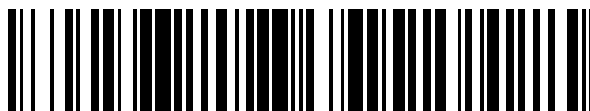


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 700**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61K 31/10	(2006.01) A61P 9/00	(2006.01)
A61K 31/19	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61K 31/231	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
A61K 31/232	(2006.01) A61P 19/00	(2006.01)
A61K 31/685	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A23J 3/34	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A23J 1/04	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)	
A61P 3/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2005** **E 10183765 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2275140**

54 Título: **Composición que comprende aceites vegetales y/o de pescado y entidades de ácidos grasos no oxidables**

30 Prioridad:

19.07.2004 NO 20043091
19.07.2004 NO 20043093
17.12.2004 NO 20045544

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2018

73 Titular/es:

BERGEN TEKNOLOGIOVERFØRING AS (100.0%)
Thormøhlensgate 51
5006 Bergen, NO

72 Inventor/es:

BERGE, ROLF KRISTIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 660 700 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 que comprende aceites vegetales y/o de pescado y entidades de ácidos grasos no oxidables

Campo de invención

5 La presente invención se refiere a una combinación de un material proteico, un aceite de pescado y una entidad de ácido graso no β -oxidable para uso en enfermedades cardiovasculares. Más específicamente, el uso es para la prevención y/o tratamiento de hipercolesterolemia y enfermedades negativamente afectadas por niveles altos de colesterol, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes, hígado graso, dislipemia, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, trombosis, estenosis, estenosis secundaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, presión arterial elevada, disfunción endotelial, estado procoagulante, síndrome de ovario poliquístico y el síndrome metabólico.

Antecedentes de la invención

15 En solicitudes de patente anteriores, el inventor ha descrito aplicaciones beneficiosas de análogos de ácidos grasos no β -oxidables utilizados en el tratamiento y prevención de obesidad (NO 2000 5461), diabetes (NO 2000 5462), estenosis primaria y secundaria (NO 2000 5463), cáncer (NO 2002 5930), trastornos proliferativos de la piel (NO 2003 1080), trastornos inflamatorios y autoinmunes (NO 2003 2054). En otras solicitudes de patente anteriores, el inventor ha descrito aplicaciones beneficiosas de materiales proteicos, que incluyen un material proteico unicelular (NO 2003 3082) y un hidrolizado de proteína de pescado (NO 2003 3078).

20 Sorprendentemente, los presentes inventores han mostrado que el uso de una combinación de entidades de ácidos grasos no β -oxidables con un material proteico y un aceite de pescado tiene efectos biológicos beneficiosos sinérgicos. Los inventores muestran que la combinación de entidades de ácidos grasos no β -oxidables con un material proteico disminuye la concentración de colesterol en plasma, triglicéridos y fosfolípidos, y aumenta la actividad de la acil CoA oxidasa grasa. Además, los inventores describen cómo las entidades de ácidos grasos no β -oxidables y un material proteico se pueden añadir directamente al pienso. El pienso es digerible y ha mostrado efectos sorprendentes sobre la composición de ácidos grasos de los animales. En base a estos hallazgos inesperados, se anticipa que la combinación de entidades de ácidos grasos no β -oxidables y un material proteico y un aceite de pescado tendrá un mayor efecto preventivo y/o terapéutico sobre todas las enfermedades contra las que las entidades de ácidos grasos no β -oxidable son eficaces, en comparación con la de las entidades de ácido graso solo.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere a una preparación que comprende una combinación de:

- 1) un material proteico, y
- 2) un aceite de pescado, y
- 35 3) una entidad de ácido graso no β -oxidable representada por la fórmula general $R''\text{-COO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R}'$, donde X es un átomo de azufre, un átomo de selenio, un átomo de oxígeno, un grupo SO o un grupo SO_2 ; n es un número entero de 0 a 11; y R' es un grupo alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, en donde la cadena principal de dicho R' contiene de 13 a 23 átomos de carbono y opcionalmente uno o más heterogrupos seleccionados del grupo que comprende un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de selenio, un átomo de oxígeno, un grupo SO y un grupo SO_2 , y R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono,

45 en donde el material proteico es hidrolizado de proteína de pescado para uso en seres humanos para la prevención y/o tratamiento de hipercolesterolemia y enfermedades afectadas negativamente por niveles altos de colesterol, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes, hígado graso, dislipemia, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, trombosis, estenosis, estenosis secundaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, disfunción endotelial, estado procoagulante, síndrome de ovario poliquístico y el síndrome metabólico.

El material proteico es un hidrolizado de proteína de pescado.

En un aspecto preferido, el aceite de pescado comprende ácidos grasos poliinsaturados.

50 Durante la β -oxidación, un ácido graso enzimáticamente oxidado se escinde entre los carbonos 2 y 3, (cuando se cuenta desde el extremo carboxílico del ácido graso), que da como resultado la eliminación de los dos átomos de carbono a uno u otro lado del sitio de oxidación como ácido acético. Esta etapa se repite luego sobre los dos carbonos del ácido graso más corto, y se repite otra vez hasta que el ácido graso se haya oxidado por completo. La β -oxidación es la vía habitual en que la mayoría de ácidos grasos se catabolizan *in vivo*. El bloqueo de la β -oxidación se logra mediante la inserción de un grupo no oxidable en la posición X en la fórmula. Debido a que el mecanismo para la β -oxidación es bien conocido, X se define como S, O, SO, SO_2 o Se. Cualquier experto en la técnica

supondría, sin hacer uso de actividad inventiva, que estos compuestos bloquearían la β -oxidación de la misma manera.

Además, los compuestos pueden contener más de un obstáculo, es decir, además de X, R' puede comprender opcionalmente uno o más heterogrupos seleccionados del grupo que comprende un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de selenio, un átomo de oxígeno, un grupo SO y un grupo SO₂. Como ejemplo, se puede insertar dos o tres azufres como X para inducir un cambio en la degradación del ácido graso y, por lo tanto, un efecto modulado. Múltiples átomos de azufre también podrían modular la polaridad y la estabilidad en cierta medida. Desde un punto de vista farmacológico, generalmente es deseable poder presentar un espectro de compuestos en lugar de solo un compuesto para evitar o contrarrestar los problemas de resistencia.

Además de la identidad de X, su posición también es un problema. La distancia de X desde el extremo carboxílico del ácido graso está definida por cuántos grupos CH₂ están situados entre X y el extremo carboxílico del ácido graso, que está definido por (CH₂)_{2n+1}, donde n es un número entero de 0 a 11. Por lo tanto, hay un número impar de grupos CH₂, es decir; la posición de X con respecto al grupo carboxilo es tal que X eventualmente bloquea la β -oxidación. El intervalo de n se elige para incluir todas las variaciones del análogo de ácido graso que tiene el efecto biológico deseado. Dado que la β -oxidación en teoría puede funcionar en moléculas infinitamente largas, n podría ser infinito, pero en la práctica esto no es así. Los ácidos grasos que normalmente sufren β -oxidación son generalmente de 14 a 24 átomos de carbono de largo, y esta longitud es, por lo tanto, la más ideal para sufrir β -oxidación enzimática. Los intervalos de n y R' se dan por lo tanto para que las entidades de ácido graso cubran este intervalo. (Asimismo, la opción ii) de fórmulas (I) y (II) y definen R para tener de 1 a 25 grupos de carbono, y la opción i) de fórmula (II) definen el grupo alquilo para contener de 1 a 23 átomos de carbono, para ser análogos a compuestos naturales). El número total de átomos de carbono en la cadena principal de ácido graso está preferiblemente entre 8 y 30, más preferiblemente entre 12 y 26. Este intervalo de tamaños también es deseable para la absorción y el transporte a través de las membranas celulares.

Aunque todos los análogos de ácidos grasos con un posicionamiento impar del bloqueador X de la β -oxidación esté lejos de la β -oxidación del extremo carboxílico, la extensión de su efecto biológico puede ser variable. Esto se debe a la diferencia en el tiempo de degradación biológica de los diversos compuestos. Los inventores han realizado experimentos para mostrar el efecto de mover X más lejos del extremo carboxílico del ácido graso. En estos experimentos, la actividad (en nmol/min/mg/proteína) de la β -oxidación mitocondrial en el hígado de análogos de ácidos grasos se midió con azufre en las posiciones 3, 5 y 7 con respecto al extremo carboxilo. Las actividades fueron 0,81 para el azufre en la 3^a posición, 0,61 para el azufre en la 5^a posición, 0,58 para el azufre en la 7^a posición y 0,47 para el ácido palmítico, el control de bloqueo sin β -oxidación. Esto muestra, como se esperaba, que la β -oxidación está de hecho bloqueada por análogos de ácidos grasos con una posición variable del bloque, y que el efecto de la misma disminuye cuanto más lejos del extremo carboxílico se encuentre el bloque, ya que la β -oxidación tarda más en llegar al bloque, por lo que la mayoría del análogo de ácido graso ya está degradado para entonces. Sin embargo, aunque la disminución es grande al pasar de la 3^a a la 5^a posición, pero pequeña al pasar de la 5^a a la 7^a posición, es razonable suponer que esta disminución seguirá siendo menor a medida que se desplace por la cadena, y por lo tanto que estará muy lejos de hecho antes de que no se observe ningún efecto en absoluto (comparado con el control).

Aunque las entidades de ácidos grasos como se describen con un bloque en la posición X no pueden sufrir β -oxidación, todavía pueden sufrir ω -oxidación. Este es un proceso biológico mucho menos común y más lento, que oxida el ácido graso no desde el extremo carboxílico, sino más bien desde el grupo metilo/cabeza hidrofóbica, denominado en la presente memoria R'. En esta vía, el átomo de carbono en el extremo ω del ácido graso es hidroxilado por un miembro de la familia de enzimas citocromo P450. Este ácido graso hidroxilado se convierte entonces en un aldehído mediante una alcohol deshidrogenasa, y posteriormente este aldehído se convierte en un grupo carboxilo mediante una aldehído deshidrogenasa. Como consecuencia, el producto final de la vía es un ácido graso dicarboxílico, que se puede degradar además mediante ω -oxidación a partir del extremo ω .

Se cree que la ω -oxidación es la vía principal para la degradación de las entidades de ácidos grasos como se describe con un bloque en la posición X. Por lo tanto, se realizaron experimentos donde R' se cambió para bloquear la ω -oxidación, introduciendo un triple enlace en el extremo metilo del análogo de ácido graso. Esto dio como resultado el análogo de ácido graso 3-tia-15-heptadecino, que cuando se ensayó mostró el resultado esperado: un tiempo de degradación sustancialmente aumentado *in vivo*. Esto es importante para el uso de las entidades de ácidos grasos en la preparación farmacéutica, ya que puede potenciar los efectos de las entidades de ácidos grasos β -oxidables al retardar aún más su degradación.

De nuevo, como con el bloqueo de la β -oxidación, es común encontrar otras entidades de ácidos grasos que bloquearían la ω -oxidación exactamente de la misma manera, en base al conocimiento de cómo se produce la ω -oxidación. Un doble enlace tendrá, por ejemplo, exactamente el mismo efecto que el triple enlace, y por lo tanto se incluye en la definición del grupo terminal metilo/cabeza hidrofóbica de la molécula, denominado en la presente memoria R', que puede ser saturado o insaturado. Una ramificación también puede bloquear la oxidación, por lo que R' se define como lineal o ramificada.

Para bloquear la ω -oxidación mediante la inserción de un sustituto en R', dicho R' puede estar sustituido en una o

varias posiciones con heterogrupos seleccionados del grupo que comprende un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de selenio, un átomo de oxígeno, un grupo CH₂, un grupo SO y un grupo SO₂. R' también puede estar sustituido con uno o más compuestos seleccionados del grupo que comprende fluoruro, cloruro, hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, alquiltio C₁-C₄, aciloxi C₂-C₅ o alquilo C₁-C₄.

- 5 Los análogos grasos modificados son ácidos grasos análogos a los ácidos grasos naturales, que no son capaces de ser β-oxidados, o lípidos naturales que comprenden dichos análogos de ácidos grasos. *In vivo*, las entidades de ácidos grasos muestran una fuerte preferencia por ser incorporadas a los fosfolípidos.

10 La vía de la β-oxidación de ácidos grasos es la vía principal para el metabolismo de grasas. La reacción inicial y limitante de la velocidad se lleva a cabo en los peroxisomas del hígado mediante acil-CoA oxidasa. La acil-CoA oxidasa cataliza la deshidrogenación de tioésteres de acil-CoA a la correspondiente trans-2-enoil CoA. Los presentes inventores han utilizado previamente un ácido tetradeciltioacético (TTA) análogo de ácido graso para ensayar los diversos efectos biológicos de los ácidos grasos. En la descripción actual, se ensayó su efecto sobre la acil-CoA oxidasa, así como el efecto de un material proteico, solo o en concurrencia.

15 El material proteico específico ensayado en la presente memoria es un material proteico de soja fermentada. También estamos en el proceso de ensayar un material proteico unicelular y un hidrolizado de proteína de pescado. Aunque estos materiales son complejos y contienen más que solo proteína, es la parte proteica la que creemos que actúa como el ingrediente activo, potenciando los efectos beneficiosos de los ácidos grasos no β-oxidables. En base a los resultados con el material proteico de soja fermentada descrito en la presente memoria, esperamos resultados similares para el material proteico unicelular y el hidrolizado de proteína de pescado.

