

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 606**

51 Int. Cl.:

**A23K 50/60** (2006.01)

**A23L 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015** **E 15155044 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 3061351**

54 Título: **Producto alimenticio para sujetos jóvenes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.04.2018**

73 Titular/es:

**DOPHARMA RESEARCH B.V. (100.0%)**  
**Zalmweg 24**  
**4941 VX Raamsdonksveer, NL**

72 Inventor/es:

**SCHILDER, YVONNE DOROTHÉ CECILE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 662 606 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**

Producto alimenticio para sujetos jóvenes

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de los productos alimenticios, en particular a un suplemento alimenticio.

10 Antecedentes de la invención

10 En el ganado intensivo, una gran cantidad de animales se mantiene en un espacio relativamente pequeño. Las infecciones pueden propagarse fácilmente y la convivencia puede acompañarse de estrés. Además, ciertas fases inducen estrés adicional, tal como la fase de destete para animales jóvenes, como cerdos y terneros. El destete se acompaña de varios factores estresantes para los cerdos, tal como el cambio de ambiente con el cambio de la comunidad bacteriana concomitante, el cambio de camadas y la alimentación. Esta fase es muy desafiante para los cerdos y frecuentemente llega con problemas fisiológicos, tal como infecciones bacterianas que causan diarrea. El descrudado es muy común y puede causar la muerte de hasta 10% de los cerditos destetados. El crecimiento se retrasará en caso de que los cerditos sobrevivan, y en un mercado en el que los márgenes están bajo gran presión, reducir la inflamación intestinal que acompaña al destete para prevenir problemas de salud es de suma importancia para la salud económica de las granjas. En los Países Bajos, el uso de antibióticos se reduce legalmente al 50% en 2013 en comparación con 2009 y se necesita aumentarlo al 70% en 2015. Además, la cotización del mercado de la agricultura orgánica aumenta en un 25% anual. En la agricultura orgánica, el uso de antibióticos se reduce al mínimo. Por lo tanto, existe una gran necesidad de productos que respalden la salud de los animales jóvenes en el período vulnerable del destete, además del uso de antibióticos.

25 El documento de patente núm. WO2007/054103 describe las composiciones, administradas a cerdos antes del destete y que comprenden el calostro bovino, huevo entero, suero lácteo, ácido láurico y ácido palmitoleico. La composición tiene un efecto beneficioso sobre la supervivencia de los cerditos recién nacidos.

30 El documento de patente núm. EP0376628 describe las composiciones de grasa vegetal para las fórmulas infantiles, que comprenden ácido láurico y ácido palmitoleico.

Resumen de la invención

35 Es un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición nutricional que soporte la salud, en particular la salud intestinal, de un sujeto joven, preferentemente un animal, por ejemplo, para preparar mejor al sujeto para el estrés del destete. La invención proporciona, por lo tanto, un producto alimenticio que comprende grasa, proteína y carbohidratos, donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1, el producto comprende además ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol, en donde el ácido láurico está presente en una cantidad de 15-80% en peso de sólidos totales, ácido palmitoleico está presente en una cantidad de 0,1-1,5% en peso de sólidos totales y el colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5% en peso de sólidos totales. El producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un producto alimenticio para su uso en un método para estimular el crecimiento de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un producto alimenticio de acuerdo con la invención, por lo que dicho producto alimenticio se administra preferentemente al menos antes del destete de dicho sujeto.

50 En aun otro aspecto, la invención proporciona un producto alimenticio para su uso en un método para prevenir enfermedades en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un producto alimenticio de acuerdo con la invención, por lo que dicho producto alimenticio se administra preferentemente al menos antes del destete de dicho sujeto.

55 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un producto alimenticio para su uso en un método para mantener o mejorar la salud intestinal de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un producto alimenticio de acuerdo con la invención, por lo que dicho producto alimenticio se administra preferentemente al menos antes del destete de dicho sujeto.

60 En otro aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende grasa, proteína y carbohidratos, en donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1, la composición que comprende además ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol, en donde el ácido láurico está presente en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, el ácido palmitoleico está presente en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y el colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales, para su uso en un método para estimular el crecimiento de un sujeto, prevenir la enfermedad en un sujeto y/ o mantener o mejorar la salud intestinal de un sujeto, preferentemente después del destete.

65 Descripción detallada

La invención se refiere a la preparación de sujetos jóvenes para el período desafiante de destete, proporcionando en particular al sujeto joven un producto alimenticio durante el período poco antes del destete, y/o el período inmediatamente posterior al nacimiento de un sujeto joven. La preparación de los sujetos para el período desafiante de destete con el uso de un producto alimenticio de la invención es más eficaz que la aplicación de estrategias después del destete, cuando la inflamación ya ha comenzado. En ese caso, frecuentemente, es necesario contrarrestar la inflamación con el uso de antibióticos. Los productos alimenticios de la presente invención reducen o incluso obvian la necesidad del tratamiento con antibióticos en animales jóvenes para contrarrestar la inflamación que resulta del estrés asociado con el destete. El producto alimenticio de la invención es preferentemente un suplemento alimenticio. Como se usa en la presente descripción, el término "suplemento alimenticio" se refiere a una composición que alimenta a un sujeto además de su dieta regular, tal como leche materna o un alimento para animales. El suplemento alimenticio puede mezclarse con dicha dieta regular o proporcionarse a un sujeto por separado de la dieta habitual.

Un producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención comprende grasa, proteína y carbohidratos, en donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1. Preferentemente, la relación de grasa:proteína está entre 4:1 y 16:1, con mayor preferencia, entre 6:1 y 12:1, con mayor preferencia entre 7:1 y 10:1, con la máxima preferencia, entre 24:3 y 25:3. Preferentemente, la relación de proteína:carbohidratos en un producto alimenticio de acuerdo con la invención está entre 5:1 y 1:5, preferentemente entre 4:1 y 1:2, con mayor preferencia entre 1:1 y 2:1. En un producto alimenticio particularmente preferido de la invención, preferentemente un producto alimenticio para cerditos, la relación grasa:proteína:carbohidrato es aproximadamente 24:3:2,5 - 25:3:2. El producto alimenticio de acuerdo con la invención tiene preferentemente un valor calórico de 30-40 kJ por g de sólidos totales.

Un producto alimenticio, preferentemente un suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención preferentemente, comprende además ácido oleico, ácido linoleico y/o ácido palmítico, con mayor preferencia ácido oleico, ácido linoleico y ácido palmítico. El ácido oleico está presente, preferentemente, en una cantidad de 0,5-60 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 2-50 % en peso de sólidos totales. El ácido linoleico está presente, preferentemente, en una cantidad de 0,3-65 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,6-50 % en peso de sólidos totales. El ácido palmítico está presente preferentemente en una cantidad de 2,5-13 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 3-10 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 4-8 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 5-7 % en peso de sólidos totales.

Un producto alimenticio particularmente preferido, preferentemente suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención comprende triglicéridos de cadena media (MCT), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y colesterol, en donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales. Los triglicéridos de cadena media (MCT), como se usan en la presente descripción, se definen como triglicéridos (que consisten en tres moléculas de ácido graso esterificadas a glicerol) que contienen 8, 10 o 12 ácidos grasos de carbono. MCT comprende, preferentemente, ácidos grasos, ácido caprílico, ácido cáprico y/o ácido láurico. El ácido cáprico, el ácido láurico y el ácido caprílico aumentan los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL). En particular, el ácido láurico aumenta el colesterol sérico total, por lo que la mayor parte del aumento se debe a un aumento de la lipoproteína de alta densidad (HDL). Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se definen como ácidos grasos que tienen un doble enlace en la cadena de ácido graso con todos los átomos de carbono restantes que se unen por enlaces sencillos. Un MUFA particularmente preferido presente en un producto alimenticio de acuerdo con la invención es el ácido palmitoleico. Por lo tanto, dicho producto alimenticio comprende, preferentemente, ácido láurico, ácido palmitoleico y/o colesterol, con mayor preferencia ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol. El ácido láurico está presente, preferentemente, en un producto alimenticio en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 20-65 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 26-53 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 33-40 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 34-37 % en peso de sólidos totales, tales como aproximadamente 35 % en peso de sólidos totales o aproximadamente 36 % en peso de sólidos totales. El ácido palmitoleico está presente, preferentemente, en un producto alimenticio en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,2-1,2 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,3-1,0 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,4-0,8 % en peso de sólidos totales, con la máxima preferencia 0,5-0,7 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 0,6 % en peso de sólidos totales. El colesterol está presente preferentemente en un producto alimenticio en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,3-2,5 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,4-2 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,5-1,5 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,6-1 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 0,7 % en peso de sólidos totales, o 0,8 % en peso de sólidos totales. Dicho producto alimenticio comprende, además, preferentemente, ácido oleico y ácidos linoleicos. El ácido oleico está presente preferentemente en dicho producto alimenticio en una cantidad de 0,6-20 % en peso de sólidos totales, preferentemente 2-10 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 3-7 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 3,5-5 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 4-4,6 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 4,3 % en peso de sólidos totales, aproximadamente 4,4 % en peso de sólidos totales o aproximadamente 4,5 % en peso de sólidos totales. El ácido linoleico está presente preferentemente en dicho producto alimenticio en una cantidad de 0,3-7 % en peso de sólidos totales, preferentemente 0,5-4,5 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 0,6-2,5 % en peso de sólidos totales, lo con mayor preferencia 0,7-1,5 % en peso % de sólidos totales, tal como aproximadamente 0,9 %

en peso de sólidos totales, aproximadamente 1 % en peso de sólidos totales o aproximadamente 1,1 % en peso de sólidos totales.

