EEM de por lo menos 3 experimentos individuales. *Indica reducción de viabilidad celular significativa en comparación con el control según se evalúa por ANOVA de una vía y prueba t
65 post hoc, $p < 0.05$.

Figuras 2A-C: Expresión de ARNm en respuesta al tratamiento fitoquímico. Las figuras 2A-C muestran la expresión de ARNm para GST, UGT y NQO1 en un modelo de células de fibroblastos en un mes (barras negras), dos años (barras grises) y adulto (barras blancas) modelo de células de fibroblastos en la presencia de concentraciones variables de quercetina (figura 2A) catequina (figura 2B), y sulforafano (Figura 2C). Más específicamente, la figura 2A muestra la expresión de ARNm para GST, UGT y NQO1 en modelo de células de fibroblastos en un mes (barra de color negro), dos años (barra gris) y adulto (barra blanca) en la presencia de diferentes concentraciones de quercetina. La figura 2B muestra la expresión de ARNm para GST, UGT y NQO1 en un modelo de células de fibroblastos en un mes (barra de color negro), dos años (barra gris) y adulto (barra blanca) en la presencia de diferentes concentraciones de catequina. La figura 2C muestra la expresión de ARNm para GST, UGT y NQO1 en modelo de células de fibroblastos en un mes (barra de color negro), dos años (barra gris) y adulto (barra blanca) en la presencia de diferentes concentraciones de sulforafano. El modelo de célula de adulto muestra un aumento significativo dependiente de dosis en ambas expresiones ARNm para GST y UGT durante el tratamiento con quercetina. La expresión de ARNm para GST y UGT es significativamente mayor en el modelo de célula de 1 mes de edad. Después del tratamiento de catequina, los modelos de células de lactantes demuestran incrementos significativos en ARNm para GST y UGT. En la estirpe celular de adulto, se observó un aumento significativo de ARNm para GST, UGT y NQO1 durante el tratamiento con sulforafano, además de los aumentos significativos en GST y NQO1 en los modelos de células de lactantes. Los resultados son promedio \pm EEM de por lo menos 3 experimentos individuales, y se normalizaron contra el control = 1. * & ** indica el aumento significativo de la expresión relativa a control según se evalúa por ANOVA de una vía y prueba t post hoc, $p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente.

Figura 3A-C: Efecto del tratamiento fitoquímico en la expresión de la proteína enzimática fase II. La figura 3A representa inmunotransferencia para el efecto de 24 horas de tratamiento fitoquímico (control, 5, 10 y 20 μ M como se indica) y de expresión de proteínas de enzimas de fase II NQO1 (barras de color gris medio), UGT (barras de color gris claro) y GST (barras grises negras) en un modelo de célula de 1 mes. La figura 3B representa inmunotransferencia para el efecto de 24 horas de tratamiento fitoquímico y expresión de proteínas de las enzimas fase II en un modelo celular de 2 años. La figura 3C representa inmunotransferencia para efecto de 24 horas de expresión fitoquímica y proteica de las enzimas de fase II en un modelo de célula de adulto. Todas las membranas son depuradas y se vuelven a sondear para detectar anti cuerpo anti- β -actina para garantizar la igualdad de carga. Los experimentos se repitieron por lo menos 3 veces y los resultados son proporción relativa a la beta-actina.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la presente divulgación, uno o más ejemplos de los cuales se exponen en el presente documento a continuación. Cada ejemplo se proporciona por vía de explicación de la composición nutricional de la presente divulgación y no como limitante. De hecho, será evidente para las personas experimentadas en la técnica, que se pueden hacer diversas modificaciones y variaciones a las enseñanzas de la presente divulgación sin apartarse del alcance o espíritu de la divulgación. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización, se puede utilizar con otra realización para producir una realización adicional.

Por lo tanto, se pretende que la presente divulgación comprenda tales modificaciones y variaciones como vienen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes. Otros objetos, características y aspectos de la presente divulgación se describen en o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender por un experto en la técnica que la presente dilución es solamente una descripción de realizaciones de ejemplo y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente divulgación.

“Composición nutricional” se entiende una sustancia o formulación que satisface por lo menos una parte de los requerimientos de nutrientes de un sujeto. Los términos “Nutricional”, “fórmula nutricional”, “nutrición entérica”, “composición nutricional”, y “suplemento nutricional” se utilizan intercambiamente a lo largo de la presente divulgación para referirse a los líquidos, polvos, geles, pastas, sólidos, concentrados, suspensiones o formas listas para uso de fórmulas entéricas, fórmulas orales, fórmulas para lactantes, fórmulas para pacientes pediátricos, fórmulas para niños, leches de crecimiento y/o fórmulas para adultos, tal como mujeres que están lactando o embarazadas.

El término “entérico” significa a través o dentro del tracto gastrointestinal o tracto digestivo. “Administración entérica” incluye alimentación oral, alimentación intragástrica, administración transpilórica, o cualquier otra administración en el tubo digestivo.

“Sujeto pediátrico” se refiere a un humano que tiene menos de 13 años de edad. En algunas realizaciones, un sujeto pediátrico se refiere a un sujeto humano que tiene menos de 8 años de edad. En otras realizaciones, un sujeto pediátrico se refiere a un sujeto humano entre 1 y 6 años de edad. En otras realizaciones adicionales, un sujeto pediátrico se refiere a un sujeto humano entre 6 y 12 años de edad.

“Lactante” significa un sujeto que tiene una edad de no más de aproximadamente un año, en incluye lactantes de 0 a aproximadamente 12 meses. En el término lactante se incluyen lactantes de bajo peso al nacer, lactantes de muy bajo peso al nacer, lactantes prematuros. “Prematuro” significa un lactante nacido antes de la semana 37 de gestación. El término lactante también incluye fetos, por ejemplo, fetos aún en el útero.

“Niño” significa un sujeto que varía en edad entre aproximadamente 12 meses hasta aproximadamente 13 años. En algunas realizaciones, un niño es un sujeto entre edades de 1 y 12 años de edad. En otras realizaciones, los términos “niños” o “niño” se refieren a sujetos que tienen entre aproximadamente uno y aproximadamente seis años de edad, o entre aproximadamente 7 y 12 años de edad. En otras realizaciones, los términos “niños” o “niño” se refieren a cualquier rango de edades entre aproximadamente 12 meses y 13 años.

“Producto nutricional de los niños” se refiere a una composición que satisface por lo menos una parte de los requerimientos nutricionales de un niño. Una leche de crecimiento es un ejemplo de un producto nutricional para niños.

“Formula de lactante” significa una composición que satisface por lo menos una parte de los requerimientos nutricionales de un lactante. En los Estados Unidos, el contenido de una fórmula de lactante se indica por las regulaciones federales establecidas los artículos 100, 106, y 107 establecidos en el 21 C.F.R. Estas regulaciones definen los macronutrientes, vitaminas, minerales, y otros niveles de ingredientes en un esfuerzo por simular las propiedades nutritivas y otras propiedades de leche humana.

El término “leche de crecimiento” se refiere a una amplia categoría de composiciones nutricionales previstas para ser utilizadas como parte de una dieta variada con el fin de apoyar el crecimiento y desarrollo normal de un niño entre las edades de aproximadamente 1 y aproximadamente 6 años de edad.

“A base de leche” significa que comprende por lo menos un componente que se ha sacado o extraído de la glándula mamaria de un mamífero. En algunas realizaciones, una composición nutricional a base de leche comprende componentes de leche que se derivan de ungulados domesticados, ruminantes u otros mamíferos o cualquier combinación de los mismos. Por otra parte, en algunas realizaciones, a base de leche significa que comprenden caseína de bovino, suero de leche, lactosa, o cualquier combinación de los mismos. Adicionalmente, “composición nutricional a base de leche” se puede referir a cualquier composición que comprende cualquier producto derivado de leche o a base de leche conocido en la técnica.

“Nutricionalmente completa” significa una composición que se puede utilizar como la única fuente de nutrición, que suministraría esencialmente todas las cantidades diarias requeridas de vitaminas, minerales, y/u oligoelementos en combinación con proteínas, carbohidratos y lípidos. De hecho, “nutricionalmente completo” describe una composición nutricional que proporciona cantidades adecuadas carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía requerida para soportar el crecimiento normal y desarrollo de un sujeto.

Por lo tanto, una composición nutricional que es “nutricionalmente completa” para un lactante prematuro será, por definición, proporcionar cualitativamente y cuantitativamente las cantidades adecuadas de carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía requerida para crecimiento del feto.

Una composición nutricional que es “nutricionalmente completa” para un feto será, por definición, proporcionar cualitativa y cuantitativamente las cantidades adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales, y energía requerida para el crecimiento del feto.

Una composición nutricional que es “nutricionalmente completa” para un niño será, por definición, proporcionar cualitativamente y cuantitativamente las cantidades apropiadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales, y energía requeridos para el crecimiento de un niño.

Como se aplica a los nutrientes, el término “esencial” se refiere a cualquier nutriente que no puede ser sintetizado por el cuerpo en cantidades suficientes para el crecimiento normal y para mantener la salud y que, por lo tanto, debe ser suministrado por la dieta. El término “condicionalmente esencial” como se aplica a los nutrientes significa que el nutriente debe ser suministrado por la dieta bajo condiciones en las cantidades apropiadas del compuesto precursor que no está disponible para el cuerpo para que ocurra la síntesis endógena.

“Suplemento nutricional” o “suplemento” se refiere a una formulación que contiene una cantidad nutricionalmente relevante de por lo menos un nutriente. Por ejemplo, los suplementos descritos aquí pueden proporcionar por lo menos un nutriente para un sujeto humano, tal como un lactante o mujer embarazada.

“Probiótico” significa un microorganismo con baja o ninguna patogenicidad que ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del huésped.

5 “Prebiótico” significa un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias intestinales beneficiosas en el tubo digestivo, reducción selectiva de patógenos intestinales, o influencia favorable en el perfil de ácido graso de cadena corta en el intestino que pueden mejorar la salud del huésped.

10 “Fitonutrientes” significa un compuesto químico que se encuentra naturalmente en las plantas. El término “fitonutrientes” comprende diversas categorías amplias de compuestos producidos por las plantas, tal como, por ejemplo, compuestos polifenólicos, tal como los flavonoides, flavonoles, flavonas, isoflavononas, flavan-3-oles, isoflavonoides, antocianinas, proantocianinas, catequinas, y epicatequinas. Los fitonutrientes también comprende carotenoides, fitoesteroles, tioles, isotiocianatos, y otros compuestos derivados de plantas.

15 “β-glucano” significa todos los β-glucanos, que incluyen tanto β-1,3-glucano y β-1,3;1,6-glucano, ya que cada uno es un tipo específico de β-glucano. Por otra parte, β-1,3;1,6-glucano es un tipo de β-1,3-glucano. Por lo tanto, el término “β- 1,3-glucano” incluye β-1,3;1,6-glucano.