20 Cuando se ensaya la actividad de la actividad de la acil-CoA oxidasa, el TTA solo mostró un gran aumento en la actividad en comparación con el control negativo. El material proteico de soja fermentada solo casi no tenía actividad. Pero cuando el TTA y el material proteico de soja fermentada se utilizaron juntos, la actividad de la acil-CoA oxidasa fue más del doble en comparación con la actividad de TTA solo. Esta potenciación de TTA como activador de la acil-CoA oxidasa mediante un material proteico de soja fermentada es bastante inesperada. Ciertamente, no se puede explicar por un efecto aditivo de TTA más el material proteico de soja fermentada; el efecto sinérgico inesperado es demasiado fuerte.

25 También se ensayó el efecto de entidades de ácidos grasos no β-oxidables sobre los niveles de fosfolípidos en plasma, así como el efecto del material proteico de soja fermentada, solo o en concurrencia con TTA. TTA disminuyó el nivel de fosfolípidos en comparación con el control, mientras que el material proteico de soja fermentada en realidad aumentó un poco los niveles de fosfolípidos. Pero cuando el TTA y el material proteico de soja fermentada se utilizaron juntos, el nivel de fosfolípidos fue, sorprendentemente, mucho más bajo que el de TTA solo. Esta potenciación de TTA como un agente reductor de fosfolípidos en plasma mediante un material proteico de soja fermentada es bastante inesperada. Como con la actividad de la acil-CoA oxidasa, tampoco se puede explicar por un efecto aditivo del TTA más el material proteico de soja fermentada.

35 También se ensayó el efecto de las entidades de ácidos grasos no β-oxidables sobre los niveles de colesterol en plasma, así como el efecto del material proteico de soja fermentada, solo o en concurrencia con TTA. Los efectos del aceite de pescado también fueron ensayados, solos, con TTA, con el material proteico de soja fermentada, o con TTA y el material proteico de soja fermentada. El TTA solo mostró una disminución bastante significativa de los niveles de colesterol en plasma, y el material proteico de soja fermentada o el aceite de pescado solo también mostraron un efecto hipocolesterolémico. El material proteico de soja fermentada y el aceite de pescado también mostraron un efecto hipocolesterolémico mayor que el de cualquiera de los dos por separado. Cuando se añadió aceite de pescado o el material proteico de soja fermentada al TTA, el efecto hipocolesterolémico fue sorprendentemente mayor que el de TTA solo. Cuando los tres componentes; TTA, aceite de pescado y el material proteico de soja fermentada, se añadieron al mismo tiempo, el efecto hipocolesterolémico fue el mayor. Esta sinergia entre TTA, aceite de pescado y el material proteico de soja fermentada es bastante inesperada.

40 Se mostró que TTA reduce el nivel de triglicéridos en plasma aumentando el número de mitocondrias y estimulando la β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos saturados e insaturados normales a cuerpos cetónicos (Froyland L et al. (1997) J Lipid Res 38: 1851-1858). Se descubrió que este efecto se potenció además inesperadamente por la adición del material proteico de soja fermentada. En estos experimentos, los resultados para la proteína de soja fermentada fueron bastante llamativos e inesperados. TTA, como se esperaba, redujo el nivel de triglicéridos. La proteína de soja fermentada sola en realidad aumentó el nivel de triglicéridos en un 30% en comparación con el control, pero aún así potenció el efecto hipotrigliceridemiante de TTA en un 50%. Estos efectos sinérgicos también son muy inesperados.

45 Se ensayó el efecto de alimentar al salmón del Atlántico con un pienso que comprende análogos de ácidos grasos no β-oxidables, componentes de alimentación comunes y un material proteico de soja fermentada. En el ejemplo 2.1, el pienso para peces se compuso de recubrimiento de gránulos de pienso comunes con aceite de pescado que incluye TTA y un material proteico de soja fermentada. Este pienso se utilizó luego en el ejemplo 2.2 como suministro de alimento para el salmón del Atlántico, y la presencia de TTA tuvo efectos beneficiosos sobre el producido así en comparación con el pescado alimentado con pienso equivalente sin TTA (ejemplos 2.3 y 2.4).

Los gránulos de pienso comunes utilizados comprendían principalmente harina de pescado, algo de trigo y un aditivo de vitaminas y minerales. El aceite utilizado para el recubrimiento de los gránulos era de origen marino, de capelán, y tenía diversas cantidades de TTA mezclados. La Tabla 1 describe la formulación y la composición química de las dietas. Esta es una alimentación común, muy adecuada para las especies de ensayo (en este ejemplo, salmón del Atlántico), que tras la adición de TTA muestra efectos beneficiosos. Como se mostró previamente en esta aplicación, el TTA administrado junto con proteína tiene un efecto beneficioso adicional en comparación con TTA solo. El hecho de que este pienso común sea alto en grasas y proteínas y bajo en carbohidratos probablemente aumentó los efectos beneficiosos de TTA sobre el TTA que se administró solo, o en una dieta con más carbohidratos.

En el ejemplo 2.4, se determinaron los efectos de un material proteico específico, un material proteico de soja fermentada. El material proteico de soja fermentada es el resultado de una fermentación de granos de soja. Comprende proteínas de soja e isoflavonas modificadas y no modificadas, así como otros componentes de la soja.

La Tabla 2 describe la composición de ácidos grasos de las dietas. Solo hubo pequeñas diferencias en la composición de ácidos grasos de las dietas (todas contenían casi el 100% de aceite de pescado), el porcentaje de ácidos grasos n-3 (AG) fue casi igual. Las dietas enriquecidas con TTA, sin embargo, condujeron a cambios sustanciales en el porcentaje de composición de ácidos grasos n-3 de los fosfolípidos (FL), triacilgliceroles (TAG) y ácidos grasos libres (AGL) de branquias, corazón e hígado de salmón del Atlántico. La administración de TTA durante las 8 semanas también dio como resultado un porcentaje reducido de AG saturados en casi todas las fracciones de lípidos. El porcentaje de AG n-3, especialmente DHA, aumentó en las branquias y el corazón, como se puede ver en el ejemplo 2.3.

Los salmones del Atlántico alimentados con dietas que contienen TTA crecieron a una velocidad menor que los peces alimentados con la dieta control. El nivel de lípidos corporal en los peces alimentados con dietas enriquecidas con TTA fue significativamente menor que en los peces alimentados con la dieta de control.

Existen beneficios para la salud del pez en sí siendo alimentados con un pienso según la invención. Los peces viejos pueden experimentar esclerosis arterial y dar como resultado problemas de salud como a los humanos, y una disminución de los lípidos tendrá un efecto beneficioso sobre esto.

En general, la carne magra se considera beneficiosa en la mayoría de especies animales criadas para el consumo. Por lo tanto, el efecto de disminuir los niveles de lípidos totales es en sí mismo ventajoso. Además, los cambios específicos en la composición de ácidos grasos son particularmente positivos. Es ampliamente reconocido que consumir menos ácidos grasos saturados es saludable, y un consumo aumentado de n-3 se ha asociado con multitud de beneficios para la salud, desde la reducción de la probabilidad de enfermedades del corazón a efectos antiinflamatorios e incluso a bebés más inteligentes.

Otros productos animales obtenidos a partir de animales alimentados con el pienso de la presente invención también pueden tener efectos beneficiosos. Como ejemplo, el aceite de pescado así obtenido tendría una composición nutricional ventajosa en comparación con el aceite de pescados alimentados con dietas comerciales. Otros productos, como las pieles de los peces, también pueden tener efectos beneficiosos teniendo en cuenta que se mejora la composición corporal total.

El nivel de ácidos grasos en la sangre normalmente está determinado por las tasas relativas de lipólisis y esterificación en el tejido adiposo y la absorción de ácidos grasos en los músculos. En los músculos, los ácidos grasos inhiben la absorción y oxidación de la glucosa. El aumento de los niveles de ácidos grasos y triacilglicerol en la sangre y los músculos se correlaciona por lo tanto con obesidad y resistencia a la insulina, así como con una capacidad reducida para metabolizar glucosa (Olefsky JM (2000) J Clin Invest 106:467-472; Guerre-Millo M et al. (2000) J Biol Chem 275:16638-16642). Hemos mostrado la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y la disminución de la concentración de ácidos grasos en plasma obtenidas por entidades de ácidos grasos no β -oxidables y un material proteico, u opcionalmente también que comprende un componente de aceite. Así, anticipamos que las composiciones se pueden utilizar para prevenir y tratar resistencia a la insulina y enfermedades causadas por la misma (Shulman GI (2000) J Clin Invest 106(2):171-176). Se comprobó que TTA previene completamente la resistencia a la insulina y la adiposidad inducida por una dieta alta en grasas y reduce la adiposidad, hiperglucemia y sensibilidad a la insulina en ratas obesas (Madsen M y col., (2002) J Lipid Res 43 (5):742-50). Debido a los inesperados resultados sinérgicos encontrados por los inventores utilizando tanto TTA como un material proteico, y opcionalmente también aceite, sin estar ligados a ninguna teoría específica de por qué los resultados son como se muestran, ahora esperamos que esta combinación sea aún más efectiva en el tratamiento de estas enfermedades. También esperamos que TTA sea potenciado por un material proteico, y opcionalmente también aceite, en el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados que incluyen presión arterial elevada, niveles de lípidos y colesterol elevados, disfunción endotelial, estado procoagulante, síndrome de ovario poliquístico y el síndrome metabólico.

La familia de receptores activados por proliferadores de peroxisomas, por sus siglas en inglés (PPAR) son reguladores pleiotrópicos de funciones celulares tales como proliferación celular, diferenciación y homeostasis lipídica (Ye JM et al. (2001) Diabetes 50:411-417). La familia PPAR se compone de tres subtipos; PPAR α , PPAR β y PPAR γ . El TTA es un potente ligando de PPAR α (Forman BM, Chen J, Evans RM (1997) Proc Natl Acad Sci