5 Como se demuestra en los Ejemplos, un producto alimenticio de acuerdo con la invención que comprende triglicéridos de cadena media (MCT), preferentemente ácido láurico, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), preferentemente ácido palmitoleico, y colesterol, donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales (denominado Y-D-Fix en los ejemplos) es particularmente preferido porque es capaz de reducir el aumento de IL-8 inducido por deoxinivalenol (DON) en los cerdos después del destete, lo que indica un efecto antiinflamatorio ya que IL-8 se expresa notablemente en la mucosa intestinal inflamada y se conoce que está involucrada en el proceso inicial de la inflamación intestinal. Es importante destacar que la ganancia de peso diario promedio se incrementa en los cerditos suplementados con un producto alimenticio de este tipo después de la administración del mismo. Además, la administración de un producto alimenticio de este tipo aumentó la longitud de las vellosidades en el intestino. El destete de los cerditos resulta, generalmente, en una reducción de la longitud de las vellosidades, mientras que el aumento de la longitud de las vellosidades es importante porque aumenta el área de la superficie intestinal y, por lo tanto, la capacidad de absorción de nutrientes. El inicio de la fase de destete con aumento de la longitud de las vellosidades es, por lo tanto, beneficioso para que los cerditos superen los cambios fisiológicos. Sin deseos de limitarse por alguna teoría, se cree que tal composición es particularmente útil para mejorar la salud de los cerditos en el período vulnerable de destete porque la composición se parece al contenido de grasa y colesterol y al perfil específico de ácidos grasos encontrados en la leche de cerda en los años 80 y 90. El presente inventor analizó la composición de ácidos grasos de la leche de cerda y descubrió que el contenido actual de grasa y colesterol de la leche de cerda difiere en gran medida del valor informado en la literatura en los años 80 y 90 para la leche de cerda. El contenido de grasa fue 1,00% +/- 0,51%. Este contenido de grasa de la leche de cerda obtenida para este estudio fue de 6 a 12 veces inferior que el valor informado para la leche de cerda en los años 80 y 90. El contenido de colesterol fue ~8 inferior que los valores publicados. Los cambios pueden deberse a los programas de cría de las cerdas, que están dirigidos al tamaño de la camada, la calidad de la carne, el espesor de la grasa del dorso, la eficiencia alimenticia, la ganancia diaria promedio y la edad hasta 110 kg. En 2005, el tamaño de la camada en Duroc, Landrace y Yorkshire aumentó de un promedio de 8,6 nacidos vivos en 1992 a 9,9 nacidos vivos y en 2014, a 13,8 cerdos nacidos vivos por camada en Landrace Inglesa x Blanca Grande Inglesa. La composición de la leche parece no tenerse en cuenta en los programas de cría en las últimas dos décadas y parece que la composición de la leche no co-evolucionó con el aumento en el tamaño de la camada, pero sí con la cantidad y el contenido de proteína. El contenido de proteína permaneció similar durante este cambio de raza. El inventor descubrió que la leche de cerda contiene en promedio 7,6% de proteína, que era ligeramente superior a la informada en la literatura de 5,2% a 3,2 - 5,5%. Por lo tanto, un producto alimenticio preferido para los cerditos de acuerdo con la invención tiene como objetivo aumentar la cantidad ingerida de grasa y colesterol, y proporcionar los ácidos grasos específicos encontrados en la grasa de la leche de cerda.

Se proporciona, por lo tanto, un producto alimenticio, preferentemente un suplemento alimenticio, que comprende grasa, proteína y carbohidratos, en donde la relación de grasa: proteína está entre 2:1 y 32:1, preferentemente entre 7:1 y 10:1, que comprende además, ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol, en donde dicho ácido láurico está presente en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, preferentemente 33-40 % en peso de sólidos totales, dicho ácido palmitoleico está presente en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales, preferentemente 0,4-0,8 % en peso de sólidos totales, y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales, preferentemente 0,5-1,5 % en peso de sólidos totales. Dicho producto alimenticio, preferentemente, comprende el aceite de espinillo de mar como fuente de dicho ácido palmitoleico y aceite de coco como fuente de dicho ácido láurico. Además, dicho producto alimenticio comprende, preferentemente, aproximadamente 80-85 % en peso de grasa total de sólidos totales, 9-11 % en peso de proteína total de sólidos totales y 7-8 % en peso de carbohidratos totales de sólidos totales. Un producto alimenticio particularmente preferido comprende el ácido láurico en una cantidad de 34-37 % en peso de sólidos totales, ácido palmitoleico en una cantidad de 0,5-0,7 % en peso de sólidos totales y colesterol en una cantidad de 0,6-1 % en peso de sólidos totales, que comprende, preferentemente, el aceite de espinillo de mar como fuente de dicho ácido palmitoleico y aceite de coco como fuente de dicho ácido láurico. Dicho producto alimenticio, preferentemente, comprende, además, ácido oleico en una cantidad de 4-4,6 % en peso de sólidos totales y ácido linoleico en una cantidad de 0,7-1,5 % en peso de sólidos totales.

55 Dicho producto alimenticio, preferentemente el suplemento alimenticio, preferentemente, comprende, además, aproximadamente 41% de grasa saturada, de la cual aproximadamente 27% es de longitud de cadena media (C8, C10 y C12) y 14% es de longitud de cadena larga ( $\geq$ C14). C12:0 (ácido láurico) comprende, preferentemente, aproximadamente 21% de grasa. El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) de un producto alimenticio preferido es de aproximadamente 6% y el de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de un contenido de producto alimenticio preferido es aproximadamente 2%.

60 En una modalidad particular, la invención proporciona un producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención que comprende por 25 g de producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, 2,76 g de yema de huevo en polvo, 0,24 g de aceite de espinillo de mar, 10,60 g de aceite de coco, 0,60 g de caseinato de sodio, 0,99 g de lactosa y 9,82 g de agua.

Otro producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, no de acuerdo con la invención, comprende ácido oleico y/o ácido linoleico, preferentemente ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales y dicho ácido linoleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales.

5

El ácido oleico está presente en dicho producto alimenticio en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales, preferentemente 20-65 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 25-55 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 30-45 % en peso de sólidos totales, con la máxima preferencia 35-40 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 36 % en peso de sólidos totales, aproximadamente 37 % en peso de sólidos totales o aproximadamente 38 % en peso de sólidos totales.

10

El ácido linoleico está presente en un producto alimenticio en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales, preferentemente 20-65 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 25-55 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 30-45 % en peso de sólidos totales, con la máxima preferencia 35-40 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 37 % en peso de sólidos totales, aproximadamente 38 % en peso de sólidos totales o aproximadamente 39 % en peso de sólidos totales.

15

Como se demuestra en los Ejemplos, un producto alimenticio que comprende ácido oleico en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales y ácido linoleico en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales (denominado Ennovy en los Ejemplos) se describe porque es capaz de aumentar la ganancia de peso promedio diaria en cerditos suplementados con dicho producto alimenticio después de la administración del mismo. Además, la administración de un producto alimenticio de este tipo aumentó la longitud de las vellosidades en el intestino. El destete de los cerditos resulta, generalmente, en una reducción de la longitud de las vellosidades, mientras que el aumento de la longitud de las vellosidades es importante porque aumenta el área de la superficie intestinal y, por lo tanto, la capacidad de absorción de nutrientes. El inicio de la fase de destete con aumento de la longitud de las vellosidades es, por lo tanto, beneficioso para que los cerditos superen los cambios fisiológicos.

20

25

Se proporciona, por lo tanto, un producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, que comprende grasa, proteína y carbohidrato, en donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1, preferentemente entre 7:1 y 10:1, que comprende además, ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales, preferentemente 30-45 % en peso de sólidos totales y dicho ácido linoleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales, preferentemente 30-45 % en peso de sólidos totales. Dicho producto alimenticio comprende preferentemente aceite de girasol como fuente de dicho ácido oleico y ácido linoleico. Además, dicho producto alimenticio comprende, preferentemente, aproximadamente 80-85 % en peso de grasa total de sólidos totales, 9-11 % en peso de proteína total de sólidos totales y 7-8 % en peso de carbohidratos totales de sólidos totales. Un producto alimenticio particularmente preferido comprende ácido oleico y ácido linoleico cada uno en una cantidad de 35-40 % en peso de sólidos totales.

30

35

Dicho producto alimenticio comprende preferentemente aproximadamente 5% de grasa saturada, que consiste en ácidos grasos C16 y C18. El porcentaje de MUFA en este producto alimenticio preferido es aproximadamente 11% y de PUFA es aproximadamente 33%.

40

En una modalidad particular, la invención proporciona un producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención que comprende por 25 g de producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, 12,48 g de aceite de girasol, 0,60 g de caseinato de sodio, 0,99 g de lactosa, 0,95 de proteína de guisante y 9,82 g de agua.

45

El producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, de la invención comprende, además, proteína y carbohidratos. La proteína está presente preferentemente en una cantidad de 5-20 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 7-15 % en peso de sólidos totales, con la máxima preferencia 8-12 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 10 % de sólidos totales. Cualquier fuente de proteína que sea adecuada para su uso en la nutrición de un sujeto de acuerdo con la invención puede usarse en el producto alimenticio de acuerdo con la invención. Ejemplos no limitantes son el frijol de soja, huevo, suero de leche, caseína, proteína hidrolizada y aminoácidos. Las fuentes preferidas de proteína son caseinato de sodio y proteína de guisante. Los carbohidratos están presentes preferentemente en una cantidad de 2-15 % en peso de sólidos totales, con mayor preferencia 4-10 % en peso de sólidos totales, con la máxima preferencia 5-8 % en peso de sólidos totales, tal como aproximadamente 6,6 % en peso de sólidos totales. Cualquier fuente de carbohidratos que sea adecuada para su uso en la nutrición de un sujeto de acuerdo con la invención puede usarse en el producto alimenticio de acuerdo con la invención. Ejemplos no limitantes son lactosa, sacarosa, maltodextrina y almidón. Una fuente preferida de carbohidratos es la lactosa.