20 Todos los porcentajes, partes y proporciones como se utilizan aquí son en peso de la formulación total, a menos que se especifique lo contrario.

25 La composición nutricional de la presente divulgación puede estar libre de sustancialmente cualquier ingrediente opcional o seleccionado descrito aquí. En este contexto, y a menos que se especifique lo contrario, el término “sustancialmente libre” significa que la composición seleccionada puede contener menos de una cantidad funcional del ingrediente opcional, normalmente menos de 0.1% en peso, y también, incluyendo cero por ciento en peso de tales ingredientes opcionales o seleccionados.

30 Todas las referencias a las características singulares o limitaciones de la presente divulgación incluirán la característica plural o limitación correspondiente, y viceversa, a menos que se especifique lo contrario o claramente lo contrario por el contexto en el que se hace referencia.

35 Todas las combinaciones de métodos o etapas de proceso en cómo se utilizan aquí se pueden realizar en cualquier orden, a menos que se especifique lo contrario o implícitamente lo contrario por el contexto en el cual se hace referencia a la combinación.

40 Los métodos y composiciones de la presente divulgación, incluyendo componentes de los mismos, pueden comprender, consistir de, o consistir esencialmente de los elementos esenciales y limitaciones de las realizaciones descritas aquí, así como cualquier ingrediente, componente o limitación adicional u opcionales descritos aquí o de lo contrario útil en composiciones nutricionales.

45 Como se utiliza aquí, el término “aproximadamente” debe ser interpretado para referirse a ambos de los números especificados en cualquier intervalo. Cualquier referencia a un intervalo debería ser considerada como proporcionar apoyo a cualquier subconjunto dentro de ese intervalo.

50 La presente divulgación proporciona composiciones nutricionales que comprenden una fuente de fitonutrientes. Las composiciones nutricionales pueden comprender adicionalmente una fuente de proteínas, una fuente de carbohidratos, y/o una fuente de grasa o una fuente de lípidos. Más específicamente, la presente divulgación proporciona una composición nutritiva a base de leche, que comprende una fuente de grasas, una fuente de carbohidratos, una fuente de proteína y una fuente de fitonutrientes.

55 La composición nutricional de la presente divulgación incluye por lo menos un fitonutriente. La fuente de fitonutrientes se puede derivar de una fruta o vegetal, o, en determinadas realizaciones, la fuente de fitonutrientes se puede derivar químicamente o se hace sintéticamente. En algunas realizaciones, la fuente de fitonutrientes puede comprender un polifenol, un carotenoide, un isotiocianato, o mezclas de los mismos.

60 Para los fines de esta divulgación, fitonutrientes se pueden agregar a una composición nutricional en su forma natural, purificada, encapsulada y/o químicamente o enzimáticamente modificada con el fin de liberar las propiedades sensoriales y de estabilidad deseadas. En el caso de encapsulación, es deseable que los fitonutrientes encapsulados resistan la disolución con agua, pero se liberan al alcanzar el intestino delgado. Esto se podría lograr mediante la aplicación de recubrimientos entéricos, tal como alginato reticulado y otros. Adicionalmente, la composición nutricional puede comprender el metabolito de un fitonutriente o su compuesto de origen.

65 Los polifenoles apropiados para su uso en las composiciones nutricionales descritas aquí incluyen, sin limitación antocianinas, antocianinas, proantocianidinas, cianidinas, flavanoles, flavonoles, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas, e isoflavonoides. Por ejemplo, los polifenoles incluyen epicatequinas, catequinas, resveratrol, quercetina, curcumina,

o cualquier mezcla de los mismos, así como cualquier combinación posible de los fitonutrientes en una forma purificada o natural.

5 En algunas realizaciones, las antocianinas, pueden ser, sin limitación, glucósidos de aurantinidina, cianidina, delfinidina, europinidina, luteolinidina, pelargonidina, maliidina, peonidina, petunidina, y rosinidina. Estas y otras antocianinas adecuadas para uso en la composición nutricional se encuentran en una variedad de fuentes de plantas. Las antocianinas se pueden derivar de una sola fuente vegetal o una combinación de fuentes de plantas. Los ejemplos no limitantes de vegetales ricos en antocianinas adecuados para su uso en la composición de la invención incluyen: bayas (acai, uva, arándano, arándano rojo, grosellero negro, aronia, mora, frambuesa, cereza, 10 grosella, arándano, camariña, mora de los pantanos, arándano, sorba), maíz morado, patata púrpura, zanahoria púrpura, camote rojo, col roja, berenjena.

15 Las proantocianidinas apropiadas para uso en la composición nutricional descritas aquí incluyen, sin limitación, polímeros de flavan-3-oles (por ejemplo, catequina, epicatequinas) con grados de polimerización en el intervalo de 2 a 11. Tales compuestos se pueden derivar de una sola fuente vegetal o una combinación de fuentes vegetales. Ejemplos no limitantes de fuentes vegetales ricas en proantocianidinas apropiadas para uso en la composición nutricional de la invención incluyen: uva, piel de uva, semilla de uva, té verde, té negro, manzana, corteza de pino, canela, cacao, arándano, grosella negra, aronia.

20 Ejemplos no limitantes de flavonoles que son apropiados para uso en la composición nutricional de la invención incluyen catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, quercetina, miricetina, kaempferol o cualquier mezcla de los mismos. Plantas ricas en flavan-3-oles adecuados y flavonoles incluyen, pero no se limitan a, manzana, semilla de uva, uva, piel de uva, té (verde o negro), corteza de pino, canela, cacao, arándano, grosella negra, aronia, naranja, lima y limón.

25 En algunas realizaciones, la composición nutricional se formula para suministrar una cantidad de flavan-3-oles (tales como catequinas) que puede variar desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 170 mg/día. En otras realizaciones, la composición nutricional está formulada para suministrar una cantidad de flavan-3-oles que puede variar desde aproximadamente 0.01 y aproximadamente 150 mg/día. Y en ciertas realizaciones, la composición 30 nutricional comprende entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 338 mg de flavan-3-oles por litro. La cantidad de flavonoles, tal como quercetina, puede variar desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 400 nmol/L. En determinadas realizaciones, la composición nutricional comprende entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 211 mg de flavonoles por litro. Y en algunas realizaciones, la composición nutricional es formulada para suministrar una cantidad de flavonoles (tal como quercetina) que puede variar desde 35 aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 150 mg/día. Si la composición nutricional se dirige a o se formula para la administración a un lactante desde aproximadamente 0 o hasta aproximadamente 12 meses de edad, la cantidad de catequinas puede variar desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 1300 nmol/L. En algunas realizaciones, la composición nutricional puede ser formulada para proporcionar entre aproximadamente 0.01 y 40 aproximadamente 50 mg flavan-3-oles, tales como catequinas, por día. La cantidad de quercetina puede variar desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 nmol/L. En algunas realizaciones, la composición 45 nutricional puede ser formulada para proporcionar entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 40 mg, flavonoles tales como quercetina, por día.

45 En algunas realizaciones, la composición nutricional de la presente divulgación comprende flavanonas y/o flavonas. Ejemplos no limitantes de flavanonas apropiadas incluyen butina, eriodictiol, hesperetina, hesperidina, homeriodictiol, isosakuranetina, naringenina, naringina, pinocembrina, poncirina, sakuranetina, sakuranina, steurbina. Ejemplos no limitantes de flavonas apropiadas incluyen apigenina y luteolina. Fuentes vegetales ricas en flavanonas y/o flavonas incluyen, pero no se limitan a naranja, mandarina, pomelo, limón, lima, apio, perejil, pimienta y pimiento. Por otra parte, la composición nutricional también puede comprender flavonoides. Los flavonoides de 50 plantas o algas pueden ser útiles en el monómero, dímero y/o formas de polímero.

La composición nutricional también puede comprender isoflavonoides. Ejemplos de isoflavonoides incluyen, pero no se limitan a, genisteína (genistina), daidzeína (daidzina), biochanina A, formononetina, cumestrol, irilona, orobol, pseudobaptigenina, anagroidisoflavona A y B, calicosina, gliciteína, irigenina, 5-O-metilgenisteína, pratenseína, 55 prunetína, psi-tectorigenina, retusina, tectorigenina, iridina, ononina, puerarina, tectoridina, derrubona, luteona, wighteona, alpinumisoflavona, barbigerona, di-O-metilalpinumisoflavona, 4'-metil-alpinumisoflavona. En determinadas realizaciones, la composición nutricional puede estar libre o sustancialmente libre de isoflavonas de soja. En algunas realizaciones, la nutricional es libre de o sustancialmente composición libre de fitonutrientes de soja, tales como isoflavonas de soja.

60 La composición nutricional puede comprender otras clases de fitonutrientes de dieta, tales como glucosinolatos o isotiocianatos. Isotiocianatos. representativos incluyen, sin limitación, sulforafano y fenetilisotiocianato. Las fuentes de plantas ricas en isotiocianatos se encuentran en vegetales crucíferos, como coles de Bruselas, repollo, coliflor, col china, col rizada, coles, brócoli chino, brócoli, coles raab, mostaza, nabo, rábano, rúcula, berros y mezclas de los 65 mismos.

En ciertas realizaciones, la composición nutricional comprende carotenoides, tales como luteína, zeaxantina, astaxantina, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, gammacaroteno, y/o beta-criptoxantina. Las fuentes de plantas ricas en carotenoides incluyen, pero no se limitan a kiwi, uvas, cítricos, tomates, sandías, papayas y otras frutas rojas o vegetales verde oscuro, tales como la col rizada, espinaca, hojas de calabacín, nabo, repollo, guisantes y vegetales verdes, coles, lechuga romana, brócoli, col de Bruselas, espinacas, zanahorias y otras frutas y verduras de color rojo, naranja o amarillo.

En algunas realizaciones, la composición nutricional es una composición nutricional a base de leche fortificada, tal como una fórmula infantil o una leche de crecimiento, que comprende por lo menos un fitonutriente. La composición nutricional puede ser capaz de programación metabólica de enzimas fase II en pacientes pediátricos. La composición nutricional puede ser capaz de promover la expresión del gen de la enzima fase II y/o expresión de la proteína de la enzima fase II en una composición para un paciente pediátrico. En algunas realizaciones, la composición nutricional puede ser capaz de modular la expresión de la proteína de la enzima fase II en un sujeto pediátrico.