- 94:4312-4317; Gottlicher M et al. (1993) *Biochem Pharmacol* 46:2177-2184; Berge RK et al. (1999) *Biochem J* 343 (1):191-197, y también activa PPAR β y PPAR γ (Raspe E et al. (1999) *J Lipid Res* 40:2099-2110). Como activador de PPAR α , TTA estimula el catabolismo de los ácidos grasos aumentando su absorción celular. La disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos con TTA provocó un desplazamiento en el metabolismo celular del hígado hacia el catabolismo de ácidos grasos regulado por PPAR α en las mitocondrias. (Graf HJ et al. (2003) *J Biol Chem* 278(33):30525-33). Mientras que el efecto de TTA sobre los triacilglicéridos plasmáticos es directo mediante activación de PPAR α , que se demuestra mediante la abolición de este efecto en ratones con el gen PPAR α inactivado, el aceite de pescado reduce los triacilglicéridos plasmáticos incluso en ratones con el gen inactivado (Dallongeville J et al. (2001) *J Biol Chem* 276:4634-4639).
- 5 El suplemento con ácidos grasos poliinsaturados n-3 dietéticos como los encontrados en el aceite de pescado estimulan la actividad acil-CoA oxidasa peroxisomal hepática y por lo tanto la oxidación de ácidos grasos en el hígado y en menor medida en el músculo esquelético (Ukropec J et al. 38 (10):1023-9). Se ha mostrado que una dieta rica en aceite de pescado aumenta tanto la actividad como los niveles de ARNm de enzimas de oxidación de ácidos grasos mitocondriales y peroxisomales hepáticas (Hong DD et al. (2003) *Biochim Biophys Acta: Mol Cell Biol Lipids* 1635(1):29-36). El aceite de pescado indujo un aumento en la abundancia de acil-CoA oxidasa peroxisomal en el hígado pero no en los músculos de ratas, y los autores plantean la hipótesis de que esto se debe a que los ácidos grasos n-3 protegen contra la resistencia a insulina inducida por grasa proporcionando unos ligandos de PPAR α , que inducen la proliferación de peroxisomas hepáticos (no intramusculares). La expresión del gen PPAR α no cambió. (Neschen S et al. (2002) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E395-E401).
- 10 Como se puede observar en los párrafos anteriores, los detalles bioquímicos de cómo exactamente TTA, un material proteico, y opcionalmente aceite influyen en el metabolismo de las grasas, no se conocen en detalle. Los efectos pueden o no ser a través de las mismas vías, tanto el TTA como los aceites pueden, por ejemplo, actuar como ligandos de PPAR α , o independientemente de PPAR α . Si trabajan a través de las mismas vías, no se esperaría que TTA fuera potenciado por los aceites, porque TTA es un fuerte activador de PPAR α que cabría esperar que saturara completamente la activación de PPAR α . Incluso obtener un efecto aditivo del efecto de TTA más el aceite cuando se combinan sería entonces inesperado. Se sabe aún menos sobre cómo la proteína influye en la β -oxidación u otros aspectos del metabolismo de grasas. Por lo tanto, no se pueden predecir los efectos de administrar tanto un material proteico como TTA al mismo tiempo. Sin embargo, obtener un efecto sinérgico por encima del efecto aditivo, como se observa para TTA y el material proteico de soja fermentada en todos los ensayos, es muy sorprendente. Las entidades de ácidos grasos β -oxidables tienen muchos efectos, y no sabemos cómo se producen todos, pero basados en los resultados inesperados, esperamos que todos sean potenciados por los materiales proteicos y, opcionalmente, los aceites sin estar ligados a ninguna teoría específica.
- 20 Los ligandos PPAR afectan la proliferación de varias líneas celulares cancerosas. Se ha detectado que TTA en particular reduce la proliferación de muchas líneas celulares cancerosas (Berge K et al. (2001) *Carcinogenesis* 22:1747-1755; Abdi-Dezfuli F et al. (1997) *Breast Cancer Res Treat* 45:229-239; Tronstad KJ et al. (2001) *Biochem Pharmacol* 61:639-644; Tronstad KJ et al. (2001) *Lipids* 36:305-313). Esta reducción está relacionada con la reducción en los niveles de triacilglicérol (Tronstad KJ et al. (2001) *Biochem Pharmacol* 61:639-649), y está mediada tanto por vías dependientes como independientes de PPAR (Berge K et al. (2001) *Carcinogenesis* 22:1747-1755). Dado que la proteína de soja fermentada mejora la capacidad de TTA para reducir los niveles de triacilglicérol, es por lo tanto muy probable que también mejore los efectos antiproliferativos de TTA, que hace de esto una mejora sobre la capacidad de prevención y tratamiento del cáncer de TTA. La TTA se puede utilizar para la prevención y/o tratamiento del cáncer, que incluye la inhibición de: neoplasmas primarios y secundarios, el crecimiento de tumores, la invasión de un tumor primario en tejido conectivo y la formación de tumores secundarios (NO 2002 5930).
- 35 En general, los agonistas de PPAR modulan la respuesta inflamatoria. TTA modula la respuesta inflamatoria deprimiendo la liberación de la citoquina inflamatoria interleucina-2 y suprimiendo la proliferación estimulada por PHA de células mononucleares periféricas (Aukrust P et al. (2003) *Eur J Clin Invest* 33(5):426-33). La modulación de la citoquina mediante TTA puede ser mediada por PPAR o a través de niveles de prostaglandina alterados o por modificación de la transducción de señal mediada por lípidos, que también es el mecanismo de acción propuesto para los ácidos grasos poliinsaturados, como los encontrados en los aceites. Ahora que los inventores han detectado los resultados inesperados, esperan por lo tanto que el material proteico y el aceite de pescado, en combinación con entidades de ácidos grasos no β -oxidables, potencien el efecto de las entidades de ácidos grasos en los trastornos inflamatorios, que incluyen los trastornos mediados por el sistema inmunológico tales como artritis reumatoide, vasculitis sistémica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, dermatomiositis, polimiositis, diversos trastornos endocrinos autoinmunes (p. ej., tiroiditis y adrenalitis), diversos trastornos neurológicos mediados por el sistema inmunológico (por ejemplo, esclerosis múltiple y miastenia gravis), diversos trastornos cardiovasculares (p. ej., miocarditis, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriosclerosis y angina de pecho estable e inestable, y granulomatosis de Wegener), enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, colitis no específica, pancreatitis, nefritis, colestasis/fibrosis del hígado, y rechazo de aloinjerto agudo y crónico después de trasplante de órganos, así como trastornos proliferativos de la piel como psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria, dermatitis de contacto alérgica, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidérmica, queratosis pre-malignas inducidas por el sol, y seborrea, y enfermedades que tienen un componente inflamatorio tales como p. ej., enfermedad de Alzheimer o función cognitiva deteriorada/mejorable.
- 60

Leyendas de las figuras

La Figura 1 muestra que el aumento en la actividad de acil-CoA graso mediante TTA se potencia por el material proteico de soja fermentada.

5 La Figura 2 muestra que el efecto de disminución de fosfolípidos de TTA se potencia por el material proteico de soja fermentada.

La Figura 3 muestra que el efecto hipocolesterolémico de TTA se potencia por el material proteico de soja fermentada y el aceite de pescado.

La Figura 4 muestra que los efectos hipotrigliceridémicos de TTA se potencian por el material proteico de soja fermentada.

10 Definiciones utilizadas en la aplicación

Animales

15 En este contexto, el término "animales" incluye mamíferos tales como humanos y animales de granja (agrícola), especialmente animales de importancia económica tales como aves gallináceas, mamíferos bovinos, ovinos, caprinos y porcinos, especialmente aquellos que producen productos aptos para el consumo humano, tales como carne, huevos y leche. Además, el término está dirigido a incluir pescado y marisco, tales como salmón, bacalao, tilapia, almejas, ostras, langosta o cangrejos. El término también incluye animales domésticos tales como perros y gatos.

Alimentación animal

20 El término pienso se refiere a la comida para animales (como se define anteriormente). El pienso generalmente comprende cantidades apropiadas de grasas, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales necesarios para el sustento del animal receptor previsto, y puede comprender componentes adicionales para la mejora del sabor, textura, color, olor, estabilidad, vida de almacenamiento, etc, o antibióticos u otros componentes añadidos para el beneficio de la salud del animal. El pienso es preferiblemente, pero no necesario, materia seca, más preferiblemente un material granulado. El término pienso también pretende incluir composiciones nutricionales, composiciones veterinarias y/o productos alimenticios funcionales para el consumo animal.

Carne

La palabra carne se refiere a la carne de cualquier animal como se define anteriormente. Por lo tanto, la proteína que contiene carne de mamíferos, aves, peces y marisco se conoce como carne. El término "producto cárnico" se refiere a cualquier producto producido a partir de carne como se define anteriormente.

30 Aceites vegetales y/o de pescado

Estos incluyen todos los aceites de origen vegetal o marino, que incluyen pero no se limitan a aceites grasos o no volátiles, así como a aceites esenciales o volátiles, y cualquier combinación de los mismos. No necesariamente tienen que estar en forma líquida. El aceite de girasol es realmente aceite de la semilla de girasol, no de la flor en sí.

Aceite de pescado

35 Este término incluye todos los aceites de origen marino.

Composición nutricional

40 Este término está destinado a incluir cualquier material ingerible, que incluye, pero no se restringe a suplementos nutricionales, alimentos funcionales, suplementos herbales, etc., para consumo humano o animal. El término también incluye productos alimenticios para consumo humano y forraje para animales, en donde la preparación de la presente invención es un aditivo, y no el ingrediente principal. Esto afecta especialmente al forraje para animales, donde cualquier forraje se puede suplementar con la preparación de la presente invención, para lograr los efectos biológicos de la misma.

Tratamiento

45 En relación con las aplicaciones farmacéuticas, el término "tratamiento" se refiere a una reducción de la gravedad de la enfermedad.

Prevención

El término "prevención" se refiere a la prevención de una enfermedad dada, es decir, se administra un compuesto antes del inicio de la enfermedad. Esto significa que los compuestos se pueden utilizar como agentes profilácticos o como ingredientes en una composición nutricional con el fin de prevenir el riesgo o el inicio de una enfermedad

dada.

Fermentación

La descomposición de sustancias orgánicas por microorganismos o enzimas, que incluye la hidrólisis.

Hidrólisis

- 5 Descomposición enzimática o química donde las moléculas complejas se dividen en unidades más simples mediante una reacción química con agua.

Material proteico unicelular (SCP)

SCP es un material que comprende microorganismos unicelulares. Los microorganismos pueden ser, entre otros, hongos, levaduras y bacterias. El material SCP contiene altas proporciones de proteínas.

- 10 Hidrolizado de proteína de pescado tratado con enzimas (FPH)

El material FPH es un hidrolizado proteico que resulta de un tratamiento enzimático de un material de pescado. El material FPH contiene altas proporciones de proteínas y péptidos.

Material proteico de soja fermentada

- 15 El material proteico de soja fermentada es el resultado de una fermentación de granos de soja. Comprende proteínas e isoflavonas de soja modificadas y no modificadas, así como otros componentes de la soja.

Composición nutricional

- 20 Este término está destinado a incluir cualquier material ingerible, que incluye pero no se restringe a suplementos nutricionales, alimentos funcionales, suplementos herbales, etc., para consumo humano o animal. El término también incluye productos alimenticios para consumo humano y forraje para animales, en donde la composición es un aditivo y no el ingrediente principal. Esto afecta especialmente al forraje para animales, donde cualquier forraje se puede suplementar con la composición, para lograr los efectos biológicos de la misma.

Administración de los compuestos de la presente invención

- 25 Como un medicamento farmacéutico, la preparación de la presente invención se puede administrar directamente al animal mediante cualquier técnica adecuada, que incluye vía parenteral, intranasal, oral o mediante absorción a través de la piel. Se pueden administrar localmente o sistémicamente. La vía de administración específica de cada agente dependerá, p. ej., de la historia clínica del receptor humano o animal.

Los ejemplos de administración parenteral incluyen administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intraperitoneal.

- 30 Como una proposición general, la cantidad farmacéuticamente efectiva total de cada una de las entidades de ácidos grasos no β -oxidables administradas vía parenteral por dosis estará preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg/día a 200 mg/kg/día de peso corporal del paciente para los humanos, aunque, como se señaló anteriormente, esto estará sometido a criterio terapéutico. Una dosis de 5 a 50 mg/kg/día es más preferible. Se prefiere una dosis de 5 - 500 mg/kg/día de material proteico de soja fermentada u otro material proteico, y una dosis de 50 - 300 mg/kg/día es más preferible. Una dosis de 1 a 300 mg/kg/día de aceite de pescado u otro aceite es preferible, y una dosis de 10 a 150 mg/kg/día de aceite de pescado u otro aceite es más preferible.

- 35 Si se administran continuamente, cada uno de los compuestos se administra típicamente mediante 1-4 inyecciones por día o mediante infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, utilizando una mini-bomba. También se puede emplear una solución intravenosa en bolsa. El factor clave para seleccionar una dosis adecuada es el resultado obtenido, medido por la disminución del peso corporal total o la relación entre masa grasa y magra, o por otros criterios para medir el control o la prevención de la obesidad o la prevención de enfermedades relacionadas con la obesidad, como se considere apropiado por el practicante.

- 40 Para administración parenteral, en una realización, la preparación de la presente invención se formula generalmente mezclando cada uno en el grado de pureza deseado, en una forma farmacéutica inyectable de dosis unitaria (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no sea tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y que sea compatible con otros ingredientes de la formulación.

- 45 Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto cada una de las preparaciones de la presente invención de manera uniforme e íntima con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. Luego, si es necesario, el producto se moldea en la formulación deseada. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de tales

vehículos incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles y oleato de etilo también son útiles en la presente memoria, así como los liposomas.

El vehículo puede adecuadamente contener cantidades pequeñas de aditivos tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o PEG.

Para composiciones farmacológicas orales, se puede utilizar tal material de vehículo como, por ejemplo, agua, gelatina, gomas, lactosa, almidones, estearato de magnesio, talco, aceites, polialquén glicol, vaselina y similares. Tal preparación farmacéutica puede estar en forma farmacéutica de dosis unitaria y puede contener adicionalmente otras sustancias terapéuticamente valiosas o adyuvantes farmacéuticos convencionales tales como conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, tampones y similares. Las preparaciones farmacéuticas pueden estar en formas líquidas convencionales tales como comprimidos, cápsulas, grageas, ampollas y similares, en formas farmacéuticas convencionales, tales como ampollas secas, y como supositorios y similares.

Además, la preparación de la presente invención, es decir, el análogo de ácidos grasos β -oxidables, el material proteico y el aceite de pescado se puede utilizar en preparaciones nutricionales, como se definió anteriormente, en cuyo caso la dosis de análogo de ácidos grasos no β -oxidables preferible es como los productos farmacéuticos descritos o menos, mientras que las cantidades de material proteico y aceite son adecuadas preferiblemente para la preparación de alimentos y de piensos. Como parte de una composición nutricional, y especialmente de forraje para animales, el aceite y el material proteico pueden ser una parte sustancial del forraje, y por lo tanto tienen un valor nutricional además de potenciar los análogos de ácidos grasos no β -oxidables. El aceite de pescado puede comprender hasta la totalidad de la grasa en una composición nutricional, y el material proteico de soja fermentada puede comprender hasta la totalidad de la proteína en una composición nutricional. En el forraje para animales, la cantidad de análogo de ácidos grasos no β -oxidables puede ser hasta 10 veces más que en productos para consumo humano, es decir, hasta 2 g/kg/día de peso corporal del animal. Tal forraje para animales se puede utilizar para la alimentación rutinaria de animales. El material proteico de soja fermentada es especialmente útil como proteína funcional en productos alimenticios, particularmente cuando se utiliza como un sustituto para plasma natural en piensos y en alimentos para mascotas. Una composición de pienso también puede comprender ingredientes adicionales tales como grasas, azúcares, sal, aromatizantes, minerales, etc. El producto se puede formar en trozos que se asemejan a trozos de carne natural en apariencia y textura. El producto de la invención tiene las ventajas adicionales de que éste se formula fácilmente para contener los nutrientes necesarios, se digiera fácilmente por los animales y sea apetecible para los animales.