50

55

60

El producto alimenticio de la presente invención es adecuado para estimular o mejorar la salud de sujetos jóvenes en el período vulnerable de destete o después del período posterior al nacimiento. El producto alimenticio de la presente invención es particularmente adecuado para estimular o mejorar la salud de sujetos jóvenes en el período vulnerable de destete. En particular, el producto alimenticio de la invención estimula el crecimiento, previene el desarrollo de enfermedades y/o reduce la incidencia de enfermedades y promueve la salud intestinal del sujeto después del destete o después del nacimiento. Por lo tanto, se proporciona además un método para estimular el crecimiento de un sujeto que

65

comprende administrar a dicho sujeto un producto alimenticio de acuerdo con la invención, por lo que dicho producto alimenticio se administra preferentemente al menos antes del destete de dicho sujeto. Alternativamente, para animales jóvenes no lactantes, tales como aves, por ejemplo, pollos, o animales que están separados de su madre directamente después del nacimiento, tales como terneros, en particular, los terneros de vacas lecheras, se proporciona un producto alimenticio de acuerdo con la invención al animal joven después del nacimiento, por ejemplo, junto con su alimento estándar para animales, porque tales animales no están sujetos al destete. En tal caso, el producto alimenticio de la invención se proporciona por ejemplo a un animal joven durante los primeros días o semanas después del nacimiento, en dependencia del tipo de animal. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Se proporciona, además, un producto alimenticio de acuerdo con la invención para estimular el crecimiento en un sujeto, preferentemente después del destete. Alternativamente, para los animales que no están sujetos al destete, se estimula el crecimiento en un animal joven después del nacimiento. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio. Alternativamente, para los animales que no están sujetos al destete, se estimula el crecimiento en un animal joven después del nacimiento. Dicha composición comprende preferentemente los ingredientes de un producto alimenticio de acuerdo con la invención. Dicha composición comprende preferentemente triglicéridos de cadena media (MCT), preferentemente ácido láurico, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), preferentemente ácido palmitoleico, y colesterol, en donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales. En otro aspecto, dicha composición comprende ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales y dicho ácido linoleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Se proporciona además un método para prevenir enfermedades en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un producto alimenticio de acuerdo con la invención, por lo que dicho producto alimenticio se administra preferentemente al menos antes del destete de dicho sujeto. Alternativamente, para los animales que no están sujetos al destete, se previene la enfermedad en un animal joven después del nacimiento. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Se proporciona además una composición que comprende grasa, proteína y carbohidratos, en donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1, preferentemente entre 7:1 y 10:1, para su uso en la prevención de enfermedades en un sujeto, preferentemente después del destete. Dicha composición comprende preferentemente los ingredientes de un producto alimenticio de acuerdo con la invención. Dicha composición comprende preferentemente triglicéridos de cadena media (MCT), preferentemente ácido láurico, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), preferentemente ácido palmitoleico, y colesterol, en donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales. En otro aspecto, dicha composición comprende ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales y dicho ácido linoleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Se proporciona además un producto alimenticio de acuerdo con la invención para prevenir enfermedades en un sujeto, preferentemente después del destete. Alternativamente, para los animales que no están sujetos al destete, se previene la enfermedad en un animal joven después del nacimiento. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito.

Alternativamente, para los animales que no están sujetos al destete, se previene la enfermedad en un animal joven después del nacimiento. Dicha composición comprende preferentemente los ingredientes de un producto alimenticio de acuerdo con la invención. Dicha composición comprende preferentemente triglicéridos de cadena media (MCT), preferentemente ácido láurico, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), preferentemente ácido palmitoleico, y colesterol, en donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales. En otro aspecto, dicha composición comprende ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales y dicho ácido linoleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Se proporciona además un método para mantener o mejorar la salud intestinal de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un producto alimenticio de acuerdo con la invención, por lo que dicho producto alimenticio se administra preferentemente al menos antes del destete de dicho sujeto. Alternativamente, para animales que no están sujetos al destete, se administra un producto alimenticio de acuerdo con la invención al animal joven después del nacimiento, por ejemplo, junto con su alimentación estándar para animales. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Se proporciona, además, un producto alimenticio de acuerdo con la invención para mantener o mejorar la salud intestinal de un sujeto, preferentemente después del destete. Alternativamente, para los animales que no están sujetos al destete, la salud intestinal se mantiene o mejora en un animal joven después del nacimiento. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Alternativamente, para animales que no están sujetos al destete, la salud intestinal se mantiene o mejora en un animal joven después del nacimiento. Dicha composición comprende preferentemente los ingredientes de un producto alimenticio de acuerdo con la invención. Dicha composición comprende preferentemente triglicéridos de cadena media (MCT), preferentemente ácido láurico, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), preferentemente ácido palmítico, y colesterol, en donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y dicho colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales. En otro aspecto, dicha composición comprende ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales y dicho ácido linoleico está presente en una cantidad de 7-80 % en peso de sólidos totales. Dicho sujeto es preferentemente un animal, con mayor preferencia un mamífero, tal como un cerdito o ternero, o un pollo, con la máxima preferencia un cerdito. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Como se usa en la presente descripción, "crecimiento estimulante" significa que se estimula el crecimiento de un sujeto al que se le ha administrado un producto alimenticio de acuerdo con la invención, preferentemente, crecimiento después del destete, en comparación con el crecimiento de un sujeto al que no se le ha administrado tal producto alimenticio. Preferentemente, la ganancia de peso diaria promedio del sujeto administrado con un producto alimenticio de acuerdo con la invención después del inicio de la administración del producto alimenticio hasta, e incluyendo, el primer día después del destete es superior en comparación con las ganancias de peso diarias promedio de un sujeto al que no se le ha administrado el producto alimenticio durante el mismo número de días antes del destete hasta, e incluyendo, el primer día después del destete.

Como se usa en la presente descripción, "prevenir la enfermedad" se refiere a la prevención de cualquier aparición de enfermedad, así como a una reducción de la aparición de la enfermedad en un sujeto. Además, se reduce la incidencia de enfermedad en un sujeto al que se le ha administrado un producto alimenticio de acuerdo con la invención después del destete, preferentemente, en comparación con la incidencia de la enfermedad en un sujeto después del destete, al que no se le ha administrado tal producto alimenticio. "Después del destete", como se usa en la presente descripción, se refiere al período inmediatamente después del destete, por ejemplo, durante 1-60 días después del destete, preferentemente 1-30 días después del destete. Por lo tanto, la enfermedad se previene preferentemente y/o la incidencia de la enfermedad se reduce, preferentemente, al menos dentro del período de 60 días después del destete, preferentemente al menos el período de 30 días después del destete. La enfermedad que se previene puede ser cualquier enfermedad que puede ocurrir en un sujeto joven alrededor del destete. Ejemplos preferidos, pero no limitantes, de enfermedades que se previenen mediante la administración de un producto alimenticio de acuerdo con la invención son la inflamación, en particular, la inflamación intestinal, la anemia, las infecciones microorgánicas y/o virales, en particular, la diarrea y el síndrome de desgaste multisistémico posterior al destete. En una modalidad preferida, dicha enfermedad que se previene o cuya incidencia se reduce es una enfermedad infecciosa.

Como se usa en la presente descripción, "mantener o mejorar la salud intestinal" significa que la salud intestinal de un sujeto al que se le ha administrado un producto alimenticio de acuerdo con la invención después del destete se mantiene en comparación con la salud intestinal de dicho sujeto antes del destete o que uno o más efectos adversos del destete sobre la salud intestinal, tales como un desequilibrio en la composición bacteriana en el intestino, una reducción de la longitud de las vellosidades, la inflamación intestinal y/o el daño epitelial intestinal, se inhiben o al menos se previenen en parte. Además, se mejora la salud intestinal de un sujeto al que se le ha administrado un producto alimenticio de acuerdo con la invención después del destete, preferentemente, en comparación con la salud intestinal de un sujeto después del destete al que no se le ha administrado tal producto alimenticio. "Después del destete", como se usa en la presente descripción, se refiere al período inmediatamente después del destete, por ejemplo, durante 1-60 días después del destete, preferentemente 1-30 días después del destete. Por lo tanto, la salud intestinal se mantiene o mejora preferentemente al menos dentro del período de 60 días después del destete, preferentemente al menos el período de 30 días después del destete. "Mantener o mejorar la salud intestinal" preferentemente significa que la longitud de las vellosidades en el intestino, preferentemente en el yeyuno, se mantiene o mejora, y/o que se previene o reduce la inflamación intestinal, como por ejemplo evidenciada por la cantidad de IL-8 en la sangre, se reduce el número de bacterias *streptococcus suis* en los intestinos y/o se reduce el nivel de fosfatasa alcalina en la sangre.

Como se usa en la presente descripción, un "sujeto" es un ser humano o un animal. El término "animal" como se usa en la presente descripción se refiere a ganado, animales de granja, animales domésticos, animales de compañía y animales silvestres. Los animales preferidos que se tratan de acuerdo con la invención con un producto alimenticio son animales de ganado, con mayor preferencia mamíferos de ganado. Como se usa en la presente descripción, el término "ganado" se refiere a un animal domesticado mantenido en un entorno agrícola. El término incluye, pero no se limita a vacas, cerdos, aves de corral, cabras, oveja, caballos, búfalo, llamas, burros y mulas. En una modalidad preferida adicional, dicho sujeto es un mamífero. Los productos alimenticios y los métodos de la invención son particularmente adecuados para su uso en terneros, cerditos y pollos jóvenes. Un "ternero" como se usa en la presente descripción se refiere a las crías de ganado vacuno doméstico y/o de granja. Se proporciona, por lo tanto, un producto alimenticio de acuerdo con la invención, que es un producto alimenticio, para cerdito, un suplemento alimenticio para cerdito, un producto alimenticio para ternero o suplemento alimenticio para ternero o un producto alimenticio para pollo del suplemento alimenticio para pollo.

En una modalidad particularmente preferida, el animal provisto de un producto alimenticio o suplemento alimenticio de acuerdo con la invención es un cerdito y un producto alimenticio o suplemento alimenticio de acuerdo con la invención es un producto alimenticio para cerditos. Cualquier raza o cruce de cerdo que se use en el ganado o como animal de granja o doméstico puede tratarse ventajosamente con un producto alimenticio o suplemento alimenticio de la invención. Ejemplos no limitativos de tales razas de cerdos que se tratan ventajosamente con un producto alimenticio o suplemento alimenticio de la invención son Duroc, Blanca Grande, Blanca Grande Inglesa, Landrace, tales como Landrace Holandesa, Landrace Alemana, Landrace Danesa, Landrace Inglesa y Landrace Finlandesa, Yorkshire, Pietrain alemán, Pietrain Belga, Ibérica, Mangalitsa (rumana), y Bentheim Black Pied. En una modalidad preferida, un cerdo provisto con un producto alimenticio o suplemento alimenticio de la invención es un cerdo de una camada grande. Una "camada grande" como se usa en la presente descripción se refiere a una camada de al menos 10 cerditos, preferentemente al menos 11 cerditos, con mayor preferencia al menos 12 cerditos, con la máxima preferencia al menos 13 cerditos.