Las composiciones nutricionales descritas se pueden proporcionar en cualquier forma conocida en la técnica anterior, tal como un polvo, un gel, una suspensión, una pasta, un sólido, un líquido, un concentrado líquido, un sustituto de leche en polvo reconstituible o un producto listo para usar. La composición nutritiva puede, en ciertas realizaciones, comprender un suplemento nutricional, producto nutricional para niños, fórmula para lactantes, fortificante de leche humana, leche de crecimiento o cualquier otra composición nutricional diseñada para un paciente pediátrico. Las composiciones nutricionales de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, sustancias ingeribles por vía oral que promueven la salud que incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos. Más aún, la composición nutricional de la presente divulgación se puede estandarizar a contenido calórico específico, se puede proporcionar como un producto listo para uso o se puede proporcionar en una forma concentrada. Más aún, la composición nutricional de la presente divulgación se puede estandarizar a un contenido calórico específico, se puede proporcionar como un producto listo para uso, o se puede proporcionar en una forma concentrada. En algunas realizaciones, la composición nutricional está en forma de polvo con un tamaño de partícula en el rango de 5 μm hasta 1500 μm , más preferiblemente en el intervalo de 10 μm a 1000 μm , y aún más preferiblemente en el intervalo de 50 μm hasta 300 μm .

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una leche de crecimiento a base de leche fortificada diseñada para niños de 1-3 años y/o 4-6 años, en el que la leche de crecimiento apoya el crecimiento y el desarrollo y la salud de toda la vida. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una fórmula para lactantes apropiada para lactantes de edades comprendidas entre 0 a 12 meses, y desde 0 hasta 3 meses, desde 0 hasta 6 meses o desde 6 hasta 12 meses.

Fuentes de grasa o lípidos apropiadas para la composición nutricional de la presente divulgación pueden ser cualquiera conocida o utilizada en la técnica anterior, que incluye pero no se limitó a, fuentes animales, por ejemplo, grasa de leche, mantequilla, grasa de mantequilla, lípido de yema de huevo; fuentes marinas, tales como aceites de pescado, aceites marinos, aceites unicelulares; aceites vegetales y de plantas, tales como aceite de maíz, aceite de canola, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de palmaoleína, aceite de coco, aceite de girasol alto oleico, aceite de onagra, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de linaza (semilla de lino), aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo alto oleico, estearina de palma, aceite de semilla de palma, aceite de germen de trigo, aceites de triglicéridos de cadena media y emulsiones y ésteres de ácidos grasos, y cualquiera de sus combinaciones.

Las fuentes de carbohidratos pueden ser cualquiera utilizadas en la técnica anterior, por ejemplo, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz, y similares. La cantidad de carbohidratos en la composición nutricional típicamente puede variar de entre aproximadamente 5 g y aproximadamente 25 g/100 kcal.

La composición nutricional de la divulgación también puede comprender una fuente de proteína. La fuente de proteínas puede ser cualquiera utilizada en la técnica anterior, por ejemplo, leche sin grasa, proteína de suero de leche, caseína, proteína de soja, proteína hidrolizada, aminoácidos, y similares. Fuentes de proteínas de leche de bovino útiles en la práctica de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, polvos de proteína de leche, concentrados de proteína de leche, aislados de proteína de leche, sólidos de leche sin grasa, leche sin grasa, leche descremada en polvo, proteínas de suero, aislados de proteína de suero, concentrados de proteína de suero, suero dulce, suero ácido, caseína ácido, caseinato (por ejemplo, caseinato de sodio, caseinato de sodio y calcio, caseinato de calcio) y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, las proteínas de la composición nutricional se proporcionan como proteínas intactas. En otras realizaciones, las proteínas se proporcionan como una combinación de ambas proteínas intactas y proteínas parcialmente hidrolizadas. En ciertas otras realizaciones, las proteínas están más completamente hidrolizadas. En todavía otras realizaciones, la fuente de proteínas comprende aminoácidos. En aún otra realización, la fuente de proteínas puede ser suplementada con péptidos que contienen glutamina.

En una realización particular de la composición nutricional, la proporción de suero: caseína de la fuente de proteína es similar a la encontrada en la leche materna humana. En una realización, la fuente de proteínas comprende aproximadamente desde 40% de aproximadamente proteína de 80% suero y hasta desde aproximadamente 20% hasta aproximadamente 60% de caseína.

5 En algunas realizaciones, la composición nutricional comprende entre aproximadamente 1 g y aproximadamente 7 g de una fuente de proteína por 100 kcal.

10 En una realización, la composición nutricional puede contener uno o más probióticos. Cualquier probiótico conocido en la técnica anterior puede ser aceptable en esta realización. En una realización particular, el probiótico puede ser seleccionados de cualquier especie de *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC número 53103), especies de *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (DSM N 10140) o cualquier combinación de los mismos.

15 Si se incluye en la composición, la cantidad de probiótico puede variar desde aproximadamente 1×10^4 hasta aproximadamente 1×10^{10} unidades de formación de colonias (UFC, por sus siglas en inglés) por kg de peso corporal por día. En otra realización, la cantidad de probiótico puede variar desde aproximadamente 10^6 hasta aproximadamente 10^{10} ufc por kg de peso corporal por día. En todavía otra realización, la cantidad de probiótico puede variar desde aproximadamente 10^7 hasta aproximadamente 10^9 cfu por día. En aún otra realización, la cantidad de probiótico puede ser por lo menos aproximadamente 10^6 cfu por día.

20 En una realización, el probiótico puede ser viable o no viable. Como se utiliza aquí, el término "viable", se refiere a microorganismos vivos. El término "no viable" o "probiótico no viable" significa microorganismos probióticos no vivos, sus componentes celulares y/o metabolitos de los mismos. Tales probióticos no viables pueden haber sido eliminados por calor o de otra manera inactivados, pero conservan la capacidad de influir favorablemente en la salud del huésped. Los probióticos útiles en la presente descripción pueden ser de origen natural, sintético o desarrollado a través de la manipulación genética de organismos, ya sea que esta nueva fuente se conozca ahora o se desarrolle posteriormente.

25 La composición nutritiva también puede contener uno o más prebióticos en determinadas realizaciones. Dichos prebióticos pueden ser de origen natural, sintético, o desarrollados a través de la manipulación genética de organismos y/o vegetales, ya sea que esta nueva fuente se conozca ahora o se desarrolle posteriormente. Los prebióticos útiles en la presente descripción pueden incluir oligosacáridos, polisacáridos, y otros prebióticos que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa.

30 Más específicamente, prebióticos útiles en la presente divulgación pueden incluir polidextrosa, polvo de polidextrosa, lactulosa, lactosacarosa, rafinosa, glucooligosacáridos, inulina, fructo-oligosacáridos, oligosacárido de isomalto, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacáridos, quito-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, aribino-oligosacáridos, sialiloligosacáridos, fuco-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y gentio-oligosacáridos.

35 En una realización, la cantidad total de prebióticos presente en la composición nutricional puede ser desde aproximadamente 1.0 g/L hasta aproximadamente 10.0 g/L de la composición. Por lo menos 20% de los prebióticos puede comprender galacto-oligosacárido, polidextrosa o una mezcla de los mismos. La cantidad de cada galacto-oligosacárido y/o polidextrosa en la composición nutricional puede, en una realización, estar dentro del intervalo de aproximadamente 1.0 g/L hasta aproximadamente 4.0 g/L.

40 La composición nutricional de la divulgación puede contener una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA, por sus siglas en inglés) comprende ácido docosahexaenoico. Otros LCPUFA apropiados incluyen, pero no se limitan a, ácido α -linoleico, ácido γ -linoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA).

45 En una realización, especialmente si la composición nutricional una fórmula para lactante, la composición nutricional complementada con DHA y ARA. En esta realización, la proporción en peso de ARA:DHA puede ser entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 9:1. En una realización particular, la proporción de ARA:DHA es de aproximadamente 1:2 hasta aproximadamente 4:1.

50 La composición nutricional puede ser suplementada con aceites que contienen DHA y/o ARA que utilizan técnicas estándar conocidas en el ámbito. Por ejemplo, DHA y ARA se pueden agregar a la composición mediante la sustitución de una cantidad equivalente de un aceite, tal como aceite de girasol alto oleico, normalmente presente en la composición. Como otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA se pueden agregar a la composición mediante la sustitución de una cantidad equivalente del resto de la mezcla total de grasa normalmente presente en la composición sin DHA y ARA.

55 Si se incluye, la fuente de DHA y/o ARA puede ser cualquier fuente conocida en el ámbito, tal como aceite marino, aceite de pescado, aceite unicelular, lípidos de yema de huevo, y lípido de cerebro. En algunas realizaciones, DHA y ARA se obtienen de aceites unicelulares comercializados como DHASCO® y ARASCO®, o variaciones de los

mismos. El DHA y ARA pueden estar en forma natural, siempre que el resto de la fuente de LCPUFA no resulte en ningún efecto perjudicial sustancial sobre el sujeto. Alternativamente, DHA y ARA se pueden utilizar en forma refinada.

5 En una realización, las fuentes de DHA y ARA son aceites unicelulares como se enseña en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,374,657; 5,550,156; y 5,397,591. No obstante, la presente divulgación no se limita solamente a dichos aceites.

10 La composición nutricional, también puede comprender una fuente de β -glucano. Los glucanos son polisacáridos, específicamente polímeros de glucosa, que son de origen natural y se pueden encontrar en las paredes celulares de bacterias, levaduras, hongos y vegetales. Beta-glucanos (β - glucanos) son en sí mismos un subconjunto diverso de polímeros de glucosa, que se componen de cadenas de monómeros de glucosa unidas entre sí a través de enlaces glicosídicos de tipo beta para formar carbohidratos complejos.

15 β -1,3-glucanos son polímeros de carbohidratos purificados de, por ejemplo, levadura, hongo, bacterias, algas, o cereales. (Stone BA, Clarke A, E Chemistry and Biology (1-3) -Beta-Glucans London: Portland Press Ltd, 1993). La estructura química de β -1,3-glucano depende de la fuente del β -1,3-glucano. Adicionalmente, diversos parámetros fisicoquímicos, tales como solubilidad, estructura primaria, peso molecular, y ramificación, tienen una función en las actividades biológicas de β -1,3-glucanos. Yadomae T., Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans. Yakugaku Zasshi. 2000;120:413-431.

20 β -1,3-glucanos son polisacáridos de origen natural, con o sin cadenas laterales de β -1,6-glucosa que se encuentran en las paredes celulares de una variedad de vegetales, levaduras, hongos y bacterias. B-1,3;1,6-glucanos son los que contienen unidades de glucosa con enlaces (1,3) que tienen cadenas laterales unidas a las posiciones (1,6). β -1,3;1,6 glucanos son un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa que comparten elementos comunes estructurales, que incluye una estructura de unidades de glucosa de cadena recta unidas por un enlace β -1,3 con ramificaciones de glucosa ligadas a β -1,6 que se extienden desde esta estructura. Si bien esta es la estructura básica de la clase descrita actualmente de β -glucanos, pueden existir algunas variaciones. Por ejemplo, determinados β -glucanos de levadura tienen regiones adicionales de ramificación β (1,3) que se extiende desde las ramificaciones β (1,6), que agregan complejidad adicional a sus estructuras respectivas.