Sección experimental

La preparación de entidades de ácidos grasos no β -oxidables se describe en detalle en las solicitudes de patente noruegas anteriores no. 20005461, 20005462, 20005463 y 20024114 del solicitante. Estos documentos también describen estudios de toxicidad de TTA. La preparación de mono-, di- y triglicéridos y nitrógeno que comprenden los lípidos se describe en detalle en la solicitud de patente de EE.UU. no. 10/484,350. La preparación de fosfolípidos que incluyen serina, etanolamina, colina, glicerol e inositol se describe en detalle en la solicitud de patente noruega anterior no. 20045562 del solicitante. Los resultados experimentales que se dan a continuación han demostrado que el material proteico y/o el aceite potencian sustancialmente los efectos biológicos de los análogos de ácidos grasos no β -oxidables.

Ejemplo 1. Efectos biológicos en ratas

1.1 Preparación del hidrolizado de proteína de pescado (FPH)

Materias primas

El FPH se produjo a partir de restos de carne de pescado sobre las estructuras de los huesos del salmón después del fileteado. Las estructuras sin cabeza del salmón del Atlántico recién fileteado (Salmon Salar, L.) se tomaron directamente de la línea de producción y se congelaron a -20 ± 2 °C: En una semana, las estructuras congeladas se utilizaron en el proceso de hidrólisis enzimática.

Hidrólisis

La hidrólisis enzimática se realizó con Protamex™ a un pH de aproximadamente 6,5 y a una temperatura de 55 ± 2 °C. Protamex™ (E.C. 3.4.21.62/3.4.24.28) es un complejo de proteasa de Bacillus de Novozymes AS (Bagsvaerd, Dinamarca) y cumple con las exigencias de pureza para las enzimas de uso alimentario. La relación de estructuras de salmón con respecto a agua fue 1,14. Se utilizó una relación de enzima con respecto a sustrato de 11,1 UA/kg de proteína bruta en la hidrólisis. Después de 60 min de tratamiento enzimático, la temperatura se elevó a 98 °C, que se

alcanzó después de 105 min.

Purificación

5 Los huesos grandes se retuvieron en el tanque de hidrólisis, mientras que los huesos pequeños se eliminaron filtrando el hidrolizado a través de una malla. A continuación, la fracción insoluble se eliminó en un separador bifásico (Westfalia, Alemania, SC.35-26-177, 15 kW, 7200 rpm), antes de que la mezcla restante se separara en un separador trifásico (Westfalia, Alemania, SB-7-36-+76, 4 kW, 8520 rpm) en aceite de salmón, fracción de emulsión y fracción acuosa. La fracción acuosa se concentró (NitroAtomizer, Dinamarca, Falling Film Evaporator, Ff 100), se filtró a través de una ultramembrana con un límite de peso molecular nominal de 100 000 (PCI membrane systems, UK, PF100, 2,65 m²) y finalmente la fracción filtrada mediante ultramembrana (fracción UF) se secó por atomización (Niro Atomizer, Dinamarca, tower P-63, T_{in} = 200 °C, T_{out} = 84 °C).

Producto final

15 La fracción UF se denomina hidrolizado de proteína de pescado (FPH). El material FPH contiene aproximadamente 83% de proteína, 10% de ceniza y aproximadamente 2% de lípidos, en base al peso seco. Se puede encontrar una caracterización adicional de FPH en la solicitud anterior NO 2003 3078 de los solicitantes. La síntesis de FPH se proporcionó como ejemplo, no para ilustrar la síntesis de todos los materiales proteicos o en su defecto de los hidrolizados de proteína de pescado de la fórmula (I).

1.2 Preparación del material proteico unicelular (SCP)

Materias primas

20 Un cultivo microbiano que comprende *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Ralstonia sp.*, *Brevibacillus agri* y *Aneurinibacillus sp.*, todos comercialmente disponibles en Norferm Dinamarca AS, Odense, Dinamarca, se produce en un fermentador tipo bucle mediante fermentación aerobia continua de gas natural en un medio de sales de amonio/sales minerales (AMS) a 45° C, pH 6,5, y a una tasa de dilución de 0,15 h⁻¹. El medio AMS contiene lo siguiente por litro: 10 mg NH₃, 75 mg H₃PO₄.2H₂O, 380 mg MgSO₄.7H₂O, 100 mg CaCl₂.2H₂O, 200 mg K₂SO₄, 75 mg FeSO₄.7H₂O, 1,0 mg CuSO₄.5H₂O, 0,96 mg ZnSO₄.7H₂O, 120 µg de CoCl₂.6H₂O, 48 µg de MnCl₂.4H₂O, 36 µg de H₃BO₃, 24 µg de NiCl₂.6H₂O y 1,20 µg de NaMoO₄.2H₂O.

Producción

El fermentador se llena con agua que se esterilizó por calor a 125 °C durante 10 segundos. La adición de los diferentes nutrientes se regula según su consumo. La fermentación continua se realiza con 2-3% de biomasa (en peso seco).

30 Un material unicelular se recolecta continuamente y se somete a centrifugación en una centrífuga industrial continua a 3.000 rpm, seguido de ultrafiltración que utiliza membranas que tienen un tamaño de exclusión de 1,66x10⁻¹³ µg. El producto resultante se somete luego a esterilización en un intercambiador de calor a aproximadamente 130 °C durante aproximadamente 90 segundos.

35 Se puede encontrar una caracterización adicional de SSP en la solicitud anterior NO 2003 3082 de los solicitantes. La síntesis de SSP se proporcionó como ejemplo, no para ilustrar la síntesis de todos los materiales proteicos o en su defecto de los materiales de proteína unicelular de fórmula (I).

1.3 Material proteico de soja fermentada

40 El material proteico de soja fermentada es el resultado de una fermentación de granos de soja. Comprende proteínas de soja modificadas y no modificadas e isoflavonas, así como otros componentes de la soja. El material proteico de soja fermentada Gendaxin® está disponible comercialmente en Aximed, Bergen, Noruega.

1.4 Efectos biológicos en ratas

Productos químicos

45 Los productos químicos se obtuvieron a partir de fuentes comerciales comunes y eran de grado reactivo. Se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) como control (negativo). El aceite de pescado estaba disponible comercialmente en Hordafor.

Animales

50 Se compraron ratas Wistar machos que pesaban de 250 a 358 g de AnLab Ltd. (Prahg, The Check Republic.), y se mantuvieron en jaulas de alambre a una temperatura de 22+/-1°C y en una habitación con control de luz (luz de 7 am a 7 pm). No hubo restricciones sobre la ingesta de agua y comida. Tres ratas se mantuvieron en cada jaula. Se monitorizó diariamente el aumento de peso y la ingesta de alimentos.

Dietas

Las ratas se alimentaron con una dieta estándar Chow ST1 (de Velaz, Prahg, La República Checa).

Tratamientos

5 Se permitió que las ratas Wistar machos se aclimataran al nuevo entorno antes del inicio del experimento. Luego se trataron diariamente durante 10 días mediante alimentación por sonda. La CMC se utilizó como vehículo y control negativo. Cada grupo de tratamiento tenía 4 ratas. Los grupos que se trataron con TTA recibieron 150 mg/kg de peso corporal/día disueltos en CMC o aceites. Los grupos que se trataron con aceite de pescado recibieron 3 ml(alrededor de 2,5 g)/kg de peso corporal/día. Los grupos que se trataron con material proteico de soja fermentada recibieron 0,45 g/kg de peso corporal/día. CMC se utilizó como vehículo y control negativo. El día después del último
10 tratamiento, se sacrificaron las ratas.

Sacrificio y recuperación de tejido

15 Las ratas se anestesiaron con una mezcla 1:1 de Hypnorm™ (citrato de fentanilo 0,315 mg/ml y fluanisona 10 mg/ml, Janssen Animal Health) y Dormicum® (midazolam 5 mg/ml, F. Hoffmann-La Roche) inyectada por vía subcutánea. La sangre se extrajo directamente del corazón utilizando una jeringa enjuagada con heparina. El hígado se extrajo inmediatamente, se pesó y se dividió en dos partes, que se enfriaron inmediatamente en hielo o se congelaron en nitrógeno líquido, respectivamente. El plasma y los tejidos se almacenaron a -80°C hasta el análisis. El protocolo se aprobó por el Consejo Estatal Noruego de Experimentos Biológicos con Animales Vivos.

Preparación de fracciones subcelulares hepáticas

20 Los hígados de las ratas se homogeneizaron individualmente en solución de sacarosa al punto de congelación (0,25 mmol/l de sacarosa en 10 mmol/l de tampón HEPES pH 7,4 y 1 mmol/l de EDTA) utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem. El fraccionamiento subcelular de los hígados se realizó como se describió previamente (Berge RK et al. (1984) Eur J Biochem 141:637-44). El procedimiento se realizó a 0-4°C, y las fracciones se almacenaron a -80°C. La proteína se analizó con el kit de ensayo de proteínas BioRad que utiliza albúmina sérica bovina como estándar.

25 Ensayo enzimático

Se midió la actividad de la acil-CoA oxidasa grasa en la fracción de hígado peroxisomal como se describió previamente (Small GM, Burdett K, Connock MJ (1985) Biochem J 227:205-10). Los resultados se dieron como actividad de acil-CoA oxidasa grasa por proteína total, se restó la actividad basal (actividad de control) y los datos que se presentan en la figura 1 se normalizaron para la actividad de TTA.

30 Análisis de lípidos

35 Los lípidos plasmáticos y hepáticos se midieron enzimáticamente en el sistema Technicon Axon (Miles, Tarrytown, NY) que utilizó el kit de triglicéridos de Bayer, colesterol total (Bayer, Tarrytown, NY), y el kit PAP150 para la colina que contienen los fosfolípidos de bioMerieux. Los resultados se dieron por proteína total, y los datos que se presentan en las figuras 2-4 se normalizaron para la actividad del control positivo (sin TTA ni aceites añadidos, es decir, niveles "normales"). Los resultados se dieron por proteína total, y los datos que se presentan en las figuras 2-4 se normalizaron para la actividad del control positivo (sin TTA ni aceites añadidos, es decir, niveles "normales").

Ejemplo 2

Efectos biológicos en el salmón del Atlántico

2.1 Configuración experimental que incluye la preparación del pienso para peces

40 Las dietas experimentales basadas en harina de pescado fueron proporcionadas por EWOS y contenían 0,01% de Y₂O₃ como marcador inerte para la determinación de la digestibilidad (gránulos de 3 mm). La Tabla 1 muestra las formulaciones y composiciones químicas de las tres dietas. Las tres dietas se hicieron a partir de una mezcla de pienso. Las diferentes dietas se obtuvieron al revestir el gránulo de pienso común con los diferentes aceites y mezclas. Las dietas contenían aceite de pescado (aceite de capelán) (Control), aceite de pescado enriquecido con
45 0,5% de TTA (0,5% TTA) o aceite de pescado enriquecido con 1,5% de TTA (1,5% TTA).

Tabla 1: Formulación y composición química de las dietas

Dietas: aceite de pescado (Control), aceite de pescado con 0,5% de TTA (0,5%TTA), aceite de pescado con 1,5% de TTA añadido (1,5%TTA).			
	Control	0,5% TTA	1,5% TTA
<i>Formulación (% del total)</i>			
Harina de pescado, LT	67,8	67,8	67,8
Aceite de capelán ^a	21,3	21	20,7
TTA		0,1	0,3
Trigo	in,4	10,4	10,4
Astax ^b -Cantax ^c	0,06	0,06	0,06
Premezcla de minerales/vitaminas	0,49	0,49	0,49
Óxido de itrio	0,01	0,01	0,01
<i>Composición química</i>			
Materia seca (%)	97,1	96,1	93,8
Proteína (%)	51,9	51,4	49,7
Grasa (%)	26,9	26,7	26,7
Ceniza (%)	10,8	10,4	10
Energía (MJ/kg)	23,8	23,7	23,2
^a Capelin oil, Norsildmel, Norway.			
^b Asta, BASF, lucanthin red.			
^c Canta, lucanthin pink.			

5 La composición de ácidos grasos de las dietas reflejó claramente la del aceite de pescado utilizado (aceite de capelán) (Tabla 2). El aceite de capelán contenía niveles relativamente altos de AG monoinsaturados y también era rico en AG n-3 de cadena larga, 20:5 n-3 (EPA) y 22:6 n-3 (DHA). El pienso, sin embargo, contenía una cantidad significativa de harina de pescado, que contenía n-3 AG, que aseguraba que los niveles de estos AG en la dieta fueran más altos que los del aceite añadido.

Además de las dietas anteriores, se prepararon dietas idénticas pero con 0,5% de Gendaxin y 0% ó 0,9% de TTA (basado en el peso seco total del pienso).