En otro aspecto, el producto alimenticio se usa para complementar la dieta de los bebés humanos, en particular, los bebés humanos amamantados o bebés humanos alimentados con fórmula antes de que los bebés se desteten. Un producto alimenticio de la invención es, por ejemplo, administrado ventajosamente a bebés prematuros, por ejemplo, para ayudar a prevenir la enterocolitis necrosante. Se proporciona, por lo tanto, un producto alimenticio de acuerdo con la invención que es un producto alimenticio para bebés humanos. Se proporciona además un método o uso de la invención, en donde el sujeto es un bebé humano, preferentemente un bebé humano prematuro. Como se usa en la presente descripción, el término "bebé prematuro" se refiere a un bebé nacido antes del final de un término gestacional normal. En particular, se refiere a un bebé nacido antes de las 36 semanas de gestación. Preferentemente, se proporciona un método o uso de la invención en donde el sujeto es un bebé humano, preferentemente un bebé humano prematuro, para prevenir enfermedades, con mayor preferencia, para prevenir la enterocolitis necrosante.

En otro aspecto, un producto alimenticio de la invención se usa para complementar la dieta de pollos jóvenes. En otro aspecto, un producto alimenticio de la invención se usa para complementar la dieta de pollos jóvenes. La mayoría de los pollos que no sobreviven después del nacimiento mueren alrededor de los tres días de edad. Por lo tanto, se proveen a los pollos con el producto alimenticio, preferentemente, en el primer período directamente después del nacimiento. Preferentemente, el producto alimenticio de la invención se proporciona a pollos durante las primeras 6 semanas después del nacimiento, con mayor preferencia durante las primeras 2 semanas después del nacimiento, con mayor preferencia durante la primera semana después del nacimiento, con mayor preferencia durante los días 0-5 después del nacimiento o durante los días 0-3 siguientes al nacimiento. Como se usa en la presente descripción, el término de 0-5 días después del nacimiento se refiere al período que incluye el día de nacimiento hasta el quinto día después del nacimiento.

Un producto alimenticio, preferentemente suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención se administra preferentemente a un sujeto o animal al menos antes del destete de dicho sujeto o animal. Preferentemente, dicho producto alimenticio se administra a un sujeto o animal, preferentemente un cerdito, desde al menos un día antes de destetar dicho sujeto hasta el día del destete de dicho sujeto o animal, preferentemente incluyendo el día del destete. Preferentemente, dicho producto alimenticio se administra diariamente desde al menos tres días, con mayor preferencia al menos cuatro días, con mayor preferencia al menos cinco días antes de destetar dicho sujeto o animal, preferentemente un cerdito, hasta el día del destete de dicho sujeto o animal, preferentemente incluyendo el día del destete.

La administración del producto alimenticio de la invención al sujeto o animal puede continuarse después del destete del sujeto o animal, por ejemplo, hasta 1, 3, 5, 10 o 30 días después del destete. Por lo tanto, un producto alimenticio de acuerdo con la invención se administra, por ejemplo, diariamente a un sujeto o animal, preferentemente un cerdito, desde al menos un día, preferentemente al menos tres días, con mayor preferencia al menos cinco días antes de destetar dicho sujeto hasta 1, 3, 5, 10 o 30 días después del destete dicho sujeto o animal. Si la administración del producto alimenticio continúa después del destete, el producto alimenticio se añade, por ejemplo, a la alimentación del animal. Por lo tanto, se proporciona, además, un alimento para animales que comprende un producto alimenticio, preferentemente un suplemento alimenticio, de acuerdo con la invención. Dicha alimentación animal es preferentemente una alimentación para cerdos, una alimentación para pollos o una alimentación para vacas o terneros, o una fórmula infantil.



Un producto alimenticio de acuerdo con la invención se administra preferentemente al sujeto en una cantidad que es suficiente para estimular el crecimiento, prevenir enfermedades o reducir la incidencia de enfermedades y/o mantener o mejorar la salud intestinal. La cantidad específica depende del tipo de sujeto o animal al que se le proporciona el producto alimenticio. Por ejemplo, a los cerditos se le proporcionan, preferentemente, entre 10 y 20 gramos por día del producto alimenticio, tal como aproximadamente 15 gramos por día (% en peso de sólidos totales del producto alimenticio). A los pollos se le proporcionan, preferentemente, entre 5 y 10 gramos por día del producto alimenticio, tal como aproximadamente 7 u 8 gramos por día (% en peso de sólidos totales del producto alimenticio). A los terneros se le proporcionan, preferentemente, entre 50 y 100 gramos por día del producto alimenticio, tal como aproximadamente 75 gramos por día (% en peso de sólidos totales del producto alimenticio).

Un producto alimenticio de acuerdo con la invención que comprende triglicéridos de cadena media (MCT), preferentemente ácido láurico, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), preferentemente ácido palmitoleico, y colesterol, preferentemente se administra en una dosis diaria que contiene 2-15 g de dicho MCT, preferentemente ácido láurico, 20-250 mg de dicho MUFA, preferentemente ácido palmitoleico, y 0,03-0,5 g de dicho colesterol, preferentemente a un cerdito, en un método de la invención para estimular el crecimiento, prevenir la enfermedad o reducir la incidencia de la enfermedad y/o mantenimiento o mejoría de la salud intestinal. Por lo tanto, un método preferido de la invención comprende administrar a un cerdito un producto alimenticio que comprende ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol, en donde el ácido láurico se administra en una dosis diaria de 2-12 g, el ácido palmitoleico se administra en una dosis diaria de 20-250 mg y dicho colesterol se administra en una dosis diaria de 0,03-0,5 g. Preferentemente, se administra ácido láurico, preferentemente a un cerdito, en una dosis diaria de 3-10 g, con mayor preferencia 4-8 g, con la máxima preferencia 5-6 g, tal como aproximadamente 5,4 g o aproximadamente 5,5 g. Además, se administra preferentemente ácido palmitoleico, preferentemente a un cerdito, en una dosis diaria de 30-200 mg, con mayor preferencia 40-150 mg, con mayor preferencia 60-120 mg, con mayor preferencia 70-100 mg, con la máxima preferencia 75-90 mg, tal como aproximadamente 83 mg o aproximadamente 85 mg. Se administra preferentemente colesterol, preferentemente a un cerdito, en una dosis diaria de 0,03-0,5 g, preferentemente 0,05-0,4 g, con mayor preferencia 0,07-0,25 g, con mayor preferencia 0,08-0,15g, con la máxima preferencia 0,09-0,13 g, tal como aproximadamente 0,1 g, 0,11 g o 0,12 g. Además, dicho producto alimenticio comprende preferentemente ácido oleico y ácido linoleico. Dicho ácido oleico se administra, preferentemente a un cerdito, en una dosis diaria de 0,1-3 g, preferentemente 0,3-1,5 g, con mayor preferencia 0,45-1 g, con mayor preferencia 0,55-0,75 g, con la máxima preferencia 0,6-0,7 g, tal como como aproximadamente 0,65 g, aproximadamente 0,66 g, o aproximadamente 0,67 g. Dicho ácido linoleico se administra, preferentemente a un cerdito, en una dosis diaria de 0,05-1 g, preferentemente 0,07-0,7 g, con mayor preferencia 0,09-0,4 g, con la máxima preferencia 0,1-0,25, tal como aproximadamente 0,14 g, aproximadamente 0,15 g o aproximadamente de 0,16 g. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Un producto alimenticio de acuerdo con la invención que comprende ácido oleico y ácido linoleico, se administra preferentemente en una dosis diaria que contiene 1-12 g de dicho ácido oleico y 1-12 g de dicho ácido linoleico, preferentemente a un cerdito, en un método de la invención para estimular el crecimiento, prevenir enfermedades o reducir la incidencia de enfermedades y/o mantener o mejorar la salud intestinal. Por lo tanto, otro método preferido de la invención comprende administrar a un cerdito un producto alimenticio que comprende ácido oleico y ácido linoleico, en donde dicho ácido oleico se administra en una dosis diaria de 1-12 g y dicho ácido linoleico se administra en una dosis diaria de 1-12 g. Preferentemente, se administran ácido oleico y ácido linoleico, preferentemente a un cerdito, en una dosis diaria de 3-10 g, con mayor preferencia 4-8 g, con la máxima preferencia 5-6,5 g, tal como aproximadamente 5,6 g, aproximadamente 5,7 g, o aproximadamente de 5,8 g. Dicho producto alimenticio es preferentemente un suplemento alimenticio.

Un producto alimenticio o suplemento alimenticio de acuerdo con la invención puede administrarse de cualquier manera conocida en la técnica para alimentar a sujetos o animales jóvenes a una edad en la que típicamente se destetan. Por ejemplo, los cerdos, generalmente, se destetan a una edad de entre 15 y 30 días después del nacimiento. Los terneros de las vacas lecheras se separan de su madre directamente después del nacimiento, pero los terneros de las vacas de carne generalmente se destetan a una edad de aproximadamente 10 meses después del nacimiento. Como se describió en la presente descripción anteriormente, para animales jóvenes no lactantes, tales como aves, por ejemplo, pollos, o animales que se separan de su madre directamente después del nacimiento, tales como terneros, en particular terneros de vacas lecheras, un producto alimenticio de acuerdo con la invención se proporciona al animal joven después del nacimiento, por ejemplo, junto con su alimento estándar para animal, porque tales animales no están sujetos al destete.

Preferentemente, el producto alimenticio de la invención se administra a un sujeto o animal por vía oral, por ejemplo, como una composición líquida o viscosa, tal como una solución, dispersión o emulsión. La administración oral del producto alimenticio se realiza, por ejemplo, con el uso de un biberón, un tubo o se proporciona a animales jóvenes en un comedero. Preferentemente, se proporciona un producto alimenticio o suplemento alimenticio de acuerdo con la invención de manera que se logre la ingesta voluntaria del producto alimenticio o suplemento alimenticio, por ejemplo, proporcionando el producto alimenticio o suplemento alimenticio en un comedero, opcionalmente mezclado con el alimento regular para animales. Si el sujeto provisto con un producto alimenticio de suplemento alimenticio de la invención es un cerdo, el producto o suplemento se proporciona preferentemente en un comedero para cerdos. Si el sujeto provisto con un producto alimenticio de un suplemento alimenticio de la invención es un pollo, el producto o

suplemento se proporciona preferentemente mezclado con la alimentación regular de pollo. Si el sujeto provisto con un producto alimenticio de suplemento alimenticio de la invención es un ternero, preferentemente un ternero de una vaca lechera, el producto o suplemento se proporciona preferentemente mezclado con la alimentación regular de ternero, por ejemplo, leche de ternera. Si el producto alimenticio o suplemento alimenticio se mezcla con una dieta regular, por ejemplo, con alimento para pollos o si la administración del producto alimenticio continúa después del destete de un sujeto o animal, puede mezclarse por ejemplo en forma sólida y/o seca con alimento para animales sólido o semisólido.

La invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

10 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: El efecto del control (C), Y-D-Fix (D) o Ennovy (E) en la producción de IL8 (Figura 1A) y TEER (Figura 1B) *in vitro*. Las barras negras representan controles de disolvente, las barras grises representan células Caco-2 incubadas con DON 4,2 µM. Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ . Se incubaron células Caco-2 como se indica en la sección de materiales y métodos sólo con DON o disolvente. 2 horas antes, se añadió agua digerida (C), Y-D-Fix (D) o Ennovy (E). La producción de IL8 se analizó apical y basolateralmente, pero fue visible un efecto de DON y de las digestiones en el lado apical de las células. No se muestran los efectos en el lado basolateral.

Figura 2: El peso diario promedio aumenta (ADWG) durante los cinco días consecutivos de administración de Y-D-Fix o Ennovy o agua. Panel A; el ADWG en el grupo control (círculos), el grupo tratado Y-D-Fix (cuadrados) y el grupo tratado Ennovy (triángulos). Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ . El panel B muestra el ADWG en el tercil mínimo de los animales al inicio del experimento (día 21).

Figura 3: La relación de AUC de lactulosa y manitol en plasma, se corrige para el peso corporal. Grupo tratado con agua (círculos), el grupo tratado con Y-D-Fix (cuadrados) y el grupo tratado con Ennovy (triángulos). Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ . Lactulosa y manitol se administraron como se indica en la sección de materiales y métodos 12 horas después del inicio del destete. Directamente antes de esta administración, se extrajo una muestra de sangre, así como seis veces durante las 36 horas posteriores al inicio del destete.

Figura 4: Actividad de fosfatasa alcalina (panel A) y expresión de IL8 (panel B) en plasma. Los círculos representan el grupo control con agua, los cuadrados representan el grupo Y-D-Fix, los triángulos representan el grupo Ennovy. El intervalo fisiológico normal (inferior [41 U/l] y superior [176 U/l]) de aPhos se indica entre líneas discontinuas. La actividad de APhos en plasma se analizó justo antes del destete.

Figura 5: Concentraciones de ácidos grasos de cadena corta en las heces. Panel A, B, C predestete, panel D, E, F después del destete. Panel A, D, ácido acético, panel B, ácido propiónico E, panel C, ácido butírico F. Círculos: control con agua C; cuadrados: Y-D-Fix, triángulos: Ennovy. Los datos se representan como cantidades por grupo y como promedio ( $\pm$ SEM) de todos los grupos con el mismo tratamiento.

Figura 6: El contenido de *Streptococcus suis* de las muestras de heces en comparación con bacterias totales y con el grupo control C con agua. Barras negras: antes del destete, barras grises: después del destete. C - grupo control con agua, grupo D - Y-D-Fix, grupo E - Ennovy. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Figura 7: Longitud de vellosidades del epitelio intestinal. Panel A: longitud de vellosidades del yeyuno medio (2,75 m desde el píloro del estómago), panel B: longitud de vellosidades del yeyuno proximal (0,5 m desde el píloro del estómago), panel C: longitud de vellosidades del duodeno (0,1 m desde el píloro del estómago). Los círculos representan el grupo control con agua, los cuadrados representan el grupo Y-D-Fix, los triángulos representan el grupo Ennovy.

Figura 8: Examen histológico de la longitud de las vellosidades después de Y-D-Fix, Ennovy o control con agua en el yeyuno medio (2,75 m desde el píloro del estómago).

**EJEMPLOS**

55 Materiales y métodos:

*Experimentos in vitro*

Cultivo celular (IPEC-J2 y Caco-2)

60 Las células epiteliales porcinas intestinales (IPEC-J2 pasajes 83 - 87) fueron gentilmente donadas por el prof. R. Pieters (IRAS, Universidad de Utrecht, Países Bajos). Se cultivaron células IPEC-J2 en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One, Alphen a/d Rijn, Países Bajos) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/ F12 de Ham suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/mL) (Gibco, Life Technologies Europe, Bleiswijk, Países Bajos). Se usaron células IPEC-J2 para el análisis de MTT.

5 Células Caco-2 se cultivaron en medios esenciales mínimos (MEM), suplementado con FBS al 10%, aminoácidos no  
 10 esenciales (NEAA) al 1%, piruvato al 1%, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/mL), todos de Gibco (Life  
 Technologies Europe, Bleiswijk, Países Bajos). Se llevaron a cabo experimentos con células Caco-2 con células  
 cultivadas en transwell estéril de 0,3 cm<sup>2</sup> con insertos de membrana de poliéster de 0,4 µm de poro colocados en una  
 placa de 24 pocillos (Corning, Sigma-Aldrich, Países Bajos), si no se indica de cualquier otra forma. Las células se  
 sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por inserto. Las placas de cultivo celular se incubaron a 37°C, en una  
 atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 21 días de cultivo, se obtuvo una monocapa confluyente con una  
 resistencia eléctrica transepitelial (TEER) que excede 500 Ω·cm<sup>2</sup> medida por un voltímetro (EVOM2, voltímetro epitelial,  
 World Precision Instruments). El cultivo celular se probó regularmente y se encontró que estaba libre de contaminación  
 por micoplasma.

#### Ensayo MTT

15 Para confirmar la falta de citotoxicidad a 4,2 µM de DON tal como se publicó previamente por Akbari y otros. (The  
 FASEB Journal 204; 28, 2414-2429), se realizó un ensayo de MTT con el uso de células IPEC-J2 en una placa de 96  
 pocillos. El ensayo MTT evalúa la viabilidad celular mediante el análisis de la capacidad de las células para reducir el  
 colorante de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Países  
 Bajos) en el formazán de color morado. Con el uso del análisis colorimétrico, se cuantifica la viabilidad celular. Para el  
 20 ensayo de MTT, se preparó un concentrado de MTT de 5 mg/ml en PBS y este se diluyó seis veces en FBS al 10% en  
 medio. El sobrenadante se aspiró y las células se incubaron con 100 µl de la solución de MTT. Esto se incubó durante 3  
 horas en la incubadora. Después de eso, se aspiró el medio y se añadieron 100 µl de DMSO a las células. La placa se  
 agitó a baja intensidad durante diez minutos y se midió la absorción a 560 nm con el uso de un espectrofotómetro  
 (Fluostar Omega, BMG Labtech).

#### 25 Mediciones de TEER.

Se cultivaron células Caco-2 como se describió anteriormente. La integridad de la monocapa se evaluó de forma regular  
 con el uso de las dos primeras placas de 24 pocillos durante 21 días. Para evitar la contaminación, en las placas de  
 pocillos siguientes, TEER solo se midió justo antes del inicio del experimento. En promedio, los valores de TEER para  
 30 las células no tratadas fueron de  $550 \pm 24 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Las células se expusieron mediante la adición de deoxinivalenol 4,2  
 µM al lado apical y basolateral en el medio de cultivo celular como se describió previamente por Akbari y otros. (The  
 FASEB Journal 204; 28, 2414-2429).

#### 35 Producción de interleuquina-8

Se cultivaron células Caco-2 e IPEC-J2 en insertos y en placas de 12 pocillos, respectivamente. Se incubaron capas  
 confluentes de células con diluciones 1:100 de digestiones 2 horas antes de la adición de DON. Después se incubaron  
 las células en presencia tanto de digestiones como de DON durante 24 horas antes del análisis. La TEER se midió  
 como se describió anteriormente. La interleuquina-8 (IL-8) se analizó con el uso del kit de ELISA CXCL8/IL-8 DuoSet  
 porcino (DY535, sistemas de R&D Abbingdon, RU) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usaron para el  
 40 análisis sobrenadante apical y basolateral de placas transwell. Las muestras se diluyeron diez veces en PBS.

#### Disolución de DON

45 Se preparó deoxinivalenol (DON, Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) como una solución concentrada 5 mM en  
 etanol al 96% y se almacenó a -20°C.

#### *Digestión de suplementos in vitro*

50 Y-D-Fix y Ennovy se digirieron *in vitro* en base al protocolo publicado previamente (Hollebeeck y otros. Food Chem.  
 2013;138(2-3):1936-44). En resumen, se usó el siguiente protocolo para la digestión de los suplementos. El jugo de  
 estómago se preparó añadiendo 175 mg de NaCl, 110 mg de KCl, 110 mg de CaCl<sub>2</sub>, 113,7 mg de pepsina y 1,12 mg de  
 lipasa a 1000 ml de agua desmineralizada. El pH se ajustó a 3 con el uso de HCl 1 M y las enzimas se añadieron justo  
 antes del uso. El jugo del intestino delgado se preparó añadiendo 1,25 g de NaCl, 150 mg de KCl, 55 mg de CaCl<sub>2</sub>,  
 55 1,487 g de pancreatina (80 mg de pancreatina/g de proteína) y 11,143 g de bilis (60 mg de bilis/g de proteína de extracto  
 biliar bovino) hasta 1000 ml de estéril agua desmineralizada. El pH se ajustó a pH 6,5 con el uso de NaHCO<sub>3</sub> 1M. La  
 lipasa (100-400 U/mg de proteína), pepsina, pancreatina y bilis fueron de Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos. Se  
 preparó tampón de fosfato (0,1 M, pH 6,5) disolviendo 828 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y 712 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O en 100 ml de  
 agua desmineralizada. El pH se ajustó a pH 6,5 con el uso de HCl. Todas las soluciones se calentaron a 37°C antes de  
 60 su uso. Se pesaron 0,2 g de muestra de prueba en un tubo de ensayo de 50 ml. Se añadieron 5 ml de jugo de estómago  
 que incluía enzimas y se incubó durante 60 minutos a 37°C en un agitador orbital. Después de eso, el pH se ajustó a 6,5  
 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> 1M y se añadió 10 ml de jugo del intestino delgado que incluía enzimas, así como 0,5  
 ml de tampón fosfato. Esto se incubó a 37°C durante 3 horas en un agitador orbital, y 1 hora a 37°C en un baño de  
 agua. El pH se ajustó después a 7,4 y se incubó 1 ml de las muestras digeridas durante 10 minutos a 90°C para  
 65 inactivar la actividad enzimática. Esas muestras se usaron después en una dilución 1:100 en medio de cultivo celular.