25 β -glucanos derivados de levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, se componen de cadenas de moléculas de D-glucosa conectadas en las posiciones 1 y 3, que tienen cadenas laterales de glucosa unidas en las posiciones 1 y 6. El β -glucano derivado de levadura es un azúcar complejo similar a fibra, insoluble que tiene la estructura general de una cadena lineal de unidades de glucosa con una estructura β -1,3 intercalados con cadenas laterales β -1,6 que son generalmente 6-8 unidades de glucosa de longitud. Más específicamente, β -glucano derivado de levadura de pan es poli-(1,6)- β -D-glucopiranosil-(1,3)- β -D-glucopiranososa.

30 Adicionalmente, β -glucanos son bien tolerados y no producen o producen un exceso de gases, distensión abdominal, hinchazón de vientre o diarrea en pacientes pediátricos. La adición de β -glucano a una composición nutricional para un sujeto pediátrico, como una fórmula para lactante, una leche de crecimiento u otros productos nutricionales de niños, mejorará la respuesta inmunitaria del sujeto mediante el aumento de la resistencia contra la invasión de patógenos y, por lo tanto, mantener o mejorar la salud en general.

35 En una realización, la composición nutricional de la presente divulgación comprende colina. La colina es un nutriente que es esencial para la función normal de las células. Es un precursor para los fosfolípidos de membrana, y acelera la síntesis y liberación de la acetilcolina, un neurotransmisor implicado en el almacenamiento de memoria. Por otra parte, si bien no se desea estar limitado por esta o cualquier otra teoría, se considera que la colina en la dieta y el ácido docosahexaenoico (DHA) actúan de forma sinérgica para promover la biosíntesis de fosfatidilcolina y de este modo ayudar a promover sinaptogénesis en sujetos humanos. Adicionalmente, la colina y el DHA pueden exhibir el efecto sinérgico de la promoción de la formación de la espina dendrítica, lo cual es importante en el mantenimiento de las conexiones sinápticas establecidas. En algunas realizaciones las composiciones nutricionales de la presente divulgación incluyen aproximadamente 40 mg de colina por porción hasta aproximadamente 100 mg por 8 oz. por porción.

40 En una realización, la composición nutricional comprende una fuente de hierro. En una realización, la fuente de hierro es pirofosfato férrico, ortofosfato férrico, fumarato ferroso o una mezcla de los mismos y la fuente de hierro puede ser encapsulada en algunas realizaciones.

45 Una o más vitaminas y/o minerales se pueden agregar también a la composición nutricional en cantidades suficientes para suministrar los requerimientos nutritivos diarios de un sujeto. En experto en la técnica debe entender que los requerimientos de vitaminas y minerales pueden variar, por ejemplo, con base en la edad del niño. Por ejemplo, un lactante puede tener distintas necesidades de vitaminas y minerales que un niño entre las edades de uno a trece años. Por lo tanto, las realizaciones no están previstas a limitar la composición nutricional a un grupo de edad en particular, sino, más bien, a proporcionar un intervalo de componentes de vitamina y minerales aceptables.

60

65

En realizaciones que proporcionan una composición nutricional para un niño, la composición puede opcionalmente incluir, pero no se limitan a, una o más de las siguientes vitaminas o derivaciones de las mismas: vitamina B₁ (tiamina, pirofosfato de tiamina, TPP, trifosfato de tiamina, TTP, clorhidrato de tiamina, mononitrato de tiamina), vitamina B₂ (riboflavina, mononucleótido de flavina, FMN, dinucleótido de flavina adenina, FAD, lactoflavina, ovoflavina), vitamina B₃ (niacina, ácido nicotínico, nicotinamida, niacinamida, nicotinamida adenina dinucleótido, NAD, ácido nicotínico mononucleótido, NicMN, ácido piridino-3-carboxílico), vitamina B₃-precursor triptófano, vitamina B₆ (piridoxina, piridoxal, piridoxamina, colhidrato de piridoxina), ácido pantoténico (pantotenato, pantenol), folato (ácido fólico, folacina, ácido pteroilglutámico), vitamina B₁₂ (cobalamina, metilcobalamina, desoxiadensilcobalamina, cianocobalamina, hidroxicobalamina, adenosilcobalamina) biotina, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A (retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, ésteres de retinilo con otros de ácidos grasos de cadena larga, retinal, ácido retinoico, ésteres de retinol), vitamina D (calciferol, colecalciferol, vitamina D₃, 1,25,-dihidroxitiamina D), vitamina E (α-tocoferol, acetato de α-tocoferol, succinato de α-tocoferol, nicotinato de α-tocoferol, α-tocoferol), vitamina K (vitamina K₁, filoquinona, naftoquinona, vitamina K₂, menaquinona-7, vitamina K₃, menaquinona-4, menadiona, menaquinona-8, menaquinona-8H, menaquinona-9, menaquinona-9H, menaquinona-10, menaquinona-11, menaquinona-12, menaquinona13), colina, inositol, β-caroteno y cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones que proporcionan productos de nutrición de niños, tales como leche de crecimiento, la composición puede opcionalmente incluir, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes minerales o derivaciones de los mismos: boro, calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, cloruro de calcio, lactato de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, cloruro, cromo, cloruro de cromo, picolonato de cromo, cobre, sulfato de cobre, gluconato de cobre, sulfato de cobre, fluoruro, hierro, hierro carbonilo, hierro férrico, fumarato ferroso, ortofosfato férrico, trituración de hierro, polisacárido de hierro, yoduro, yodo, magnesio, carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, estearato de magnesio, sulfato de magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio, fosfato de potasio, yoduro de potasio, cloruro de potasio, acetato de potasio, selenio, azufre, sodio, docusato de sodio, cloruro de sodio, selenato de sodio, molibdato de sodio, zinc, óxido de zinc, sulfato de zinc y mezclas de los mismos. Derivados de ejemplos no limitantes de los compuestos minerales incluyen sales, sales alcalinas, ésteres y quelatos de cualquier compuesto mineral.

Los minerales se pueden agregar a leches de crecimiento o a otras composiciones nutricionales de niños en la forma de sales, tales como fosfato de calcio, calcio de glicerol fosfato, citrato de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, fosfato de magnesio, sulfato ferroso, sulfato de zinc, sulfato cúprico, sulfato de manganeso, y selenito de sodio. Vitaminas y minerales adicionales se pueden agregar como se conoce en la técnica.

En una realización, la composición nutricional de los niños puede contener entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50% de la recomendación dietética máxima para cualquier país dado, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50% de recomendación de dieta promedio para un grupo de países, por porción de vitaminas A, C, y E, zinc, hierro, yodo, selenio, y colina. En otra realización, la composición nutricional de niños puede suministrar cerca de 10-30% de la recomendación dietética máxima para un país determinado, o aproximadamente de 10-30% de la recomendación dietética promedio de un grupo de países, por porción de vitaminas B. En aún otra realización, los niveles de vitamina D, calcio, magnesio, fósforo, y potasio en el producto nutritivo de niños pueden corresponder con los niveles promedio encontrados en la leche. En otras realizaciones, otros nutrientes en la composición nutricional de niños pueden estar presentes en aproximadamente 20% de la recomendación de dieta máxima para cualquier país, o aproximadamente 20% de la recomendación dietética promedio de un grupo de países, por porción.

La composición nutricional de niños de la presente descripción puede incluir opcionalmente uno o más de los siguientes agentes saborizantes, que incluye, pero no limitado a, extractos de sabores, aceites volátiles, sabores de cacao o de chocolate, sabor de mantequilla de maní, migajas de galleta, vainilla o cualquier saborizante disponible en el mercado. Ejemplos de saborizantes útiles incluyen, pero no se limita a, extracto de anís puro, imitación de extracto de plátano, imitación extracto de cereza, extracto de chocolate, extracto de limón puro, extracto de naranja pura, extracto de menta pura, miel, imitación de extracto de piña, imitación de extracto de ron, imitación de extracto de fresa, o extracto de vainilla; o aceites volátiles, tales como aceite de bálsamo, esencia de laurel, aceite de bergamota, aceite de madera de cedro, aceite de cereza, aceite de canela, aceite de clavo, o aceite de menta; mantequilla de maní, sabor de chocolate, migajas galleta de vainilla, caramelo de mantequilla, caramelo, y mezclas de los mismos. Las cantidades de agente saborizante puede variar mucho dependiendo del agente aromatizante utilizado. El tipo y cantidad de agente saborizante se puede seleccionar como es conocido en la técnica.

Las composiciones nutricionales de la presente divulgación pueden incluir opcionalmente uno o más emulsionantes que se pueden agregar para la estabilidad del producto final. Ejemplos de emulsionantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, lecitina (por ejemplo, de huevo o de soja), alfa lactalbúmina y/o mono-y di-glicéridos, y mezclas de los mismos. Otros emulsionantes son fácilmente evidentes para el experto en la técnica y la selección del emulsionante apropiado dependerá, en parte, de la formulación y producto final.

Las composiciones nutricionales de la presente divulgación pueden incluir opcionalmente uno o más conservantes que también pueden ser agregados para extender la vida útil del producto. Los conservantes apropiados incluyen,

pero no se limitan a, sorbato de potasio, sorbato de sodio, benzoato de potasio, benzoato de sodio, calcio disódico EDTA, y mezclas de los mismos.

Las composiciones nutricionales de la presente divulgación pueden incluir opcionalmente uno o más estabilizadores. Los estabilizantes apropiados para su uso en la práctica de la composición nutricional de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, goma arábica, goma ghatti, goma karaya, goma de tragacanto, agar, furcellarano, goma guar, goma gellan, goma de algarrobo, pectina, pectina de metoxilo baja, gelatina, celulosa microcristalina, CMC (carboximetilcelulosa de sodio), hidroxipropil metilcelulosa metil celulosa, hidroxipropil celulosa, DATEM (siglas en inglés para, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono-y diglicéridos), dextrano, carrageninas, y mezclas de los mismos.

Las composiciones nutricionales de la divulgación pueden proporcionar apoyo nutritivo mínimo, parcial o total. Las composiciones pueden ser suplementos nutritivos o sustitutos de las comidas. Las composiciones pueden, pero no necesariamente, ser nutricionalmente completas. En una realización, la composición nutricional de la divulgación es nutricionalmente completa y contiene tipos y cantidades de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales apropiados. La cantidad de lípidos o grasas puede variar normalmente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7 g/100 kcal. La cantidad de proteína puede variar normalmente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos normalmente puede variar desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 14 g/100 kcal.