ES 2 660 700 T3

Tabla 2: Composición de ácidos grasos de las dietas

	Control	0,5% TTA	1,5% TTA
<i>Ácidos grasos</i>			
12:0	0,1	0,1	0,1
14:0	6,7	6,6	6,6
15:0	0,3	0,3	0,3
16:0	11,8	11,6	11,5
16:1 n-7	7,1	7	6,9
16:1 n-9	0,4	0,3	0,3
16:2 n-7	0,4	0,4	0,4
17:0	0,1	0,1	0,1
18:0	1,4	1,3	1,3
18:1 n-6	0,4	0,4	0,4
18:1 n-7	3,1	3	3
18:1 n-9	11,5	11,6	11,3
18:2 n-6	2,7	2,7	2,6
18:3 n-6	0,1	0,1	0,1
18:3 n-3	0,7	0,7	0,7
18:4 n-3	2,1	2,1	2,1
TTA		0,5	1,5
20:0	0,1	0,1	0,1
20:1 n-9	0,5	0,5	0,5
20:1 n-11	17,9	17,9	17,7
20:2 n-6	0,2	0,2	0,2
20:3 n-3	nd	nd	nd
20:4 n-3	0,4	0,4	0,4
20:4 n-6	0,3	0,3	0,3

ES 2 660 700 T3

	Control	0,5% TTA	1,5% TTA
<i>Ácidos grasos</i>			
20:5 n-3	5,9	5,9	5,8
22:0	0,2	nd	nd
22:1 n-9	1,9	1,9	1,8
22:1 n-11	14,1	14	14
22:2 n-6	0,1	0,2	0,2
22:5 n-3	0,5	0,4	0,5
22:6 n-3	6,4	6,2	6,2
∑Saturada	20,7	20,1	20
∑n-3	15,9	15,7	14,1
∑n-6	3,5	3,5	3,4
Control: aceite de pescado, 05%TTA: aceite de pescado con 0,5% de TTA, 1,5%TTA: aceite de pescado con 1,5% de TTA. La cantidad de cada ácido graso se da como un porcentaje de los ácidos grasos totales.			

2.2: Crianza de salmón del Atlántico con pienso que comprende TTA

Pescado, instalaciones y diseño experimental

5 El estudio se realizó en la estación de investigación AKVAFORSK, Sunndalsora, Noruega. El salmón del Atlántico (*Salmon solar*) con un peso inicial medio de aproximadamente 86 g se colocó en 15 tanques cilindro-cónicos (0,85 m de diámetro), 40 peces por tanque. Los tanques se abastecieron con agua de mar a una temperatura constante de 12 °C. Los peces se aclimataron a la temperatura y se alimentaron con un pienso comercial durante dos semanas antes del inicio del estudio. El estudio de crecimiento consistió en un período de 8 semanas.

10 Las dietas fueron como las descritas más arriba en la tabla 2, que contenían aceite de pescado (aceite de capelán) (control), o aceite de pescado enriquecido con 0,5% de TTA (0,5%TTA) o aceite de pescado enriquecido con 1,5% de TTA (1,5%TTA). Las tres dietas se asignaron aleatoriamente a tanques triplicados. El pienso se distribuyó por alimentadores de disco accionados eléctricamente (Akvaprodukter AS, Sunndalsora). Los tanques se diseñaron de forma tal que los desechos se recogían del agua efluente en cajas de malla de alambre. Se recogieron los desechos, y esto permitió calcular el peso del pienso consumido.

15 Las dietas que contenían Gendaxin se utilizaron en un experimento separado, pero el diseño del mismo fue el mismo que el descrito anteriormente.

Muestreo inicial y final

20 Los peces estuvieron en ayuno durante 2 días antes del muestreo inicial. Seis peces de cada tanque se anestesiaron en MS-222 al comienzo y al final del experimento, y se determinó el peso medio y la longitud media. Estos seis peces se sacrificaron mediante un golpe en la cabeza y el abdomen se abrió. Las muestras de hígado, corazón, branquias y riñón se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Estas muestras se utilizaron posteriormente para el análisis de composición de ácidos grasos. Se anestesiaron y sacrificaron otros cinco peces por tanque. Estos peces se utilizaron para determinar la composición de todo el cuerpo.

25 Los peces no estuvieron en ayunas antes del muestreo final. Se cogieron cinco peces de cada tanque para recoger

muestras fecales siguiendo el procedimiento descrito por Austreng (Aquaculture, 1978 13:265-272). Las muestras fecales de cada tanque se agruparon. Las muestras se almacenaron a -20°C antes del análisis.

5 El segundo arco branquial se retiró del pescado anestesiado y se enjuagó en tampón SEI al punto de congelación (sacarosa 150 mM, EDTA 10 nM, imidazol 50 mM, pH 7,3) y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Los tejidos de branquias se almacenaron a -80°C. Los hígados se homogeneizaron en medio de sacarosa al punto de congelación.

Crecimiento

10 El peso medio de los peces casi se triplicó durante el estudio, en todos los grupos dietéticos, desde un valor inicial de 86 g hasta un valor final de aproximadamente 250 g. Los SGR disminuyeron al aumentar las dosis dietéticas de TTA, desde un SGR de 1,8 en el grupo de control a un SGR de 1,7 en el grupo 0.5% TTA y un SGR de 1,5 en el grupo 1,5% TTA (Tabla 3). No hubo diferencias significativas en el factor de condición entre los grupos dietéticos (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto de la inclusión dietética de TTA y aceite en la ingesta de pienso y crecimiento en salmón del Atlántico

	Control	0,5% TTA	1,5% TTA
Peso inicial	85±2	88±1	86±2
Peso final	278±7	267±3	233±1
CF	1,2±0,02	1,1±0,02	1,2±0,02
TGR	2,6±0,44 ^c	2,5±0,05 ^b	2,0±0,06 ^a
SGR	1,8±0,02 ^c	1,7±0,03 ^b	1,5±0,05 ^a
FER total	1,2±0,05	1,2±0,04	1,1±0,12

Los valores son medias ± SEM (n=3)

CF (%): factor de condición, SGR: tasa de crecimiento específico, TGC: coeficiente de crecimiento térmico, FER: relación de eficiencia alimentaria (ganancia de humedad/ingesta de pienso seco).

^{abc} Las diferencias entre valores medios dentro de una fila dada son significativas (p≤0,05), como se indica mediante diferentes letras de superíndice.

15

Ingesta de pienso y digestibilidad de nutrientes

20 Solo hubo pequeñas diferencias en la digestibilidad en este estudio (Tabla 4). La digestibilidad de los AG en todos los grupos dietéticos fue alta, siendo mayor de 96% para la suma de todos los AG para los peces alimentados con la dieta control y las dietas 0,5% TTA y más del 90% para los peces alimentados con la dieta 1,5% TTA. La digestibilidad de los AG saturados fue, en general, más baja que las de los otros AG.

Tabla 4: Digestibilidad de nutrientes en salmón del Atlántico

	Control	0,5%TTA	1,5%TTA
Energía	89,5±0,08	89,0±0,58	87,1±1,22
Proteína	87,7±0,15	87,9±0,31	87,5±0,44
Grasa	97,3±0,58	96,5±1,27	94,9±2,12
∑Saturada	93,2±1,54 ^b	81,4±1,95 ^a	81,5±2,18 ^a

ES 2 660 700 T3

Σ Monoinsaturada	87,8±5,66	90,4±5,56	95,4±1,87
Σ Poliinsaturada	90,9±7,77	94,0±4,45	92,5±5,08
TTA		98,6±0,45	97,0±1,59

de proteína, grasa, contenido energético y ácido graso seleccionado en salmón del Atlántico alimentado con dietas que contenían Control: aceite de pescado, 0,5% TTA: aceite de pescado con 0,5% de TTA, 1,5% TTA: aceite de pescado con 1,5%

Los datos son % de medias ± SEM

Los valores dentro de la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes; nd=no detectable.

2.3 Efectos biológicos de TTA

Productos químicos

- El ácido acético, el cloroformo, el éter de petróleo y el metanol se obtuvieron todos de Merck (Darmstadt, Alemania).
- 5 El benceno se obtuvo de Rathburn Chemicals Ltd. (Walkerburn, Escocia) y la 2', 7'-diclorofluoresceína de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.). El HCl metanólico y el 2, 2-dimetoxipropano se adquirieron de Supelco Inc. (Bellfonte, PA, EE. UU.). Las placas K6 de gel de sílice con respaldo de vidrio se obtuvieron de Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra).

Análisis químico

- 10 Los peces muestreados al principio y al final del experimento se analizaron con respecto al contenido de materia seca, grasa, proteínas, cenizas y energía. Todas las dietas y muestras fecales se analizaron con respecto a materia seca (secando a 105°C hasta peso constante), grasa (mediante extracción con acetato de etilo como se describe en NS 9402, 1994), proteína (mediante un Autoanalizador Kjeltec-N*6.25), almidón, ceniza (calentando a 550°C hasta peso constante), energía y óxido de itrio (que utilizó ICP-AES después de incinerar las muestras).
- 15 energía de las dietas, las heces y las muestras de peces enteros se determinaron mediante bomba calorimétrica adiabática, que utilizó una Bomba Calorimétrica Parr 1271.

Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos

- 20 Los lípidos totales se extrajeron a partir de branquias, hígado y corazón homogeneizados utilizando el método descrito por Folch (J Biol Chem 1957 226:497-509). Las fases de cloroformo-metanol de las branquias se secaron bajo nitrógeno y se disolvieron en hexano. Los fosfolípidos (FL), el triacilglicerol (TAG) y los ácidos grasos libres (AGL) se separaron por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando una mezcla de éter de petróleo, dietil éter y ácido acético (113:20:2 en volumen) como la fase móvil. Los lípidos se visualizaron pulverizando las placas de CCF con 0,2% (w/v) de 2', 7'-diclorofluoresceína en metanol y se identificaron por comparación con patrones conocidos bajo luz ultravioleta.
- 25 Las manchas correspondientes a FL, AGL y TAG se rasparon en tubos de ensayo y luego se trans-metilalaron durante la noche con 2, 2-dimetoxipropano, HCl metanólico y benceno a temperatura ambiente como se describe por Mason y Waller (Anal Chem 1964 36:583). Los ésteres metílicos se separaron en una columna capilar fusionada no polar mediante cromatografía de gases básicamente como se describe por Røsjø (Fish Physiol Biochem 1994 13:119-132). Los ésteres de metilo de los AG se separaron en un cromatógrafo de gases (sistema GC Perkin-Elmer Auto equipado con un inyector, inyector con/sin división programable) con una columna CP wax 52 (con una longitud de 25 m, un diámetro interno de 0,25 mm y un espesor de la película de 0,2 µm), detector de ionización de llama y sistema de datos 1022. El gas portador era He, y las temperaturas del inyector y del detector eran 280 °C. La temperatura del horno se elevó de 50 °C a 180 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹, y luego se elevó a 240 °C a una velocidad de 0,7 °C min⁻¹. La cantidad relativa de cada ácido graso presente se determinó midiendo el área bajo el pico correspondiente a ese ácido graso.
- 35

Cálculos

- Los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) se calcularon como se describe por Austreng (Aquaculture, 1978 13:265-272). El factor de condición (CF), el índice hepatosomático (HSI), el factor de crecimiento específico (SGR) y el coeficiente de crecimiento de la unidad térmica (TGC) se calculó como sigue, en base a registros individuales de pesos y longitudes:
- 40

$$SGR = \left(e^{(\ln W_1 - \ln W_0)/\text{días}} - 1 \right) * 100$$

$$TGC = (W_1^{1/3} - W_0^{1/3}) * 1000 / (\text{días} * ^\circ\text{C})$$

donde W_0 es el peso inicial, W_1 es el peso final y t grados del día.

$$CF = 100 * W * (\text{longitud caudal})^{-3}$$

$$HSI = 100 * \text{peso del hígado} * W^{-1}$$

5 Análisis estadístico

Todos los datos se sometieron a análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias se clasificaron mediante la ensayo de intervalo múltiple de Duncan. El nivel de significancia se estableció en 5%.

Composición corporal y hepática

10 Los peces alimentados con la dieta 1,5%TTA tenían un nivel de lípidos corporales más bajo (9,6%) que los peces alimentados con la dieta control (10,6%) (Tabla 5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido total de lípidos hepáticos entre los peces alimentados con la dieta control y los peces alimentados con las dietas TTA (Tabla 6). El índice hepatosomático fue significativamente mayor en peces alimentados con la dieta 1,5%TTA (1,2%) que en los peces alimentados con la dieta control (1,1%) (Tabla 6).

Tabla 5: Composición química de la canal en % de peso húmedo

	Inicio	Control	0,5%TTA	1,5%TTA
Lípido crudo (%)	8,3	10,6±0,01 ^b	11,0±0,42 ^b	9,6±0,09 ^a
Proteína cruda (%)	16,8	18,1±0,06	17,8±0,19	18,0±0,22
Materia seca (%)	27,6	31,1±0,12 ^b	31,0±0,15 ^b	29,9±0,10 ^a
Ceniza (%)	2,3	2,0±0,05	2,0±0,02	2,0±0,06
Energía (MJ/Kg)	7,1	8,5±0,03 ^b	8,5±0,10 ^b	8,0±0,05 ^a

Control: aceite de pescado, 0,5%TTA: aceite de pescado con 0,5% de TTA, 1,5%TTA: aceite de pescado con 1,5% de TTA.

^{ab}Las diferencias entre los valores medios dentro de una fila dada son significativas ($p \leq 0,05$), como se indica mediante diferentes letras de superíndice.

15

Tabla 6: Efecto de la inclusión en la dieta de TTA y aceites sobre el índice hepatosomático (HSI) y contenido de lípidos en hígado

	Control	0.5% TTA	1.5% TTA
HIS	1,1±0,01 ^a	1,1±0,02 ^a	1,2±0,03 ^b
Contenido de lípidos en el hígado (%)	4,9±0,27	5,1±0,12	5,7±0,69

Los resultados son medias ± SEM (n=3). Los valores dentro de la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes.