Diseño experimental del ensayo clínico y cuidado del cerdo

Diseño experimental:

5 El estudio se realizó para comparar la eficacia del producto alimenticio Y-D-Fix con Ennovy y agua C.

Animales:

10 Los cerditos nacieron en las instalaciones de prueba. Las madres (Landrace Inglesa x Blanca Grande Inglesa, promedio de edad de 3,1 años) llegaron al centro de pruebas aproximadamente 10 días antes del parto esperado. Las cerdas habían dado a luz al menos 5 veces anteriormente. El tamaño promedio de la camada en la granja de origen fue 13,8. Las cerdas se alojaron en establos de parición en la instalación de prueba animal de acuerdo con las Directrices Europeas para el alojamiento de Animales de Prueba. La temperatura en la instalación de prueba fue en promedio de 21,8°C. Las cerdas tuvieron acceso ilimitado al agua potable y el régimen de alimentación fue tal como se alimentaron hasta la llegada a las instalaciones de prueba. El consumo de alimentos y el estado de salud de las cerdas se monitoreó y registró diariamente. Las cerdas se administraron dos veces al día con 1,2 kg de alimento ("Dracht": código 3053, De Heus Animal Nutrition BV, Ede-Wageningen, Países Bajos). Después del parto, las cerdas recibieron alimentación diaria tres veces libremente hasta un máximo de 7 kg por día ("Lacto": código 3079, De Heus Animal Nutrition BV, Ede-Wageningen, Países Bajos). La granja de origen fue libre de patógenos específicos (SPF).

20 Los animales de prueba nacieron sin necesidad de asistencia veterinaria. El tamaño de la camada fue, en promedio, de 14,8 cerditos nacidos vivos. Los cerditos tuvieron acceso a una lámpara de calentamiento bajo la cual la temperatura estaba constantemente entre 30 - 32°C. En el día del nacimiento, los cerditos recibieron una marca de oreja con un número de identificación y se pesaron. Al tercer día de vida, recibieron una inyección intramuscular de 1 ml de hierro 20% + B12 (Dopharma, Raamsdonksveer, Países Bajos) detrás de la oreja y se pesaron. Los cerditos tuvieron acceso a dos bebedores de pezones, además del bebedor de pezón de la cerda. A los cerditos no se les ofreció alimentación lenta, ya que el consumo por cerdito no se pudo monitorear gentilmente, y el consumo podría influir en los resultados del ensayo. Se monitorearon diariamente los cerditos y se excluyeron del ensayo los que no prosperaron. Al comienzo del experimento se incluyeron 74 cerditos. 24 en el grupo Y-D-Fix, 24 en el grupo Ennovy y 26 en el grupo control C. 36 cerditos fueron machos varones, 41 eran hembras. Macho: hembra en Y-D-Fix fue 13 : 14, en Ennovy 13 : 13 y en el grupo control 11 : 14.

Observaciones de salud general, signos clínicos y mortalidad

35 Desde el día 1 de vida de los cerditos, la salud se controló según los siguientes criterios: diarrea, retraso del crecimiento, inflamación de las articulaciones, paso inestable, cojera, neumonía, onfalitis, muerte súbita. La muerte súbita siempre estuvo precedida por uno o varios días de retraso en el crecimiento. Tres animales se sacrificaron como consecuencia de una falla grave en el desarrollo.

40 Aleatorización y tratamiento

45 Los días 19 y 20 los cerditos se familiarizaron con la sonda del estómago y la manipulación, con el uso de 30 ml de agua tibia. A partir del día 21 de edad hasta el día 25, los cerditos recibieron cualquiera de los tres tratamientos: Y-D-Fix, Ennovy o agua (grupo control C). Los cerditos se asignaron a uno de los tres tratamientos al azar, por lo que cada camada se dividió en tres grupos. El género se dividió lo más uniformemente posible entre los grupos. En el día 25, los cerditos se destetaron y colocaron en corrales separados por grupo (un promedio de 4 animales por corral, como mínimo 2, como máximo 6 animales por corral), que tenían un tamaño de 60 x 150 cm. En el día 26 de vida, se administró Y-D-Fix, Ennovy o agua por última vez, precedido por una mezcla de lactulosa-manitol.

50 Especificación de los tratamientos

55 Y-D-Fix consistió en una mezcla de 510 kJ de aceite de coco, yema de huevo en polvo, aceite de espino cerval de mar, caseinato de sodio y lactosa. Ennovy consistió en una mezcla de 510 kJ de aceite de girasol, proteína de guisante, caseinato de sodio (Na-Cas EM7) y lactosa. Las composiciones exactas por tratamiento se indican en la Tabla 1. El control con agua C fue agua pura. Ennovy es una composición que no está de acuerdo con la invención.

Tabla 1. Composición de los tratamientos (D: Y-D-Fix; E: Ennovy).

	D	E
yema de huevo en polvo	2,76	
aceite de espino cervical de mar (g)	0,24	
aceite de coco (g)	10,60	
Na-Cas EM7 (g)	0,60	0,60
lactosa (g)	0,99	0,99
agua (g)	9,82	9,99
aceite de girasol (g)		12,48
proteína de guisante (g)		0,95
total (g)	25,0	25,0
grasa total (g)	12,4	12,5
proteína total (g)	1,5	1,5
CHO total (g)	1,1	1,0

Como Y-D-Fix tuvo un color amarillo intenso a anaranjado, se usó un colorante (colorante para glaseado Wilton amarillo dorado, Wilton Industries, Woodridge, IL 60517, EE. UU.) para asegurar el cegamiento de los investigadores. Ambos tratamientos contuvieron 50% de grasa, 6% de proteína y 4% de carbohidrato (CHO). La dosis usada fue de 25 g y esto se administró a los animales mediante sonda nasogástrica (Catéter para perros con Luer Mount hembra 3,3 mm OD x 60 cm).

#### Ingredientes de los suplementos

La solución de yema de huevo fue de Adriaan Goede BV (Landsmeer, Países Bajos). El producto de caseinato sódico 7 (EM7) fue de FrieslandCampina DMV (Veghel, Países Bajos). El aceite de coco fue de Henry Lamotte Oils GmbH (Bremen, Alemania). La proteína del guisante fue de Rawfood Vena (Apeldoorn, Países Bajos). El aceite de espino cervical de mar fue de Anthémis Aromatherapie (Oosterstreek, Países Bajos). El aceite de girasol fue de Albert Heijn (Zaandam, Países Bajos). La lactosa fue de FrieslandCampina DOMO (Amersfoort, Países Bajos).

Los suplementos se estabilizaron en un Ultra Turrax. Para Ennovy, todos los ingredientes se mezclaron a temperatura ambiente y se sometieron a un Turrax durante 10 minutos a 8000/min. Para Y-D-Fix, el aceite de coco se fluidizó en un baño de agua a 50°C. La solución de yema de huevo se preparó mezclando 221 g de yema de huevo en polvo con 785 ml de agua en el Turrax. Se añadieron 48 g de EM7 y 79 g de lactosa. Se añadieron 19 g de aceite de espino cervical de mar a los 848 g de aceite de coco fluidizado. Esto se mezcló con la solución de yema de huevo en el Turrax durante 10 minutos a 8000/min. La viscosidad de Ennovy fue baja, pero la de Y-D-Fix fue alta. Ambos tratamientos se pasteurizaron en un baño de agua durante 10 minutos a 72°C y se almacenaron alícuotas en jeringas de 10 ml para facilitar la administración.

#### Lactulosa manitol

El jarabe de lactulosa fue de Centrafarm Services B.V., Etten-Leur, Países Bajos, y contuvo 500 mg por g de jarabe (670 mg/ml). Se usó jarabe de 12 ml por cerdito, que correspondió a 8 g, lo que contuvo 4 g de lactulosa. El manitol (> 98% D-manitol) fue de Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Países Bajos). Lactulosa y manitol se mezclaron justo antes de su uso y se almacenaron en alícuotas de 1 dosis en jeringas de 50 ml para facilitar la administración. La mezcla de lactulosa-manitol se administró por sonda, que se siguió por la administración final del producto de prueba o agua, para evitar la pérdida de lactulosa y manitol que permaneció en el volumen vacío de la sonda nasogástrica.

#### Muestreo de sangre

Se tomaron muestras de sangre de la vena cava craneal con el uso de un sistema de muestreo de sangre Venoject, con aguja 20Gx1,5, en tubos recubiertos con heparina (BD Plymouth, UK, LH 68 IU, REF 3688884) y tubos recubiertos con EDTA (BD Plymouth, K2E 7,2 mg, REF 368861). Inmediatamente después de extraer las muestras de sangre, se centrifugaron a 4°C, 3600 rpm durante 10 minutos, y el plasma se transfirió a -80°C hasta un análisis posterior. Se extrajo una muestra de sangre en blanco justo antes del traslado de los animales a los corrales de los cerditos. Este fue el comienzo del experimento. Después de un ayuno nocturno, se extrajo una segunda muestra de sangre y después de

eso, Y-D-Fix, Ennovy o el control con agua C se administró precedido por la mezcla de lactulosa-manitol. Las siguientes muestras de sangre se extrajeron después de 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas.

#### Análisis de suero

5 La actividad de fosfatasa alcalina en suero con heparina se analizó con el uso del kit de ensayo de fosfatasa alcalina (colorimétrica) (ab83369) de Abcam (Cambridge, RU), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La interleuquina-8 (IL-8) se analizó con el uso del kit de ELISA CXCL8/IL-8 DuoSet porcino (DY535, sistemas de R&D Abbingdon, RU) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Lactulosa y manitol se analizaron en suero con EDTA, con el uso de HPLC-MS-MS. Al agitar los tubos de muestra, que contenían 250 µl de plasma, se añadió 1000 µl de acetonitrilo. Los tubos se colocaron en agua helada durante 15 minutos y se centrifugaron. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un vial LC limpio. Las muestras se inyectaron en una columna UPLC, a una velocidad de flujo de 0,400 ml/minuto, con el uso de un gradiente de agua. La temperatura del horno de la columna fue 60°C y los volúmenes de inyección fueron de 10 µl. La bandeja de muestras del sistema cromatográfico se enfrió a aproximadamente 4°C. Se usó una columna analítica de acero inoxidable, 150 x 2,1 mm ID, BEH AMIDE, tamaño de partícula de 1,7 µm (Waters, Etten-Leur, Países Bajos) y un prefiltro, 0,2 µm. La fase móvil consistió en una mezcla de 950 ml de acetonitrilo y 50 ml de tampón amónico 10 mM pH 9 (A) y una mezcla de 950 ml de tampón amónico 10 mM pH 9 y 50 ml de acetonitrilo (B). La fase móvil se filtró y desgasificó con el uso de un colector de vacío (Millipore, Amsterdam, Países Bajos) equipado con un filtro de 0,10 µm (HVLP, Millipore, Amsterdam, Países Bajos). Se usó una MS de triple cuádruplo en modo de ion negativo, con el uso de una interfaz de electrospray con N<sub>2</sub> como gas de secado. El ion molecular protonado del manitol (m/z = 181) y el ion molecular protonado de lactulosa (m/z = 341) se fragmentaron por disociación activada por colisión con el uso de argón. Para la cuantificación, los fragmentos m/z 89 y m/z 101 se detectaron en MS2 para manitol y los fragmentos m/z 161 y m/z 101 se detectaron en MS2 para lactulosa.