En algunas realizaciones, la composición nutricional de la presente divulgación es una leche de crecimiento. Las leches de crecimiento son bebidas a base de leche fortificadas destinadas a niños mayores de 1 año de edad (normalmente desde 1-6 años de edad). No existen alimentos médicos y no están previstos como un sustituto de una comida o un suplemento para tratar una deficiencia nutricional particular. En cambio, leches de crecimiento están diseñadas a servir como un complemento a una dieta variada para proporcionar un seguro adicional que un niño alcanza la ingesta continua, diaria de vitaminas y minerales esenciales, macronutrientes más componentes de las dietas funcionales adicionales, tal como nutrientes no esenciales que tienen supuestas propiedades promotoras de salud.

Las composiciones nutricionales mencionadas anteriormente son capaces de promover la expresión del gen de la enzima fase II en lactantes o niños. En algunas realizaciones, las composiciones adicionalmente promueven y/o modulan la expresión de la proteína de enzima fase II en lactantes o niños. En algunas realizaciones, la composición nutricional se diseña para trabajar en conjunto con una dieta regular, todos los días con el fin de apoyar la programación metabólica en pacientes pediátricos. El efecto de programación metabólica se puede evidenciar a lo largo de la niñez, así como la edad adulta, proporcionando de este modo una mayor protección contra xenobióticos nocivos durante toda la vida del sujeto. La enzima de fase II mencionada anteriormente puede ser, sin limitación, transferasas de glutatona, glucuronosiltransferasas UDP, NAD(P)H: oxireductasa quinina 1, sulfotransferasas, N- & O- metil transferasas o mezclas de los mismos.

La composición exacta de una fórmula para lactante o leche de crecimiento o de otra composición nutricional de acuerdo con la presente divulgación pueden variar de mercado a mercado, dependiendo de las regulaciones locales e información de ingesta alimentaria de la población de interés. En algunas realizaciones, las composiciones nutricionales de acuerdo con la divulgación consisten en una fuente de proteína de leche, tales como leche entera o descremada, además de azúcar y edulcorantes para conseguir las propiedades sensoriales deseadas o, y vitaminas y minerales agregados. La composición de grasa normalmente se deriva de las materias primas de la leche. La proteína total puede ser dirigida para que se iguale con la de la leche humana, leche de vaca o un valor más bajo. Carbohidrato total es generalmente dirigido a proporcionar poca azúcar agregada, tal como sacarosa o fructosa, como sea posible para lograr un sabor aceptable. Por lo general, la vitamina A, el calcio y la vitamina D se agregan a niveles que se igualan con el aporte de nutrientes de la leche de vaca regional. De lo contrario, en algunas realizaciones, las vitaminas y los minerales se pueden agregar en niveles que proporcionan aproximadamente el 20% de la ingesta dietética de referencia (DRI, por sus siglas en inglés) o 20% de la cantidad diaria recomendada (DV, por sus siglas en inglés) por porción. Mas aun, los valores de nutrientes pueden variar entre los mercados en función de las necesidades nutricionales identificadas de la población objetivo, contribuciones de materias primas y regulaciones regionales.

En una realización, la presente invención se refiere a un suplemento para una mujer embarazada o lactante que comprende una composición nutricional que tiene una composición como se defina en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el suplemento promueve la expresión de gen de la enzima fase II en un feto de la mujer embarazada o en un lactante de la mujer lactante. Los fitonutrientes pueden comprender cualquiera de los fitonutrientes mencionados anteriormente y mezclas de los mismos. Cuando se administra al lactante o mujer lactante, el suplemento es capaz de promover la expresión del gen de la enzima fase II en un lactante de la mujer lactante, o en un feto de la mujer embarazada. Enzimas de fase II de ejemplo incluyen, sin limitación, GST, UGT, NQO1, sulfotransferasas, N- & O-metil transferasas y mezclas de los mismos. El suplemento adicional puede ser administrado a una mujer que puede quedar embarazada.

- 5 En una realización, el suplemento para las mujeres embarazadas puede comprender adicionalmente cualquiera de los nutrientes adicionales, que incluye vitaminas, minerales y ácidos grasos, que son útiles en la promoción de la salud de la mujer embarazada o lactante y su lactante. En una realización de la presente invención, el complemento dietético prenatal contiene entre aproximadamente 0.1 y 10 mg de ácido fólico. En otra realización de la invención, el complemento dietético prenatal contiene entre aproximadamente 0.3 y 5 mg de ácido fólico. En una realización particular, el suplemento dietético prenatal contiene entre aproximadamente 0.4 y 1 mg de ácido fólico. En aún otra realización, el complemento dietético prenatal contiene entre aproximadamente 400 y 700 µg por día. En una realización particular, el suplemento dietético prenatal contiene aproximadamente 600 µg por día.
- 10 El suplemento dietético prenatal de la invención puede ser administrado en una o más dosis al día. En algunas realizaciones, el suplemento dietético prenatal se administra en dos dosis diarias. En una realización separada, se administra el suplemento dietético prenatal en tres dosis diarias.
- 15 Cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral es contemplada por la invención. Ejemplos de tales formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a píldoras, comprimidos, cápsulas, líquidos, concentrados líquidos, polvos, elixires, soluciones, suspensiones, emulsiones, pastillas, perlas, pastas, y combinaciones de los mismos. Alternativamente, el suplemento dietético prenatal de la invención se puede agregar a un producto nutricional más completo. En esta realización, el producto alimenticio puede contener proteína, grasa, y componentes de carbohidratos y puede ser utilizado para complementar la dieta o puede ser utilizado como única fuente de nutrición.
- 20 La presente divulgación también proporciona métodos para la programación metabólica de las enzimas de fase II. En una realización, la divulgación se refiere a un método no terapéutico de promover la expresión de gen de enzima fase II en un sujeto pediátrico, que comprende administrar al sujeto una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11. En una realización, el método promueve adicionalmente expresión de la proteína de enzima fase II en el sujeto pediátrico. El fitonutriente administrado al sujeto puede incluir cualquiera de los fitonutrientes mencionados anteriormente y combinaciones de los mismos. En una realización, el método proporciona una mayor protección de los xenobióticos durante la infancia, cuando el sujeto pediátrico se convierte en un adulto, o ambos. La enzima de fase II puede ser, sin limitación, seleccionada del grupo que consiste en glutatona transferasa, glucuronosiltransferasa UDP, NAD(P)H:oxireductasa quinina 1, sulfotransferasas, N- & O-metil transferasas y una mezcla de los mismos.
- 25 El sujeto pediátrico puede ser un niño o un lactante. Por ejemplo, el sujeto puede ser un niño o lactante que varía de 0 a 3 meses, aproximadamente de 0 a 6 meses, de 0 a 12 meses, 3 a 6 meses, o de 6 a 12 meses. El sujeto puede ser alternativamente un niño con edades de 1 a 13 años de 1 a 6 años o de 1 a 3 años. En una realización, la composición se puede administrar al sujeto pediátrico prenatalmente, durante la lactancia, y durante la niñez.
- 30 La presente divulgación también proporciona un método terapéutico para promover la expresión de gen de enzima de fase II en un lactante de una mujer lactante, que comprende administrar a la mujer lactante una cantidad efectiva de una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y alimentar al lactante con leche de la mujer lactante. En una realización, el método promueve adicionalmente la expresión de proteína de enzima fase II. El lactante puede alimentarse directamente de la mujer lactante, o la leche de la mujer lactante se puede expresar y luego administrar al lactante.
- 35 La presente divulgación también proporciona un método no terapéutico para promover la expresión del gen de enzima fase II en un feto, que comprende administrar a una mujer embarazada una cantidad efectiva de una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11. En otra realización, la divulgación proporciona un método no terapéutico para promover la expresión de la proteína de enzima fase II en un feto, que comprende administrar a una mujer embarazada una cantidad efectiva de una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 40 Las enzimas fase II en los métodos de programación metabólicos incluyen, sin limitación, transferasas glutatona, UDP-glucuronosiltransferasa, reductasa NAD(P)H: quinina, sulfotransferasas, N- & O- metil transferasas y mezclas de los mismos.
- 45 Aunque no esté limitado por ninguna teoría particular, se considera que los métodos actuales proporcionan efectos de programación metabólicos en lactantes y niños que mejorarán ventajosamente la capacidad de los sujetos a metabolizar xenobióticos durante toda la vida. Por ejemplo, mediante la promoción de genes de enzimas fase II y la expresión de proteínas en los primeros años de vida, tales como el periodo prenatal, durante la lactancia y la niñez, el sujeto puede tener aumento de protección de xenobióticos potencialmente nocivos a lo largo de la infancia y/o
- 50 adultez. La capacidad mejorada para metabolizar y retirar xenobióticos proporcionara de esta manera aumento de protección contra enfermedades y afecciones que son moduladas por xenobióticos nocivos.
- 55 Los fitonutrientes se seleccionan del grupo que consiste de un polifenol, un carotenoide, un isotiocianato, o una mezcla de los mismos. El polifenol puede ser, sin limitación, seleccionado del grupo que consiste de flavonoles, flavanoles, flavanonas, chalconas, flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, proantocianinas, cianidinas, y mezclas de los mismos. El carotenoide puede ser, sin limitación, seleccionado del grupo que consiste en luteína, zeaxantina,
- 60
- 65

astaxantina, licopeno, beta-caroteno, alfa-criptoxantina, gamma-caroteno, alfa-criptoxantina, alfa-beta-criptoxantina y mezclas de los mismos. El isotiocianato puede ser, sin limitación, seleccionado del grupo que consiste de sulforafano, fenetilisotiocianato, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, la composición nutricional comprende entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 70 mg de isotiocianato por litro. En algunas realizaciones, la fuente de fitonutrientes no comprende soja. En todavía otras realizaciones, el fitonutriente no es un isoflavanoide de soja.

La composición nutricional comprende aproximadamente 50 hasta aproximadamente 1300 nmol/L del fitonutriente. En algunas realizaciones, la composición nutricional comprende entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 700 mg/L del fitonutriente. Por otra parte, la composición nutricional puede comprender aproximadamente 50 hasta aproximadamente 400 nmol/L de quercetina. En otra realización, la composición proporciona aproximadamente 5 hasta 50 mg/d de sulforafano. En determinadas realizaciones, la composición comprende entre 0.01 y 70 mg/L de por lo menos un isotiocianato, como sulforafano. En algunas realizaciones, la composición nutricional está formulada para proporcionar entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 300 mg/d del componente de fitonutriente. En algunas realizaciones, la composición nutricional está formulada para proporcionar entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 170 mg/d de flavan-3-oles, tales como catequinas, y en determinadas realizaciones, la composición nutricional está formulada para proporcionar entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 150 mg/d flavonoles, tal como quercetina.

Se proporcionan ejemplos para ilustrar algunas realizaciones de la composición nutricional de la presente divulgación, pero no se deben interpretar como limitación de la misma. Otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones aquí serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la consideración de la especificación o práctica de la composición nutricional o métodos divulgados aquí. Está previsto que la especificación, junto con el ejemplo, se considera que es sólo a modo de ejemplo, con el alcance y el espíritu de la divulgación es indicado por las reivindicaciones adjuntas que siguen a los ejemplos.