Composiciones de ácidos grasos de hígado, branquias y corazón

20 Las composiciones de ácidos grasos de FL, TAG y AGL de branquias, hígado y corazón se muestran en las Tablas 7, 8 y 9. El TTA se incorporó a las fracciones de FL de las branquias (0,8%) y del corazón (0,7%) del salmón del Atlántico alimentado con la dieta 1,5%TTA. El TTA también se incorporó a las fracciones de TG y de AGL de las

branquias (Tabla 7). Las trazas de TTA y sus productos Δ^9 desaturasa se incorporaron a los lípidos hepáticos, mientras que los productos no Δ^9 desaturasa de TTA se recuperaron en los lípidos del corazón y las branquias.

5 El porcentaje de AG n-3 en el hígado, las branquias y el corazón también dependía de la dieta dada a los peces. El porcentaje de EPA + DHA fue significativamente mayor en peces alimentados con la dieta 1,5%TTA que en peces control, en todas las fracciones lipídicas de las branquias y el corazón. En el hígado, por otro lado, el TTA condujo a un aumento moderado en el porcentaje de DHA y un porcentaje ligeramente reducido de EPA. El porcentaje de ácido palmítico (16: 0) y la suma de todos los AG saturados fueron significativamente menores en la fracción de FL de las branquias, el corazón y el hígado de peces alimentados con la dieta 1,5%TTA que en peces alimentados con la dieta control (Tablas 7, 8, 9). La suma de AG monoinsaturados fue significativamente menor en las fracciones de TG y AGL de las branquias en peces alimentados con la dieta 1,5%TTA que en peces alimentados con la dieta de control (Tabla 8). Por el contrario, el porcentaje de la suma de AG monoinsaturados en las fracciones de FL y TAG del hígado fue mayor en peces alimentados con dosis crecientes de TTA (Tabla 9).

10

Tabla 7: Composición de ácidos grasos de las branquias

Ácidos grasos	Fosfolípidos			Triacilglicerol			Ácidos grasos libres		
	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA
14:0	3,1±0,17	2,9±0,15	2,6±0,05	5,8±0,09	5,6±0,35	5,7±0,18	2,5±0,04 ^b	2,4±0,14 ^b	2,0±0,08 ^a
16:0	25,2±0,89 ^b	21,7±0,61 ^a	20,9±0,09 ^a	15±0,24	15,3±0,04	15,4±0,17	20,4±0,12 ^c	17,8±0,38 ^b	15,7±0,43 ^a
16:1n-7	2,8±0,14	2,8±0,61	2,9±0,02	6,8±0,44	6,1±0,27	6,2±0,19	4,1±0,02 ^b	4,0±0,24 ^b	3,5±0,12 ^a
16:3n-4	0,9±0,22	0,8±0,03	0,8±0,08	nd	nd	nd	1,0±0,05	0,9±0,024	0,9±0,05
18:0	5,9±0,41	5,1±0,31	5,1±0,18	2,9±0,15	2,9±0,12	3±0,08	5,6±0,07	5,1±0,04	5,1±0,62
18:1n-6	0,3±0,07	0,4±0,02	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,5±0,02	0,4±0,01	0,4±0,003
18:1n-7	3,0±0,07	3,2±0,15	3,4±0,21	3,6±0,05	3,6±0,04	3,6±0,01	4,3±0,12 ^b	4,0±0,05a ^b	3,8±0,15 ^a
18:1n-9	14,0±1,42	12,6±0,47	12,7±0,15	15,5±0,45	15,7±0,67	14,7±0,22	15,6±0,47	14,7±0,47	14,2±0,36
18:2n-6	1,4±0,75	1,01±0,07	0,8±0,18	2,5±0,07	2,6±0,15	2,4±0,07	1,6±0,01	1,7±0,08	1,4±0,07
18:3n-3	0,2±0,19	0,1±0,03	nd	0,6±0,02	0,6±0,05	0,5±0,02	0,2±0,01	0,2±0,03	0,2±0,01
18:3n-6	0,1±0,05	0,1±0,06	nd	nd ^a	1,1±0,08 ^b	1,4±0,13 ^b	nd	nd	nd
18:4n-3	nd	nd	nd	1,2±0,06	nd	0,4±0,38	0,3±0,01 ^b	0,1±0,7 ^{ab}	0,2±0,03 ^{ab}
TTA		nd	0,8±0,17		nd	0,7±0,37		nd	0,7±0,36
20:1n-9	0,3±0,07	0,2±0,01	0,3±0,09	0,5±0,03	0,5±0,02	0,5±0,04	4,5±0,20 ^b	3,8±0,08 ^a	3,4±0,07 ^a
20:1n-11	3,5±0,11	3,8±0,43	3,5±0,18	14,7±0,64	15,0±0,80	13,6±0,58	0,5±0,01 ^a	0,4±0,02 ^b	0,4±0,04 ^b

Acidos grasos	Fosfolipidos			Triacilglicerol			Acidos grasos libres		
	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA
20:2n-6	nd	nd	nd	0,2±0,11	0,2±0,10	0,1±0,10	0,3±0,004	0,3±0,02	0,3±0,03
20:3n-6	nd	0,1±0,01	nd	nd	nd	0,1±0,07	0,3±0,01	0,3±0,01	0,3±0,02
20:4n-3	0,27±0,08	0,2±0,002	0,3±0,07	0,7±0,02	0,6±0,03	0,7±0,01	0,4±0,07	0,5±0,02	0,5±0,02
20:4n-6	2,5±0,10	2,5±0,12	2,9±0,21	0,6±0,05	0,5±0,05	0,7±0,12	5,6±0,26 ^a	6,0±0,08 ^{ab}	6,2±0,33 ^{ab}
20:5n-3	6,2±0,52	6,5±0,23	6,9±0,62	3,9±0,25 ^{ab}	3,5±0,10 ^a	4±0,09 ^b	9,2±0,30	10,1±0,23	10,1±0,53
22:1n-9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,2±0,02 ^b	nd ^a	nd ^{ca}
22:1n-11	0,8±0,41	1,4±0,44	1,03±0,02	10,4±0,30 ^{ab}	11,7±0,51 ^b	10,1±0,50 ^a	1,2±0,12 ^b	0,8±0,15 ^{ab}	0,6±0,08 ^a
22:5n-3	0,8±0,17	1,1±0,003	1,2±0,09	1,2±0,05	1,0±0,01	1,2±0,02	1,6±0,04 ^a	2,0±0,14 ^{ab}	2,3±0,19 ^b
22:6n-3	22,0±1,27 ^a	24,7±0,71 ^a	27,8±0,57 ^b	9,3±0,52	9,2±0,54	11,6±0,42	17,2±0,09 ^a	21,8±1,5 ^b	23,9±0,67 ^b
Otros	1,9±0,29	5,0±1,72	2,9±0,34	1,5±0,56	0,7±0,09	0,8±0,12	2,0±0,17	2,0±0,36	4,6±1,01
Σ Saturado	36,2±1,03 ^b	30,9±0,62 ^a	29,1±0,32 ^a	24,0±0,40	24,1±0,19	24,3±0,13	29,0±0,13 ^b	25,7±0,54 ^a	23,3±1,30 ^a
Σ Monoinsaturado	25,8±1,97	25,5±2,04	25,6±0,53	52,1±0,92 ^{ab}	53,1±0,93 ^b	49,1±1,12 ^a	31,2±0,83 ^b	28,4±0,99 ^a	25,6±0,64 ^a
Σ n-6	4,3±1,10	3,7±0,07	3,9±0,18	3,4±0,14	4,5±0,07	4,6±0,11	8,2±0,26	8,6±0,12	8,6±0,37
Σ n-3	29,7±1,45 ^a	33,0±0,86 ^a	36,9±0,95 ^b	16,8±0,87 ^{ab}	14,9±0,44 ^a	18,4±0,58 ^b	28,6±0,38 ^a	34,3±1,58 ^b	36,6±1,23 ^b

FO: aceite de pescado, 0,5%TTA: aceite de pescado con 0,5% de TTA, 1,5%TTA: aceite de pescado con 1,5% de TTA. La cantidad de cada ácido graso se da como porcentaje del total de ácidos grasos (AG). Los datos son medias ± SEM. Los valores dentro de la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes, p<0,05, n=3; nd=no detectado. Incluye nd, AG y algunos AG con porcentajes menores que 1.

Tabla 8: Composición de ácidos grasos del corazón

Acidos grasos	Fosfolípidos			Triacilglicerol			Acidos grasos libres		
	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA
14:0	1,6±0,20	1,6±0,16	1,2±0,22	6,2±0,35	6,1±0,20	5,9±0,20	1,2±0,14	1,5±0,09	1,5±0,14
16:0	22,8±0,12 ^b	22,2±0,5 ^b	19,0±0,79 ^a	14,4±1,2	13,9±0,70	13,8±0,19	21,9±0,93	21,1±0,59	20,4±1,16
16:1n-7	1,6±0,01	1,8±0,17	1,8±0,09	6,7±0,18	6,7±0,34	6,6±0,07	2,0±0,11	1,4±0,7	2,1±0,1
18:0	4,1±0,19	3,9±0,09	3,5±0,22	2,3±0,15	2,2±0,07	2,3±0,14	5,2±0,4 ^b	5,0±0,26 ^{ab}	4,2±0,20 ^a
18:1n-6	0,3±0,05	0,3±0,05	0,3±0,01	0,3±0,13	0,4±0,01	0,4±0,01	nd ^a	0,4±0,01 ^b	0,3±0,01 ^b
18:1n-7	2,7±0,15	2,9±0,06	3,0±0,1	3,8±0,09	3,6±0,11	3,6±0,09	3,6±0,09	3,5±0,20	3,3±0,15
18:1n-9	7,2±0,09	8,3±0,20	8,0±0,49	15,0±0,14	14,5±0,15	14,1±0,22	8,4±0,10	8,6±0,40	8,2±0,47
18:2n-6	1,0±0,20	1,0±0,09	1,2±0,05	2,4±0,22	2,1±0,46	2,5±0,07	1,5±0,14	1,4±0,07	1,1±0,14
18:3n-3	nd	nd	0,1±0,08	0,4±0,19	0,9±0,33	0,6±0,01	nd	0,2±0,08	nd
18:4n-3	nd ^a	nd ^{ab}	0,2±0,01 ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TTA		nd	0,7±0,4		nd	nd		nd	nd
20:1n-9	3,8±0,07 ^a	4,3±0,29 ^{ab}	4,5±0,13 ^b	16,9±0,69	16,2±0,56	16,6±0,81	5,9±0,15 ^b	5,9±0,18 ^b	5,2±0,13 ^a
20:1n-11	nd	nd	nd	0,4±0,19	0,5±0,04	0,5±0,03	nd	nd	nd
20:2n-6	nd	nd	0,2±0,003	0,2±0,11	0,2±0,1	0,3±0,01	nd	nd	nd
20:3n-6	nd	nd	0,1±0,07	nd ^a	0,1±0,03 ^b	nd ^a	nd	nd	nd
20:4n-3	0,8±0,04	0,5±0,07	0,7±0,09	0,5±0,27	0,7±0,01	0,7±0,052	0,5±0,26	0,7±0,14	0,6±0,07

Acidos grasos	Fosfolípidos			Triacilglicerol			Acidos grasos libres		
	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA
20:4n-6	1,5±0,03	1,4±0,07	1,5±0,08	0,1±0,06	nd	0,2±0,08			
20:5n-3	10,7±0,27 ^b	9,0±0,51 ^b	8,4±0,09 ^a	3,3±0,05 ^a	3,4±0,06 ^a	3,7±0,05 ^b	9,8±0,65	8,9±0,50	9,3±0,42
22:1n-9	0,8±0,09	1,0±0,15	1,0±0,09	1,2±0,59	1,7±0,02	1,7±0,08	nd	nd	nd
22:1n-11	nd	nd	nd	11,23±0,24	11,6±0,27	11,4±0,32	2,1±0,17 ^b	2,1±0,13 ^b	1,4±0,16 ^a
22:5n-3	1,8±0,06 ^a	2,0±0,05 ^a	2,4±0,06 ^b	0,8±0,38	1,1±0,06	1,2±0,06	1,8±0,07 ^a	2,0±0,05 ^b	2,3±0,03 ^c
22:6n-3	35,5±0,08	35,9±1,39	38,5±1,4	7,9±0,44	7,6±0,37	8,4±0,43	30,7±0,82 ^a	33,2±1,07 ^a	35,3±1,5 ^b
Otros	1,4±0,21	1,3±0,22	1,8±0,03	0,2±0,09	0,4±0,06	0,4±0,10	1,3±0,60	1,4±0,45	1,4±0,91
Σ Saturado	32,2±3,09 ^b	28,1±0,76 ^b	24,3±1,00 ^a	24,8±2,57	22,8±0,89	23,0±0,42	28,4±0,83	27,7±0,97	26,4±1,19
Σ Monoinsaturado	12,7±3,02	17,8±0,59	17,8±0,76	55,6±1,54	55,3±1,22	55,5±1,40	22,3±0,47	21,9±0,97	20,7±0,87
Σ n-6	2,3±0,25	2,6±0,17	3,0±0,15	2,7±0,34	2,4±0,41	2,8±0,07	3,2±0,21	3,5±0,08	3,2±0,08
Σ n-3	49,5±0,60	47,5±1,6	50,4±1,4	13,7±1,42	15,2±0,83	16,1±0,74	42,9±0,5	45,0±1,71	47,5±1,36

FO: aceite de pescado, 0,5%TTA: aceite de pescado con 0,5% de TTA, 1,5%TTA: aceite de pescado con 1,5% de TTA. La cantidad de cada ácido graso se da como porcentaje del total de ácidos grasos (AG). Los datos son medias ± SEM. Los valores dentro de la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes, p<0,05, n=3; nd=no detectado. Incluye nd. AG y algunos AG con porcentajes menores que 1.