#### 25 Colección de heces

Se recogieron heces por grupo de tratamiento inmediatamente después del destete (dentro de las primeras dos horas), 12, 14, 16, 20, 24 y 36 horas después del inicio de la fase de destete. Se alicuotaron las heces y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

#### 30 Análisis del contenido de *Streptococcus suis* en las heces

Se extrajo ADN con el uso del kit de mini heces QIAGEN, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen N.V., Venlo, Países Bajos). Los cebadores de *Streptococcus suis* fueron CCAAAGCTTCATGACTGAATTGC directo y CGACCACCGACACCGATG inverso. Los cebadores para las bacterias totales fueron GCAGGCCTAACACATGCAAGTC directo y CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT inverso. Los cebadores para lactobacilli fueron GCAGCAGTAGGGAATCTTCCA directo y GCATTTACCGCTACACATG inverso.

#### 40 Análisis de ácidos grasos de cadena corta (los SCFA) en las heces

45 La extracción de los SCFA se realizó pesando aproximadamente 100 mg de heces con precisión (peso húmedo) en un tubo de vidrio y disolviéndolo en 1 ml de agua desmineralizada. Se preparó una curva de concentración disolviendo 0 a 10 µmol de acetato, propionato y butirato en 1 ml de agua. Se añadió aproximadamente 200 mg de NaCl, así como 0,1 ml de HCl 6M. Se añadió 3 ml de diclorometano a cada muestra, después de lo cual las muestras se agitaron en vórtice y se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm. La capa inferior se transfirió a un nuevo tubo de vidrio, y las heces se extrajeron con otros 2 ml de diclorometano. Se agitó en vórtice, se centrifugó y la capa inferior se añadió a la capa orgánica previa. Después de eso, las heces se extrajeron con 1 ml de hexano, se agitaron con vortex y se centrifugaron y la capa superior se añadió al diclorometano. La capa orgánica combinada se reextrajo con 1 ml y 0,5 ml respectivamente de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M. Las heces se enriquecieron con acetato, propionato y butirato antes y después de la primera extracción con disolventes orgánicos, y después de la segunda extracción con NaHCO<sub>3</sub> para estimar las eficiencias de la extracción.

#### Análisis histológico

55 36 horas después del inicio del experimento, los cerdos se sacrificaron por inyección i.v. de 5 ml de Euthesate (Dopharma, Raamsdonksveer, Países Bajos) en la vena cava craneal. El intestino delgado se removió inmediatamente después del sacrificio de los animales. Tres especímenes se extirparon, i. a 10 cm después del píloro del estómago (duodeno), ii. a 50 cm después del píloro del estómago (yeyuno proximal) y iii. a 2,75 m después del píloro del estómago (yeyuno medio). Estas muestras completas de pared intestinal de ~3 cm cada una se enjuagaron en PBS y se doblaron varias veces para permitir un examen microscópico completo. Después de eso, el material se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior. Se cortaron secciones de 10 µm a 3 - 4 secciones por muestra y esas secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) de acuerdo con los protocolos estándar. Se tomaron fotomicrografías con un microscopio Olympus BX60, con una cámara Leica 425C con software LAS (Leica). El análisis de la longitud de las vellosidades se realizó en 20 vellosidades seleccionadas al azar por muestra. Se usó un analizador de imágenes basado en un microscopio computarizado (Imagen J) para determinar la longitud de las

vellosidades. Se realizaron análisis en la Universidad de Utrecht, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Bioquímica y Biología Celular, Centro de Imágenes Celulares (CCI).

#### Peso corporal

5

El peso de los animales de estudio se evaluó el día 1 y 3, y después diariamente, a partir del día 19 hasta la transferencia a la unidad experimental y después el día 26 y 27.

#### Análisis estadístico:

10

Los análisis estadísticos se realizaron con el uso de SYSTAC para WINDOWS, versión 13.00.05 y GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias entre las medias se analizaron con el uso de ANOVA de una vía con prueba posterior de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . Los valores de los datos clínicos que tuvieron una desviación del promedio  $\geq 2,00$  x coeficiente de variación se consideraron valores atípicos y se excluyeron del análisis. La prueba omnibus de normalidad D'Agostino y Pearson se realizó para evaluar la distribución normal de los datos.

15

#### Resultados

20

#### Efectos de DON y suplementos en TEER y la producción de IL-8 *in vitro*

La citotoxicidad directa de DON se determinó previamente por Akbari y otros. (The FASEB Journal 204; 28, 2414-2429), quienes mostraron que DON no fue citotóxico a una concentración de 4,2  $\mu$ M. Confirmamos esos resultados en células IPEC-J2 con el uso del ensayo MTT (datos no mostrados). Como se demostró por Akbari y otros, DON redujo TEER a una concentración de 4,2  $\mu$ M durante 24 horas por  $\sim 80\%$ . En nuestro modelo, TEER se redujo por DON en solo 15% en comparación con el control. Sin embargo, la preincubación con suplementos digeridos aumentó TEER en un 140 - 163% en comparación con el control después de la incubación con DON (figura 1B). Después de un aumento en TEER por el Y-D-Fix digerido y Ennovy, esa composición disminuyó significativamente la excreción de IL8 inducida por DON (figura 1A). Después de 24 h de incubación, se indujo IL8 mediante DON 4,2  $\mu$ M seis veces, de 17,3 pg/ml a 121,7 pg/ml. Este aumento se redujo mediante el Y-D-Fix digerido a 55,0 pg/ml como se muestra en la figura 1A.

25

30

#### Efectos de Y-D-Fix y Ennovy sobre el crecimiento de los cerditos *in vivo*

Como se indica en la sección de materiales y métodos, el crecimiento de los cerditos se estimó diariamente durante los cinco días consecutivos antes del destete concomitantemente con la administración de las composiciones o el control con agua. Los resultados del aumento de peso diario promedio (ADWG) en el grupo total y en el tercil mínimo se muestran en la figura 2. En todos los cerditos, el ADWG del grupo suplementado con Y-D-Fix fue en promedio ( $\pm$  SEM) 270 g  $\pm$  8 g, mientras que el ADWG de los cerditos tratados con Ennovy fue de 550  $\pm$  8 g. El ADWG de los cerditos suplementados con agua fue de 550  $\pm$  8 g. En el tercil mínimo, el ADWG del grupo con agua fue en promedio ( $\pm$  SEM) 198 g  $\pm$  8 g, grupo Y-D-Fix 285 g  $\pm$  22 g, grupo Ennovy 231 g  $\pm$  13 g. El ADWG se aumentó significativamente en el grupo tratado con Y-D-Fix, pero este efecto fue mayor en el tercil mínimo de cerditos al inicio de la suplementación el día 21.

35

40

#### Efecto sobre la permeabilidad intestinal según lo determinado por la adición de lactulosa-manitol

45

La lactulosa y el manitol son ambos azúcares que no son propensos a la digestión por el sistema metabólico. Esos azúcares se usan comúnmente como modelo para la función intestinal y la permeabilidad normal. Se considera que el manitol se toma de los intestinos con el uso de un sistema de transporte pasivo. La lactulosa no puede pasar el revestimiento intestinal y solo en los intestinos comprometidos, se espera que aumente la concentración de lactulosa en el plasma. Por lo tanto, la relación de lactulosa con manitol se considera una medida adecuada para la integridad intestinal. En nuestro experimento, con el tiempo, se tomaron muestras de sangre, lo que nos permite determinar las áreas bajo curva (AUC) para lactulosa y manitol. Las relaciones de AUC corregidas para el peso corporal se muestran en la figura 3. La relación de AUC del grupo suplementado con Y-D-Fix no fue significativamente más alta que el grupo tratado con agua y no fue significativamente menor que el grupo de Ennovy. El grupo Ennovy tuvo una relación AUC significativamente más alta que el grupo con agua.

50

55

#### Efectos de Y-D-Fix y Ennovy sobre la producción de fosfatasa alcalina e IL8 *in vivo*

Justo antes del destete, las cantidades de fosfatasa alcalina e IL8 se determinaron en el plasma como se indica en la sección Materiales y Métodos. La actividad de la fosfatasa alcalina en el grupo Y-D-Fix (D) fue significativamente menor que en el grupo con agua. La actividad APPhos del grupo con agua (C) fue en promedio ( $\pm$  SEM) 170  $\pm$  13 U/l, del grupo Y-D-Fix 137  $\pm$  7 U/l y del grupo Ennovy (E) 150  $\pm$  7 U/l. No hubo diferencias significativas entre Ennovy y el grupo con agua, ni entre Y-D-Fix y el grupo de Ennovy. Aunque menor en el grupo Y-D-Fix en comparación con el grupo control con agua, la actividad promedio de APPhos en plasma estuvo en los tres grupos dentro del intervalo fisiológico normal (figura 4). Sin embargo, en el grupo control con agua, el 45% de los animales tuvieron valores de actividad de aPhos que estaban por encima del límite fisiológico máximo de 176 U/l. En el grupo Y-D-Fix esto ocurrió en el 9% de los

60

65

animales y en el grupo Ennovy en el 29% de los animales. La actividad promedio de aPhos por encima de 176 U/ml fue de  $47 \pm 38$ ,  $16 \pm 1$  y  $17 \pm 14$  U/ml respectivamente para el control con agua, Y-D-Fix y Ennovy, como se indicó en la Tabla 2. Los niveles de IL8 fueron significativamente menores en el grupo tratado con Y-D-Fix que en el grupo con agua. El Y-D-Fix indujo una reducción en los niveles plasmáticos de IL8 del 15% en comparación con el control con agua de 67,3 a 57,3 pg/ml. Ennovy redujo los niveles plasmáticos de IL8 con un 9% no significativamente de 67,3 a 61,3 pg/ml.