EJEMPLOS

Efectos de fitoquímicos en la expresión de la enzima fase II en células de fibroblastos de piel primaria humana

Materiales: El sulforafano (4-metilsulfonilbutil isotiocianato; pureza, 98%) se adquiere de LKT laboratories (Alexis Biochemicals, RU), mientras que la catequina y la quercetina se adquirieron de Sigma (RU). Para los ensayos de citotoxicidad celular se obtiene reactivo WST-1 de Roche, (RU), mientras que para el kit cuantitativo PCR Bioscript RT, hexámeros aleatorios, inhibidor de RNasa y el kit de reactivos de mezcla maestra se adquieren de Bioline, Promega, Invitrogen y el diseño de cebador respectivamente. Se obtiene GSTA1 policlonal de conejo de Calbiochem y se obtiene NQO1 y UGT1A policlonal de cabra de Santa Cruz. Todos los otros materiales y reactivos se adquieren de Sigma Aldrich, RU, a menos que se especifique lo contrario.

Cultivo celular: células de fibroblastos de piel humana primaria normales de 1 mes de edad (CCD-32sk), 2 años de edad (CCD-1092sk) y Adultos (142Br) se obtuvieron de ATCC y ECACC. Todas las células se cultivan en MEM con GluteMAX-1 (GIBCO) medio suplementado con 10% de FBS (v/v), 1% de antibióticos y 1% de NEAA (GIBCO) mantenido a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las células son medios cambiados cada 48 horas o subcultivados como sea apropiado y se utilizan dentro de los 10 pasajes.

Ensayo de citotoxicidad: se evalúa la citotoxicidad celular después del tratamiento fitoquímico mediante el ensayo de WST-1 que mide la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Se dividen sales de tetrazolio mediante deshidrogenasas de células viables para producir formazán y se detecta el cambio de absorbancia. En resumen, las células se cultivan en 2x10⁴/pozo en una placa de 96 pozos y se dejan adherir durante la noche. Las células se tratan luego durante 24 horas con 5, 10, 25, 50 o 100 µM de sulforafano, catequina o quercetina más control sin tratamiento. Al final de los períodos de tratamiento, se agrega 10 µl de reactivo WST-1 a cada pozo, y la placa se incuba durante 2 hr a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire, 5% de CO₂. La absorbancia se mide en 450 nm y el promedio de los tres pozos blanco que contienen medio y reactivo WST-1 se restan de cada lectura de absorbancia. Los valores resultantes se utilizan para análisis de datos.

Extracción de ARN y análisis por PCR TaqMan en tiempo real: El ARN celular total se aisló utilizando un Kit de ARN GenElute Mammalian Total (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total es cuantificado (proporción 260/280nm) utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Labtech International, UK) y hasta 1 µg de ARN se transcribe de forma reversa utilizando el kit Bioscript RT más hexámeros aleatorios y la expresión del inhibidor RNasa OUT del ARNm se determina mediante PCR TaqMan en tiempo real utilizando el Sistema de detección de secuencia 7500 PRISM ABI (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se llevan a cabo en una placa de 96 pozos utilizando el kit de reactivo de mezcla maestra en un volumen total de 25 µl/pozo que consiste de 1 o 5 ng de muestra como sea apropiado, se etiqueta una sonda de 100 nmol/L con tinte indicador 5' FAM (6-carboxifluoresceína) e inhibidor 3' TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) y 200 nmol/L de cebadores directos e inversos. Se construyen curvas estándar con diluciones en serie de la muestra de control y se analizaron utilizando el software ABI. Se normalizaron los datos contra un gen constitutivo, arn RIBOSOMICO 18S. La expresión de gen es cuantificada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en el que el plegado de inducción = $2^{-\Delta\Delta Ct_{(control)} - Ct_{(treatment)}}$ (Livak, K.J., Schmittgen, T.D.,

Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001. 25, 402-408).

5 Preparación de extractos de proteínas e inmunotransferencia: se lavan células de control y tratadas dos veces con solución salina reguladora con fosfato enfriada con hielo (PBS, por sus siglas en inglés) y después se incubaron durante 30 minutos en la solución reguladora Nonidet P-40 (NP-40) (20 mM de Tris-HCl, pH 8, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 1%) que contiene un comprimido de cóctel inhibidor de proteasa libre de mini-EDTA completa (Roche) en 10 ml de solución reguladora. Las células se recogen por raspado y el homogeneizado se centrifuga a 13.684 g a 4°C durante 15 min. Los sobrenadantes se recogieron y se congelaron a -80°C. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando reactivo de Bradford (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 20 µg de lisado de proteínas se resolvió por un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirió sobre membranas de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad) con una célula de transferencia semi seca (Trans-Blot; Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C con leche en polvo libre de grasa Marvel (5% p/v), Tween 20 (0.05%, v/v) en PBS. Las proteínas de interés se visualizaron mediante la exposición de las membranas a anticuerpos primarios en la leche durante 2 horas a temperatura ambiente. Las diluciones de los anticuerpos son GSTA1 policlonal de conejo, 1:2000, NQO1 policlonal de cabra 1:1000 y UGT1A policlonal de cabra 1:1000. Después de que las membranas de incubación de anticuerpos primarios son incubadas con anticuerpo secundario conjugado con HRP apropiado y las señales se detectan utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorado (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel β-actina se determina como control de carga y las bandas se visualizaron utilizando un generador de imágenes Fujifilm LAS3000.

25 Análisis estadístico: El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico SPSS (versión 13.1). Para evaluar los efectos de diversos tratamientos, se utiliza una prueba de ANOVA de una sola vía seguido por la prueba t post hoc. Las diferencias se consideraron significativas si $P < 0.05$. Los resultados se expresan como la media con EEM de tres experimentos separados a menos que se indique lo contrario.

Resultados

30 Citotoxicidad de quercetina, catequina y sulforafano: En modelos celulares in vitro de la primera infancia (1 mes y 2 años de edad) y un modelo adulto comparativo se utilizan para evaluar los efectos de la quercetina, catequina y sulforafano en la expresión de enzima de fase II. Un intervalo de concentraciones de fitoquímicos (1-100 µM) se aplican a cada modelo de células para examinar la respuesta de dosis y determinar las concentraciones óptimas para futuros experimentos. Experimentos de viabilidad celular WST-1 demostraron que las células aisladas de donantes de 1 mes (figura 1A) y adultos (figura 1C) toleran hasta concentraciones de 50 µM de todos los fitoquímicos candidatos con por lo menos 80% de viabilidad. Las células aisladas del donador de 2 años de edad (figura 1B) toleran hasta concentraciones de 50 µM de quercetina y catequina con por lo menos 80% de viabilidad. Pero, la incubación con sulforafano induce la muerte celular significativa en el intervalo de concentración de 50 y 100 µM. Sobre la base de estos datos futuros experimentos se llevaron a cabo a 5, 10 y 20 µM para evitar los efectos nocivos de las dosis altas de fitoquímicos en las células.

45 La quercetina afecta diferencialmente las enzimas de ARNm fase II en modelo celular de 1 mes de edad: Células del modelo de 1 mes de edad incubadas con quercetina (figura 2A barras negras) demuestran sobrerregulación respuesta de dosis significativa ARNm GST (3.9 veces) y NQO1 (7.2 veces) en comparación con el control ($P < 0.05$). Del mismo modo, y en la concentración más alta de células de quercetina (20 µM) del modelo de célula adulta también demuestran la sobrerregulación de GST (7.4 veces) y UGT (5.5 veces) (figura 2A barras abiertas). En contraste, las células obtenidas del modelo de células de 2 años no muestran cambios significativos en la expresión de ARNm GST, UGT o NQO1 en toda la concentración de quercetina probada (figura 2A barras grises).

50 Expresión ARNm GST y NQO1 en estirpes celulares infantiles se sobrerregula positivamente en respuesta a la catequina: Las células del modelo de células de adulto (figura 2B barras abiertas) demuestran la sobrerregulación de respuesta de dosis de ARNm GST y NQO1 en respuesta al tratamiento con catequina UGT exhibiendo también un aumento. El modelo de célula de 1 mes de edad exhibe un aumento significativo en la expresión de ARNm GST (3.7 veces), pero la expresión ARNm NQO1 y UGT no se ve afectada. El modelo de célula de 2 años de edad exhibe un aumento significativo en la expresión NQO1 (4.5 veces) después del tratamiento de catequina.

60 Las estirpes celulares para lactantes exhiben la expresión significativamente incrementada de ARNm NQO1 después del tratamiento de sulforafano: Las células del modelo de célula de adulto (figura 2C barras abiertas) demuestran un aumento significativo en niveles de ARNm GST, UGT y NQO1; en los modelos de células de lactantes, en particular, aumentos significativos en NQO1 (6-35 veces de aumentos) se observaron después del tratamiento de sulforafano (figura 2C barras negras y grises) en comparación con el control. La expresión de ARNm para GST también se incrementa significativamente en respuesta a sulforafano en modelos de células de lactantes, pero no en la misma medida como NQO1.

65 Expresión de proteínas en modelos de células de lactantes: En el modelo de célula de un mes de edad, la expresión NQO1, UGT y GST no demuestran respuestas significativas a los tres fitoquímicos aparte de sulforafano, que