Tabla 9: Composición de ácidos grasos del hígado

Acidos grasos	Fosfolípidos			Triacilglicerol			Acidos grasos libres		
	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA
14:0	2,6±0,06 ^b	2,3±0,09 ^a	2,2±0,05 ^a	3,5±0,65	3,8±0,36	2,6±1,16	3,9±0,57	4,0±0,04	3,5±0,16
16:0	21,3±0,090 ^b	17,3±0,36 ^a	17,2±0,41 ^a	10,0±0,58	9,7±1,62	6,7±3,34	17,7±1,7	16,6±0,58	16,1±0,35
16:1n-7	1,7±0,04 ^b	1,7±0,02 ^{ab}	1,6±0,03 ^a	6,1±0,06	5,6±0,05	4,8±0,8	5,0±0,93	5,0±0,13	5,0±0,09
16:3n-4	0,5±0,05	0,5±0,02	0,5±0,04	0,4±0,03	0,4±0,06	0,2±0,11	0,8±0,07	0,9±0,01	0,8±0,06
18:0	2,9±0,3 ^a	3,6±0,17 ^b	3,5±0,04 ^b	2,5±0,39	2,1	2,5±0,19	2,8±0,14	2,2±0,31	2,4±0,08
18:1n-6	0,4±0,01 ^a	0,4±0,02 ^b	0,4±0,01 ^{ab}	0,4±0,004	0,3±0,001	nd	0,5±0,07	0,5±0,002	0,5±0,03
18:1n-7	1,9±0,08 ^a	2,3±0,09 ^b	2,1±0,04 ^{ab}	4,5±0,21	4,6±0,61	4,4±0,19	3,9±0,13	4,4±0,09	4,4±0,15
18:1n-9	8,6±0,19	9,3±0,18	9,3±0,27	25,2±2,14	23,5±2,8	25,4±4,60	24,9±3,60	21,7±0,67	23,0±0,72
18:2n-6	1,1±0,11	1,5±0,12	1,4±0,02	2,3±0,22	2,7±0,13	3,2±0,87	4,0±1,7	2,3±0,11	2,2±0,14
18:3n-3	nd	nd	nd	0,4±0,08	0,5±0,09	0,6±0,23	1,0±0,63	0,4±0,05	0,4±0,05
18:3n-6	nd	0,1±0,004	0,1±0,004	nd	nd	nd	nd ^a	0,1±0,06 ^b	nd ^a
18:4n-3	nd ^a	0,1±0,03 ^b	0,1±0,00 ^b	0,7±0,10	0,8±0,18	0,5±0,27	0,4±0,12	0,3±0,08	0,4±0,09
Δ^9 -desaturated TTA		0,1±0,01	0,1±0,01		nd	nd		nd	nd
TTA		0,05±0,02	nd		nd	nd		nd	nd
20:1n-9	0,1±0,07 ^a	0,2±0,01 ^b	0,2±0,01 ^b	0,5±0,01	0,3±0,01	0,5±0,001	0,3±0,02	0,3±0,01	0,2±0,11
20:1n-11	4,6±0,24 ^a	5,2±0,25 ^b	5,2±0,05 ^a	17,3±0,89	16,7±0,65	16,6±0,28	6,7±0,70 ^a	7,8±0,30 ^{ab}	9,2±0,54 ^b

Acidos grasos	Fosfolípidos			Triacilglicerol			Acidos grasos libres		
	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA	FO	0,5%TTA	1,5%TTA
20:2n-6	0,4±0,03	0,4±0,02	0,4±0,01	0,4±0,01	0,5±0,07	0,4±0,26	0,6±0,25	0,4±0,01	0,4±0,02
20:3n-6	0,4±0,02	0,4±0,02	0,4±0,02	nd	nd	nd	0,3±0,12 ^b	0,2±0,01 ^{ab}	nd ^a
20:4n-3	0,7±0,05	0,8±0,02	0,8±0,02	0,7±0,06	0,8±0,08	0,4±0,21	1,0±0,10	1,2±0,04	1,3±0,08
20:4n-6	1,8±0,16 ^{ab}	1,6±0,06 ^a	2,0±0,06 ^b	nd	nd	nd	0,8±0,07	0,8±0,04	0,7±0,02
20:5n-3	10,3±0,78	9,7±0,17	9,3±0,30	2,5±0,13	2,7±0,19	1,9±0,27	5,9±0,77	5,9±0,46	5,4±0,43
22:1n-9	nd	nd	nd	1,3±0,03	1,3±0,19	0,9±0,43	0,5±0,07	0,6±0,05	0,4±0,21
22:1n-11	0,5±0,09	0,4±0,20	0,6±0,02	8,2±0,53	8,7±1,45	8,7±0,95	1,9±0,3	2,5±0,28	2,4±0,36
22:5n-3	1,6±0,81	2,6±0,08	2,6±0,11	1,1±0,004	1,3±0,03	0,7±0,35	1,5±0,23	1,7±0,10	1,1±0,54
22:6n-3	35,6±0,51	36,2±0,28	36,7±0,49	5,2±0,49	7,3±1,28	6,3±0,65	11,3±0,69	15,1±0,74	14,9±0,40
Otros	0,7±0,16	1,5±0,23	1,3±0,06	2,9±1,06	1,4±0,87	4,5±3,08	2,4±0,57 ^a	3,0±0,11 ^{ab}	3,2±0,16 ^b
Σ Saturado	27,5±0,49 ^b	23,8±0,49 ^a	23,6±0,40 ^a	18,4±0,57	18,9±1,93	20,5±3,66	25,8±2,10	24,2±0,75	23,4±0,43
Σ Monoinsaturado	18,1±0,29 ^a	19,7±0,26 ^b	19,7±0,33 ^b	63,6±2,70 ^a	61,3±2,25 ^b	58,7±0,79 ^b	43,8±1,65	43,0±1,39	45,3±1,55
Σ n-6	3,7±0,38	4,1±0,10	4,3±0,10	2,8±0,34	3,1±0,05	2,5±0,004	5,8±2,08	3,8±0,11	3,4±0,13
Σ n-3	49,9±1,03	51,3±0,18	51,4±0,14	11,7±0,56	14,4±1,06	12,8±0,20	21,7±1,09	25,2±1,27	23,9±1,05

FO: aceite de pescado, 0,5%TTA: aceite de pescado con 0,5% de TTA, 1,5%TTA: aceite de pescado con 1,5% de TTA. La cantidad de cada ácido graso se da como porcentaje del total de ácidos grasos (AG). Los datos son medias ± SEM. Los valores dentro de la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes, p<0,5, n=3; nd=no detectado. Incluye nd. AG y algunos AG con porcentajes menores que 1.

2.4 Efectos biológicos de la composición, incluido un material proteico de soja fermentada

Productos químicos

5 Gendaxin se obtuvo de Aximed, Bergen, Noruega. Una cápsula de Gendaxin® contiene 35 mg de isoflavonas, entre otros, 10 mg de genisteína y 15 mg de Daidzein.

Análisis de lípidos

10 Los lípidos plasmáticos se midieron enzimáticamente en el sistema Technicon Axon (Miles, Tarrytown, NY) que utiliza el kit de triglicéridos de Bayer, colesterol total (Bayer, Tarrytown, NY), y el kit PAP150 para la colina que contienen los fosfolípidos de bioMerieux. Los resultados se dieron en mmol/l, y los datos se presentan en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10: Colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos del plasma.

	Colesterol	Triglicéridos	Fosfolípidos
Control	10,02	2,95	11,98
0,25 % Gendaxin	9,14	2,71	11,19
0,5 % Gendaxin + 0,9 % TTA	9,10	2,12	10,66

15 Es evidente a partir de los datos anteriores que la adición de Gendaxin al pienso para peces tiene un efecto positivo en la composición de ácidos grasos del plasma del salmón. Los niveles de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos disminuyeron con 0,25% de Gendaxin añadido al pienso para peces en comparación con el control. Además la adición de Gendaxin y TTA mejoró la composición de ácidos grasos del plasma adicionalmente.

Ensayo enzimático

20 Se midió la actividad de acil-CoA oxidasa grasa en la fracción de hígado peroxisomal como se describió previamente (Small GM, Burdett K, Connock MJ (1985) Biochem J 227:205-10). Los resultados se dieron como actividad de acil-CoA oxidasa grasa por proteína total, y se muestran en la tabla 11 a continuación.

Tabla 11: β-oxidación hepática.

	Beta oxidación
Control	0,940
0,5 % Gendaxin + 0,9 % TTA	1,501

Es evidente a partir de los datos anteriores que la adición de Gendaxin y TTA al pienso para peces tiene un efecto positivo sobre la β-oxidación, ya que la β-oxidación está altamente aumentada.

25 Ejemplo 3

En línea con la configuración experimental dada en el ejemplo 1, hemos llevado a cabo un experimento de alimentación en ratas macho Wistar (ver Tabla 12) con los siguientes componentes de alimentación:

30% grasa

20% proteína

30 5% fibra

10% sacarosa

3,5% mezcla de minerales AIN93G

1,0% mezcla de vitaminas AIN-93

ES 2 660 700 T3

El restante: almidón

El componente graso es 30% manteca de cerdo, o el 2,5-5% de la manteca de cerdo se intercambia con aceite de pescado o el 0,15% de la manteca de cerdo se intercambia con TTA. El material proteico es 20% proteína de leche (caseína), o la mitad se intercambia con proteína de pescado o "Bioproteína".

5

Tabla 12

	Ch	Tg	HDL Ch	AGL	FL	HDL Ch/Ch	
Tratamiento	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	razón	
FPH, 10%	2,03	1,16	1,63	0,34	1,48	0,80	
Aceite de pescado, 2,5%	1,77	1,27	1,42	0,40	1,47	0,80	
Aceite de pescado, 5%	1,79	1,13	1,44	0,40	1,41	0,81	
Aceite de pescado 2,5% + FPH 10%	1,26	0,93	1,00	0,35	1,07	0,79	
Aceite de pescado 5% + FPH 10%	1,21	0,92	0,97	0,37	0,98	0,80	
FPH 10% + TTA 0,15%	1,27	0,65	1,07	0,28	1,18	0,83	
Aceite de pescado 2,5% + TTA 0,15%	1,21	0,43	1,00	0,25	1,01	0,83	
Aceite de pescado 5% + TTA 0,15%	1,26	0,61	1,02	0,23	1,14	0,81	
Aceite de pescado 2,5% + FPH 10% + TTA 0,15%	0,98	0,46	0,81	0,31	1,00	0,83	
Aceite de pescado 5% + FPH 10% + TTA 0,15%	1,02	0,72	0,84	0,32	1,00	0,84	
TTA 0,15%	1,56	0,39	1,31	0,28	1,17	0,84	
Bioproteína Alta 20%	1,23	0,80	0,95	0,41	1,00	0,77	
Bioproteína Baja 20%	1,28	0,61	1,04	0,34	1,01	0,81	
Kontroll (Casein 20%)	1,90	1,04	1,52	0,38	1,41	0,80	
	Peso de la rata	Hígado	WAT epi	WAT ret	Hígado/bw	WAT epi/bw	WAT ret/bw
Tratamiento	gramos	gramos	gramos	gramos	razón	razón	razón
FPH, 10%	460,83	10,04	7,99	9,90	2,17	1,69	2,12
Aceite de pescado, 2,5%	427,83	9,44	7,00	8,67	2,21	1,63	2,01
Aceite de pescado, 5%	445,17	9,87	7,59	9,79	2,21	1,70	2,20

ES 2 660 700 T3

Aceite de pescado 2,5% + FPH 10%	438,83	10,01	6,33	8,80	2,28	1,42	2,02
Aceite de pescado 5% + FPH 10%	432,50	10,18	7,31	8,86	2,35	1,67	2,05
FPH 10% + TTA 0,15%	436,17	15,55	6,80	8,25	3,56	1,54	1,88
Aceite de pescado 2,5% + TTA 0,15%	405,00	13,25	4,59	7,09	3,26	1,13	1,75
Aceite de pescado 5% + TTA 0,15%	442,83	14,80	5,48	7,95	3,34	1,22	1,77
Aceite de pescado 2,5% + FPH 10% + TTA 0,15%	438,50	15,66	6,03	8,20	3,57	1,36	1,85
Aceite de pescado 5% + FPH 10% + TTA 0,15%	449,67	16,29	7,18	9,19	3,62	1,58	2,02
TTA 0,15%	404,00	13,13	4,25	6,28	3,26	1,05	1,55
Bioproteína Alta 20%	413,33	9,00	5,02	6,99	2,18	1,21	1,69
Bioproteína Baja 20%	420,67	8,97	4,63	6,65	2,13	1,09	1,58
Control (Casein 20%)	417,36	8,91	5,94	8,46	2,13	1,42	2,03

REIVINDICACIONES

1. Una preparación que comprende una combinación de:

1) un material proteico,

5 2) un aceite de pescado, y

3) una entidad de ácido graso no β -oxidable representada por la fórmula general $R''\text{-COO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{-X-R}'$, en donde X es un átomo de azufre, un átomo de selenio, un átomo de oxígeno, un grupo SO o un grupo SO_2 ; n es un número entero de 0 a 11; y R' es un grupo alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, en donde la cadena principal de dicho R' contiene de 13 a 23 átomos de carbono y opcionalmente uno o más heterogrupos seleccionados del grupo que comprende un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de selenio, un átomo de oxígeno, un grupo SO y un grupo SO_2 , y R'' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, en donde el material proteico es hidrolizado de proteína de pescado para uso en seres humanos para la prevención y/o tratamiento de hipercolesterolemia y enfermedades negativamente afectadas por niveles de colesterol altos, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes, hígado graso, dislipemia, aterosclerosis, enfermedad coronaria, trombosis, estenosis, estenosis secundaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, disfunción endotelial, estado procoagulante, síndrome de ovario poliquístico y el síndrome metabólico.