- demuestra la inducción significativa de la expresión de UGT (figura 3A). En el modelo de célula de 2 años, la expresión de proteínas de todas las enzimas es inducida por sustancias fitoquímicas con excepción de la quercetina en 10 μ M. Adicionalmente, las proteínas de UGT, GST y NQO1 son significativamente sobreexpresadas en respuesta a dosis mayores de catequina y sulforafano (figura 3B). En el modelo de célula de adulto, se observa
- 5 sobreexpresación significativa de la expresión de proteína NQO1 en respuesta a sulforafano y dosis mayores de tratamientos de quercetina y catequina (figura 3C). La expresión de UGT se ve afectada por el tratamiento de sulforafano mientras que la expresión de GST aumenta en respuesta tanto a quercetina y catequina (figura 3C).
- 10 La discusión de las referencias de este documento pretende solamente resumir las afirmaciones hechas por sus autores y nos e hace admisión de que cualquier referencia constituye técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho a cuestionar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición nutricional a base de leche para uso en la promoción de la expresión del gen del enzima fase II en un sujeto pediátrico, la composición, comprende:
 - 5 una fuente de grasa,
 - una fuente de carbohidratos,
 - una fuente de proteínas, y
 - una fuente de fitonutrientes que comprende un polifenol, un isotiocianato, un carotenoide o una mezcla de los mismos, en el que la composición comprende 50 a 1300 nmol/L de la fuente de fitonutrientes.
- 10 2. La composición nutricional a base de leche de la reivindicación 1, en el que la composición promueve adicionalmente la expresión de proteína de enzimas de fase II.
3. La composición nutricional a base de leche de la reivindicación 2, en el que la enzima de fase II se selecciona del grupo que consiste de transferasa glutationa, UDP-glucuronosiltransferasa, NAD(P)H:quinona óxidoreductasa 1, sulfotransferasas, N- & O-metil transferasas y una mezcla de las mismas.
- 15 4. La composición nutricional a base de leche de la reivindicación 1, en el que el polifenol se selecciona del grupo compuesto de flavonoles, flavonoles, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas, chalconas, flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, proantocianidinas, cianidinas, y mezclas de los mismos.
5. La composición nutricional a base de leche de la reivindicación 1, en el que el carotenoide se selecciona del grupo que consiste de luteína, zeaxantina, astaxantina, licopeno, betacaroteno, alfacaroteno, gamma caroteno, alfa criptoxantina, beta criptoxantina y mezclas de los mismos.
- 20 6. La composición nutricional a base de leche para uso de la reivindicación 1, en el que el isotiocianato se selecciona del grupo consistente en sulforafano, fenetilisotiocianato, y mezclas de los mismos.
7. La composición nutricional a base de leche para uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende de 500 a 2000 nmol/L de catequinas.
- 25 8. La composición nutricional a base de leche para uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende 50 a 400 nmol/L de quercetina.
9. La composición nutricional a base de leche para uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende de 0.01 a 70 mg/L de sulforafano.
- 30 10. La composición nutricional a base de leche para uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un prebiótico.
11. La composición nutricional a base de leche para uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente β -glucano.
12. Un método no terapéutico para promover la expresión de gen de enzima fase II en un sujeto pediátrico, que comprende administrar al sujeto una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 35 13. Un método no terapéutico para promover la expresión de gen de enzima fase II en un lactante de una mujer lactante, que comprende administrar a la mujer lactante una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y alimentar al lactante con leche materna de la mujer lactante.
- 40 14. Un método no terapéutico para promover la expresión de gen de enzima fase II en un feto, que comprende administrar a una mujer embarazada una cantidad efectiva de una composición nutricional que tiene una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 45 15. Un suplemento para una mujer lactante o embarazada, el suplemento comprende una composición nutricional que tiene una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el suplemento es capaz de promover la expresión de gen de enzima fase II en: (a) un feto de la mujer embarazada, o (b) un lactante de la mujer lactante

FIG. 1A

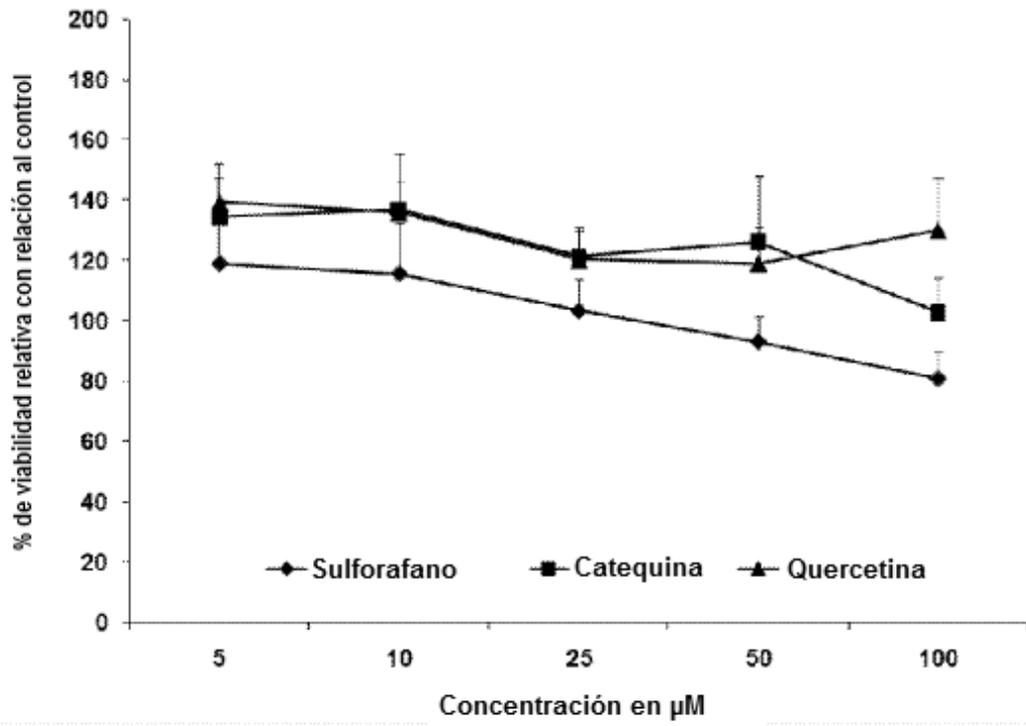


FIG. 1B

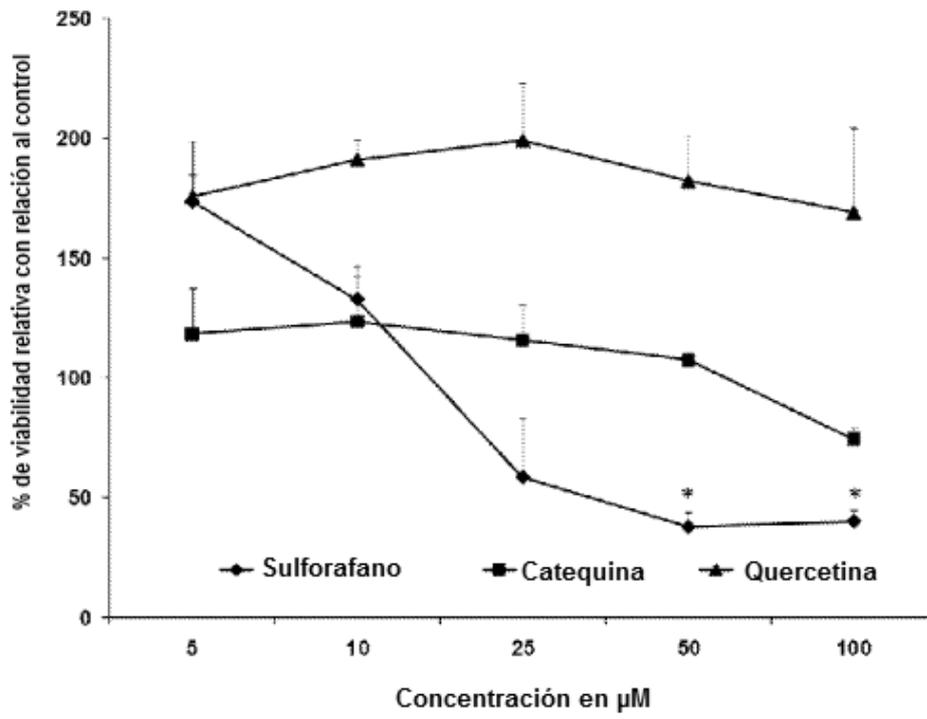


FIG. 1C

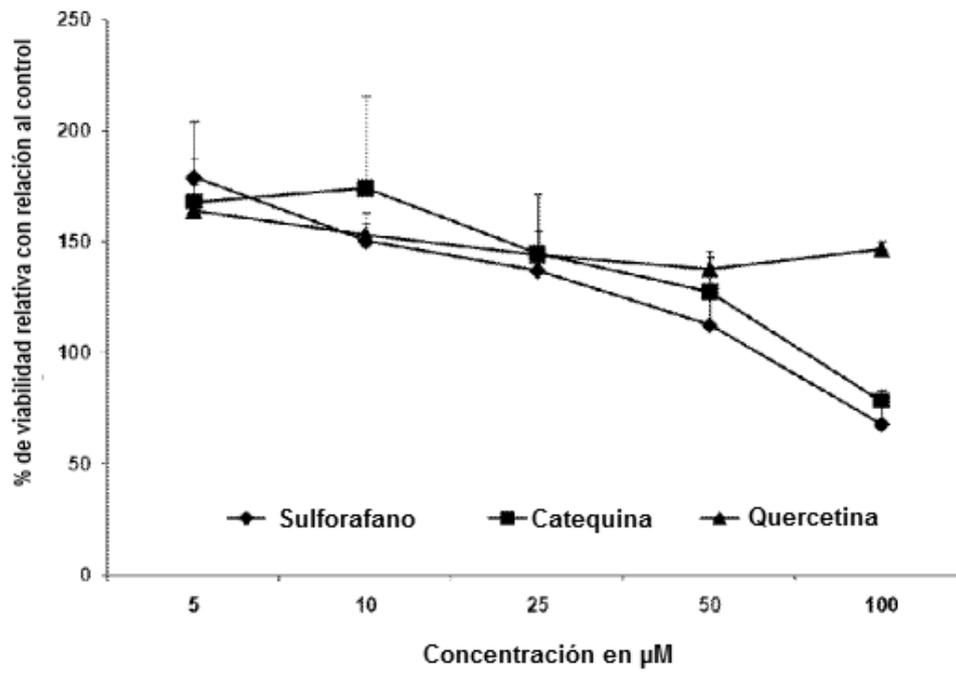


FIG. 2A

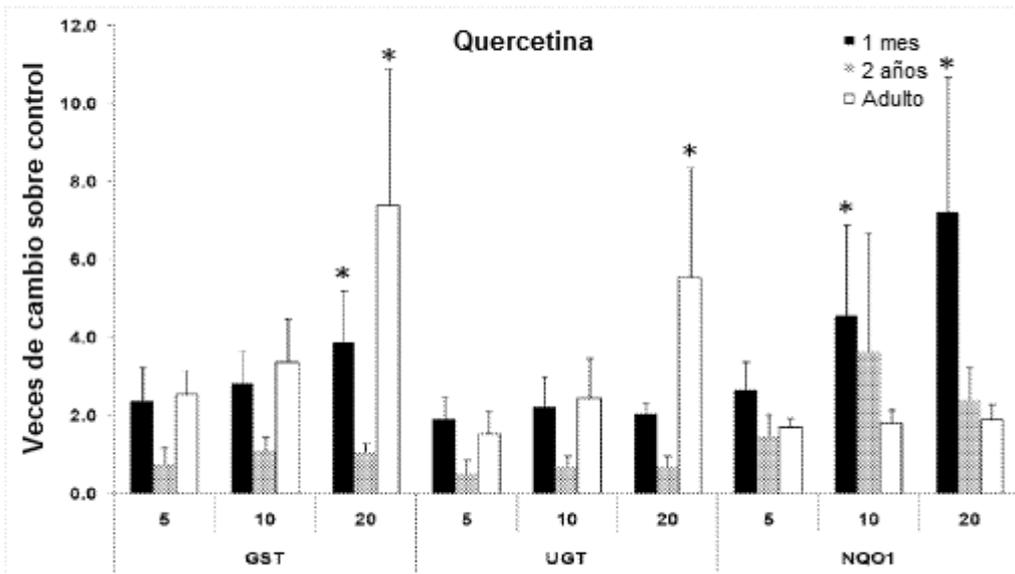


FIG. 2B

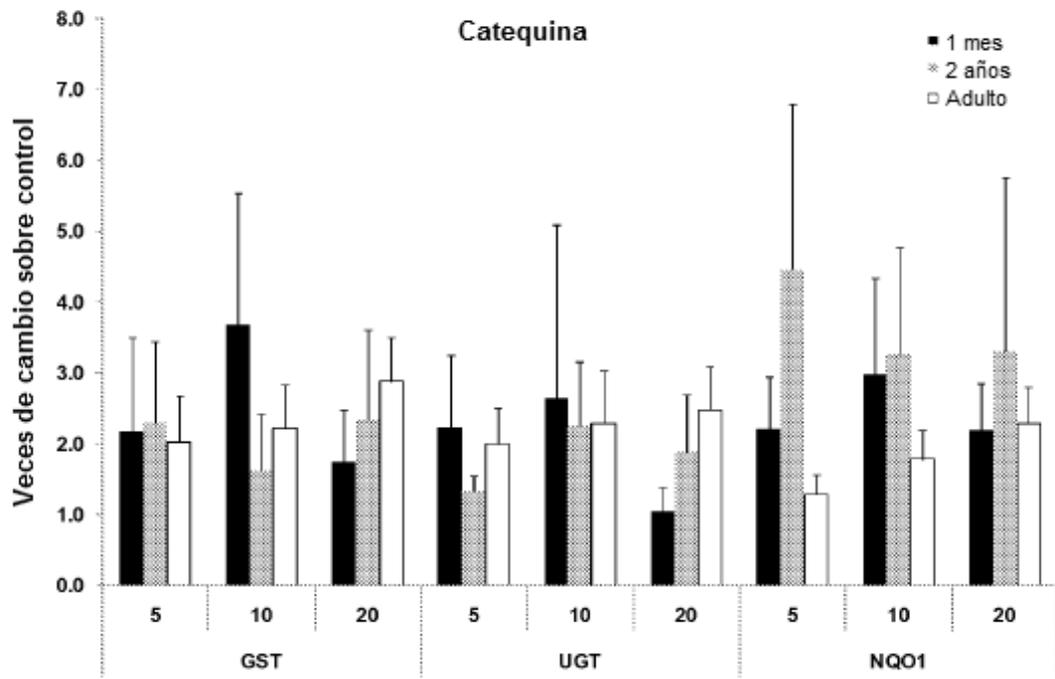


FIG 2C

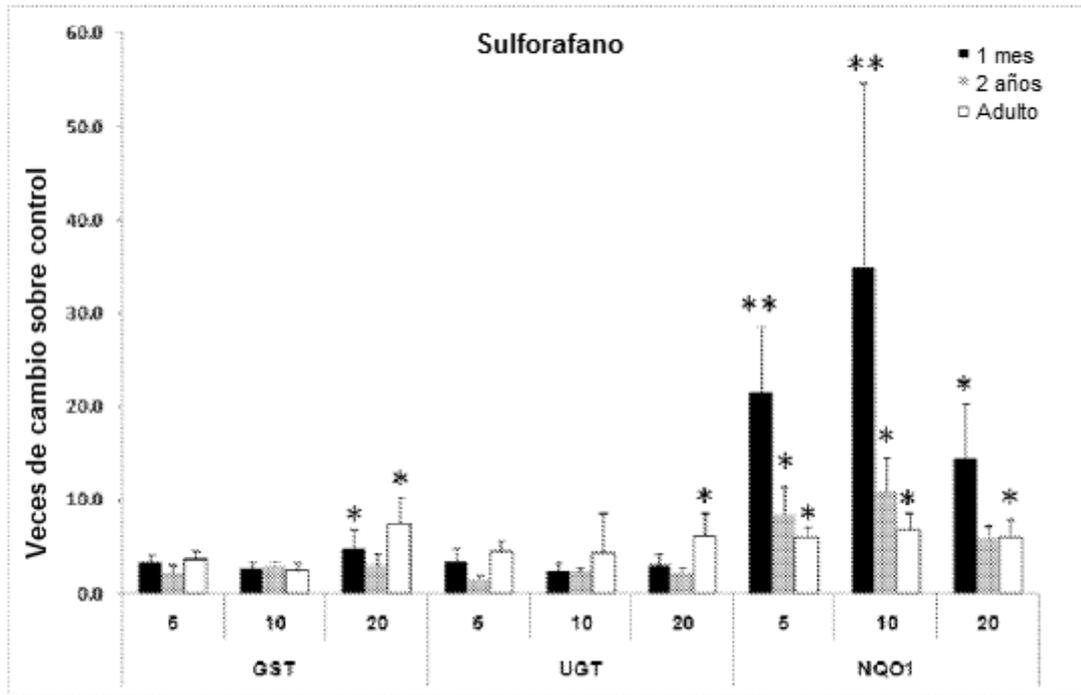


FIG. 3A

Expresión de proteína de enzimas fase II en modelo de células de un mes de edad

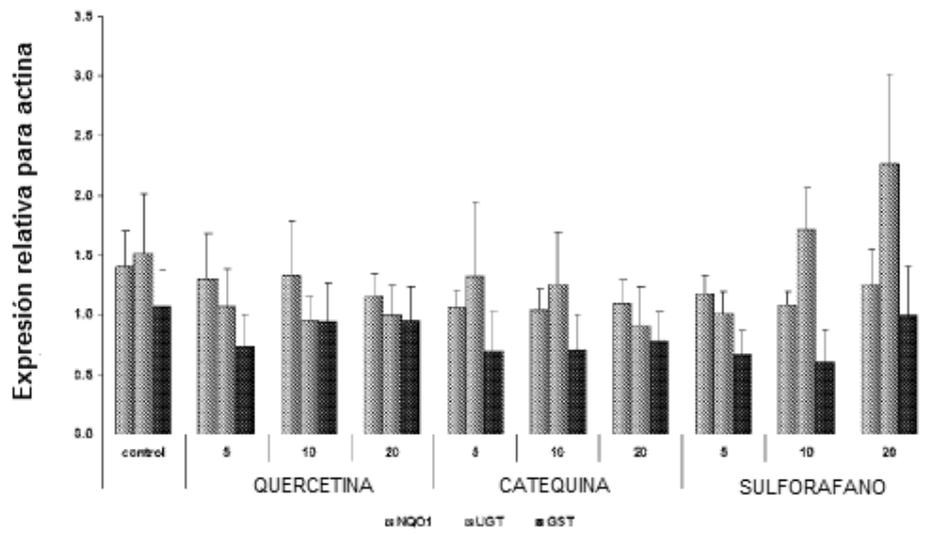
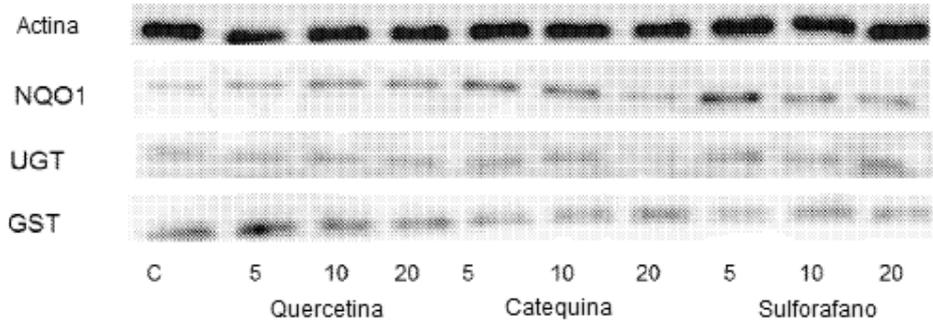


FIG. 3B

Expresión de proteína de enzimas fase II en modelo de células de dos años de edad

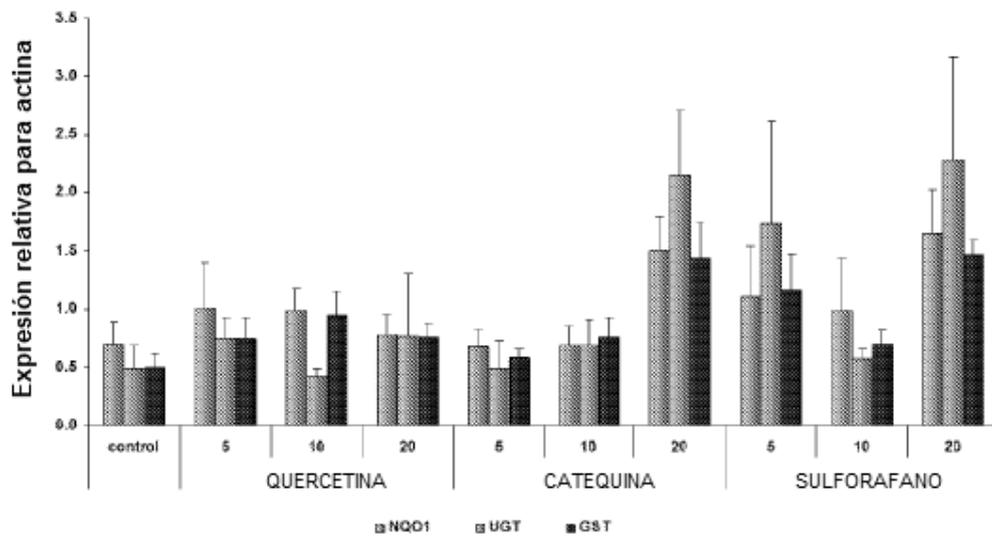
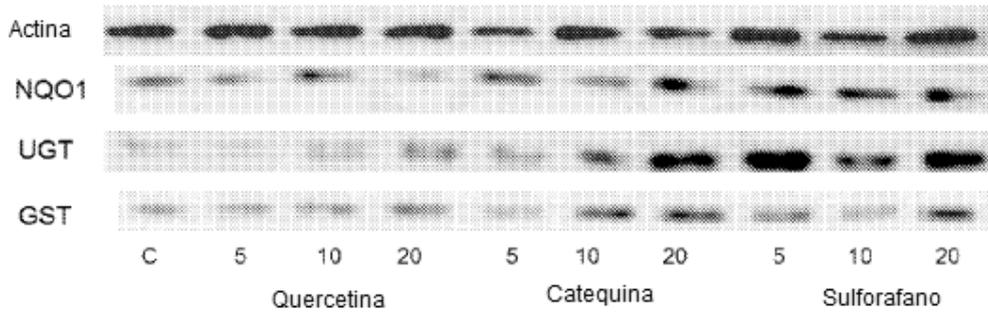


FIG. 3C

Expresión de proteína de enzimas fase II en modelo de células de adulto