2. Preparación para uso según la reivindicación 1, donde el aceite de pescado comprende ácidos grasos poliinsaturados.

20

Fig.1: Actividad de acil-CoA oxidasa grasa ('FAO)

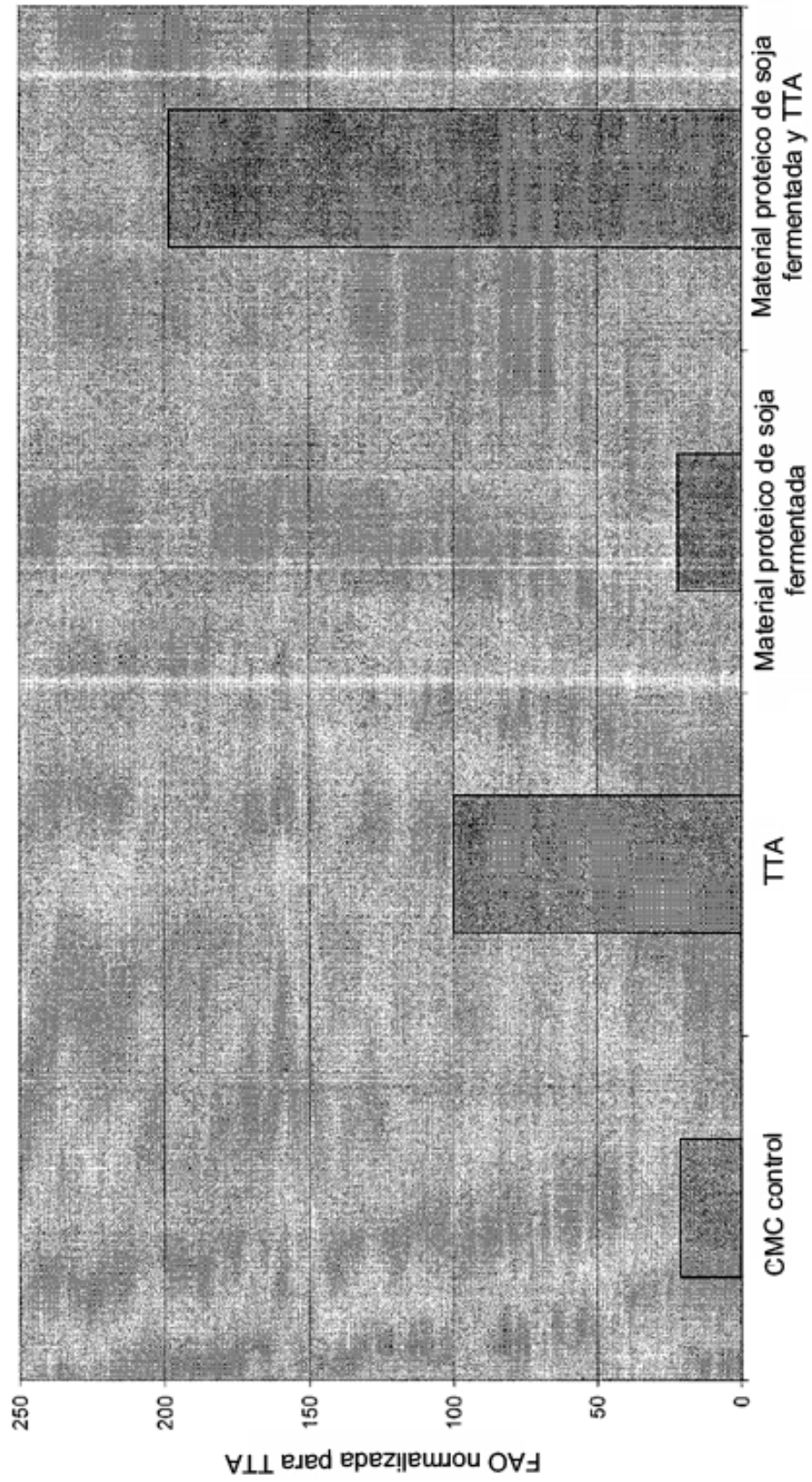


Fig. 2: Niveles de fosfolípidos en plasma

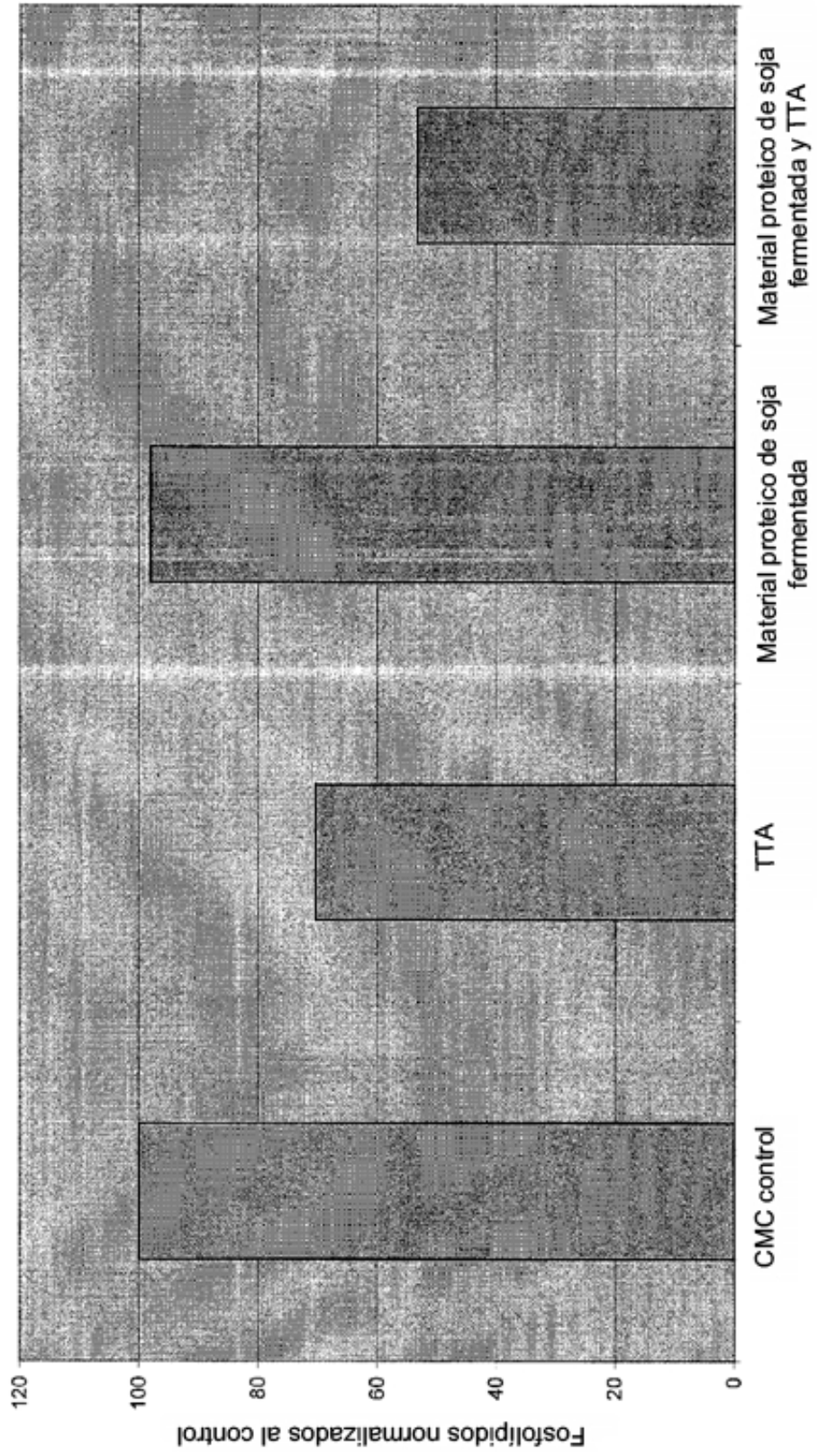


Fig. 3: Niveles de colesterol en plasma.

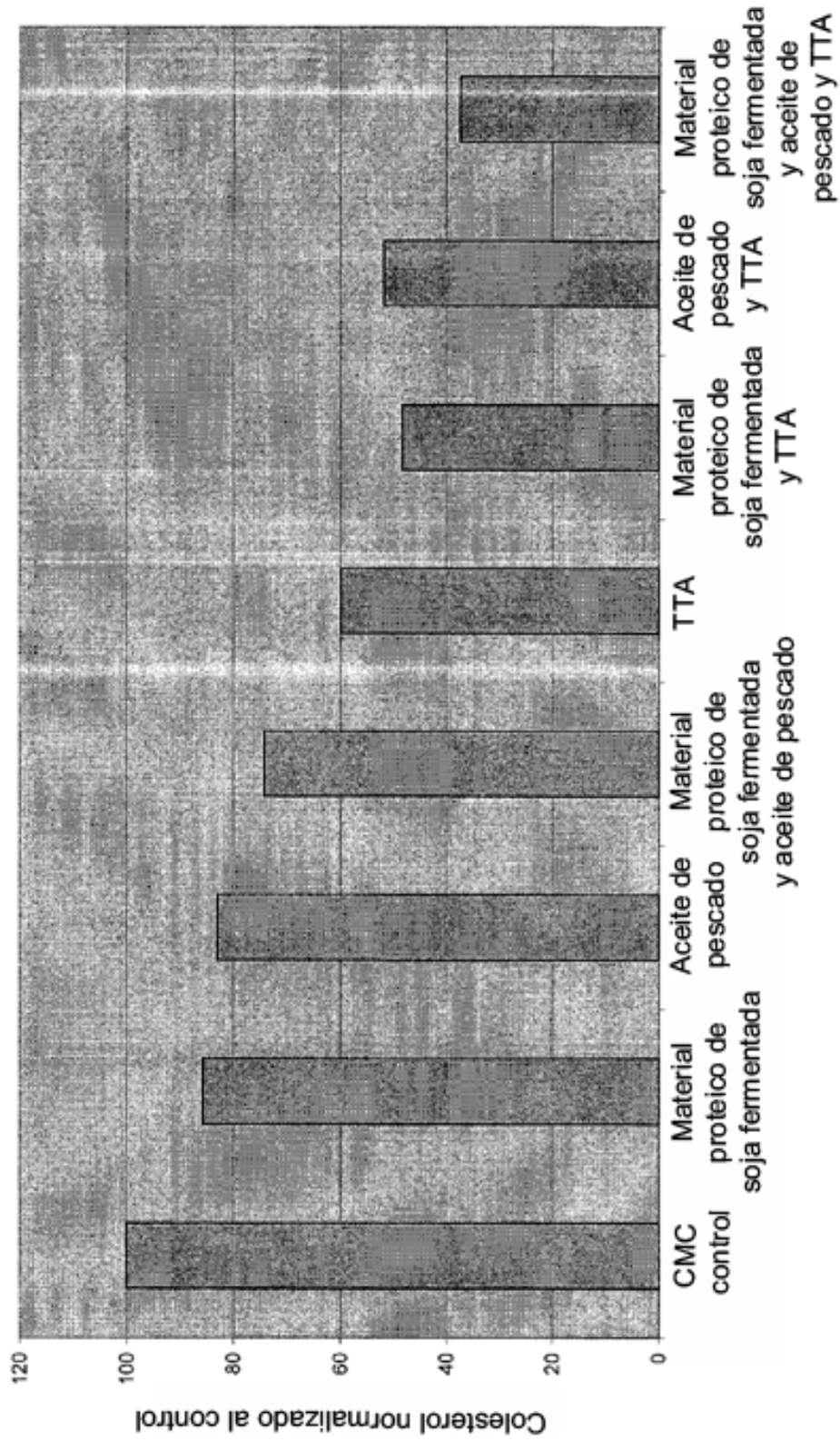


Fig. 4: Niveles de triacilglicéridos en plasma.