Tabla 2. Porcentaje de animales con aumento de actividad de fosfatasa alcalina

	C	D	E
Porcentaje de animales por encima de 176 UI/ (%)	45	9	29
Cantidad promedio por encima de 176 UI/ (U/I)	47	16	17
Desviación estándar (U/I)	38	1	14

#### Ácido graso de cadena corta en las heces

El intestino grueso contiene la comunidad microbiana más densa y metabólicamente activa en adultos sanos, con más de  $10^{11}$  células/g de materia fecal. Se producen grandes variaciones interindividuales, sin embargo, los estudios en humanos han demostrado que la composición de la dieta tiene un efecto importante sobre la microbiota intestinal, y esas influencias son detectables tan pronto como unos pocos días después de cambiar de dieta controlada. Los componentes dietéticos no digeridos, tales como los carbohidratos no digeribles, que llegan al intestino grueso y a los productos huésped, principalmente mucina, se fermentan por la comunidad microbiana anaeróbica para producir principalmente gases y los tres ácidos grasos de cadena corta (los SCFA) acetato, propionato y butirato. Los SCFA se absorben rápidamente desde la luz intestinal. El butirato se usa preferentemente después como fuente de energía por las células epiteliales del intestino, a diferencia del propionato y el acetato, que se metabolizan en el hígado y alcanzan una concentración relativamente alta en el bloqueo periférico. El butirato y el propionato intracelulares disminuyen la inflamación a través de múltiples vías, disminuyendo la IL6 e IL12 en los macrófagos colónicos y la inducción de FOXP3 en las células T reguladoras (Louis y otros, 2014). Por lo tanto, se analizaron los SCFA en las heces de los cerditos tratados. Dado que fue imposible recolectar las heces de todos los cerditos por separado, el análisis de las heces SCFA se realizó por grupo (figura 5).

#### Contenido de *Streptococcus suis* en las heces

Kabara y otros demostraron que el ácido láurico y el ácido palmítico se encontraban entre los ácidos grasos libres más activos de los ácidos grasos libres de cadena media y larga presentes en la naturaleza contra los estreptococos (Kabara y otros, 1972. Antimicrobial agents and chemotherapy 2(1):23-28). Además, como se indicó anteriormente, la dieta tiene una gran influencia en la composición microbiana en el intestino y esto podría tener una influencia en la cantidad de patógenos. Dado que la diarrea del destete se causa principalmente por el aumento del número y por lo tanto de *Streptococcus suis* virulento en el intestino, se estimó la cantidad de este patógeno específico y se estableció la cantidad relativa de bacterias totales y del grupo control con agua (figura 6). La cantidad relativa de *Streptococcus suis* en heces de los cerditos fue 2 veces menor en el grupo Y-D-Fix, antes y después del destete, y 2,4 - 4,4 veces menor en el grupo Ennovy, antes y después del destete, respectivamente. Las cantidades de bacterias totales no se modificaron entre los grupos, pero la cantidad de lactobacilos se redujo (datos no mostrados).

#### Análisis histológico de intestinos

Después del nacimiento, la longitud de las vellosidades se aumenta por la tensión cizallante de la sangre distribuida en la mucosa intestinal. El aumento de la longitud de las vellosidades aumenta el área de la superficie intestinal y, por lo tanto, la capacidad de absorción de nutrientes. Sin embargo, el destete por lo general resulta en una reducción de la longitud de las vellosidades, que podría causarse por la ingesta reducida de alimento en la primera semana después del destete. El inicio de la fase de destete con aumento de la longitud de las vellosidades es, por lo tanto, beneficioso para que los cerditos superen los cambios fisiológicos. La administración de Y-D-Fix aumentó la longitud de las vellosidades en el yeyuno medio con 19% ( $p = 0,0002$ ), mientras que Ennovy aumentó la longitud de las vellosidades del yeyuno medio con 15% ( $p = 0,028$ ). El aumento de la longitud de las vellosidades en 11% por Y-D-Fix no fue significativo en el yeyuno proximal ( $p = 0,070$ ), como lo fue el aumento del 8% por Ennovy ( $p = 0,192$ ). El aumento en el duodeno fue 8% para Y-D-Fix, sin embargo, esto no fue significativo ( $p = 0,169$ ) y 13% para Ennovy ( $p = 0,014$ ) (figura 7 y 8). El efecto más profundo sobre la longitud de las vellosidades se mostró en el yeyuno medio mediante Y-D-Fix, y Y-D-Fix aumentó la longitud de las vellosidades en las tres localizaciones examinadas. Ennovy aumentó la longitud de las vellosidades además en las tres ubicaciones examinadas, aunque no tanto como el aumento del 19% logrado por Y-D-Fix. La mayoría de los reportes que elaboran sobre la longitud de las vellosidades, reportan las diferencias en el yeyuno medio y, por lo tanto, esta parte específica podría considerarse la más importante. Y-D-Fix, Ennovy y control con agua no tuvieron efecto en el índice de lavado. La incidencia de diarrea fue muy baja y las heces de todos los grupos fueron difíciles.



Listado de Secuencias

<110> Dopharma Research B.V.

5 <120> Producto alimenticio para sujetos jóvenes

<130> P106506EP00

10 <140> EP 15155044.9  
<141> 2015-02-13

<160> 6

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> cebador

25 <400> 1  
ccaaagcttc atgactgaat tgc 23

<210> 2

30 <211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

35 <400> 2  
cgaccaccga caccgatg 18

40 <210> 3  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cebador

<400> 3  
gcaggcctaa cacatgcaag tc 22

50 <210> 4  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> cebador

<400> 4  
ctgctgcctc ccgtaggagt 20

60 <210> 5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>

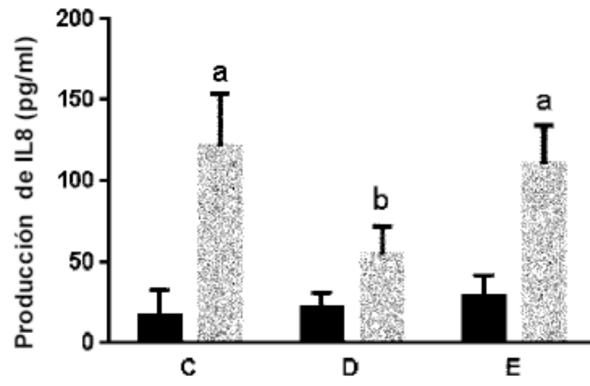
# ES 2 662 606 T3

<223> cebador  
<400> 5  
gcagcagtag ggaatcttc a 21  
5  
<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10  
<220>  
<223> cebador  
<400> 6  
15 gcatttcacc gctacacatg 20

Reivindicaciones

- 5 1. Un producto alimenticio que comprende grasa, proteína y carbohidrato, en donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1, el producto comprende además ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol, en donde el ácido láurico está presente en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, el ácido palmitoleico está presente en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y el colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales.
- 10 2. El producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 1, que es un suplemento alimenticio.
3. El producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la relación de proteína:carbohidratos está entre 5:1 y 1:5, preferentemente entre 4:1 y 1:2.
- 15 4. El producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende triglicéridos de cadena media (MCT) que tienen una longitud de cadena C8, C10 o C12 y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), en donde dichos MCT están presentes en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales y dichos MUFA están presentes en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales.
- 20 5. El producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende aceite de espinocervical de mar como fuente de dicho ácido palmitoleico y aceite de coco como fuente de dicho ácido láurico.
6. Un producto alimenticio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar en un método para estimular el crecimiento de un sujeto.
- 25 7. Un producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método para prevenir enfermedades en un sujeto.
8. Un producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método para mantener o mejorar la salud intestinal de un sujeto.
- 30 9. El producto alimenticio para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde dicho producto alimenticio se administra al menos antes del destete de dicho sujeto.
- 35 10. El producto alimenticio para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde dicho producto alimenticio se administra a dicho sujeto diariamente desde al menos un día antes de destetar dicho sujeto hasta el día de destete de dicho sujeto.
- 40 11. El producto alimenticio para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho producto alimenticio se administra a dicho sujeto desde al menos tres días antes de destetar dicho sujeto hasta el día de destete de dicho sujeto.
- 45 12. El producto alimenticio para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en donde dicho ácido láurico se administra en una dosis diaria de 2-12 g, dicho ácido palmitoleico se administra en una dosis diaria de 20-250 mg y dicho colesterol se administra en una dosis diaria de 0,03-0,5 g.
- 50 13. Una composición que comprende grasa, proteína y carbohidrato, en donde la relación de grasa:proteína está entre 2:1 y 32:1, la composición que comprende además ácido láurico, ácido palmitoleico y colesterol, en donde el ácido láurico está presente en una cantidad de 15-80 % en peso de sólidos totales, ácido palmitoleico está presente en una cantidad de 0,1-1,5 % en peso de sólidos totales y el colesterol está presente en una cantidad de 0,2-3,5 % en peso de sólidos totales, para su uso en un método para estimular el crecimiento de un sujeto, prevenir la enfermedad en un sujeto y/o mantener o mejorar la salud intestinal de un sujeto.
- 55 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde se estimula el crecimiento después del destete, se previene la enfermedad después del destete y/o se mantiene o mejora la salud intestinal después del destete.

A



B

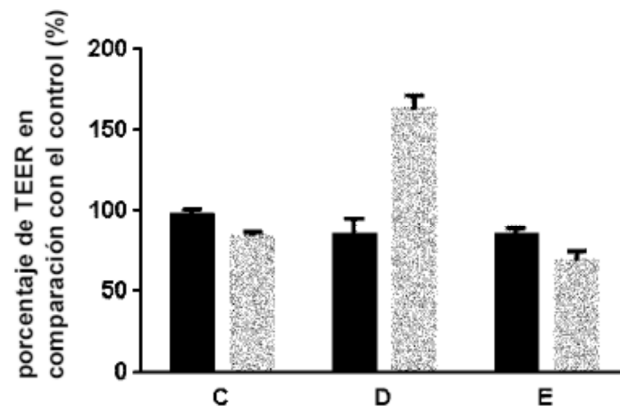


Figura 1

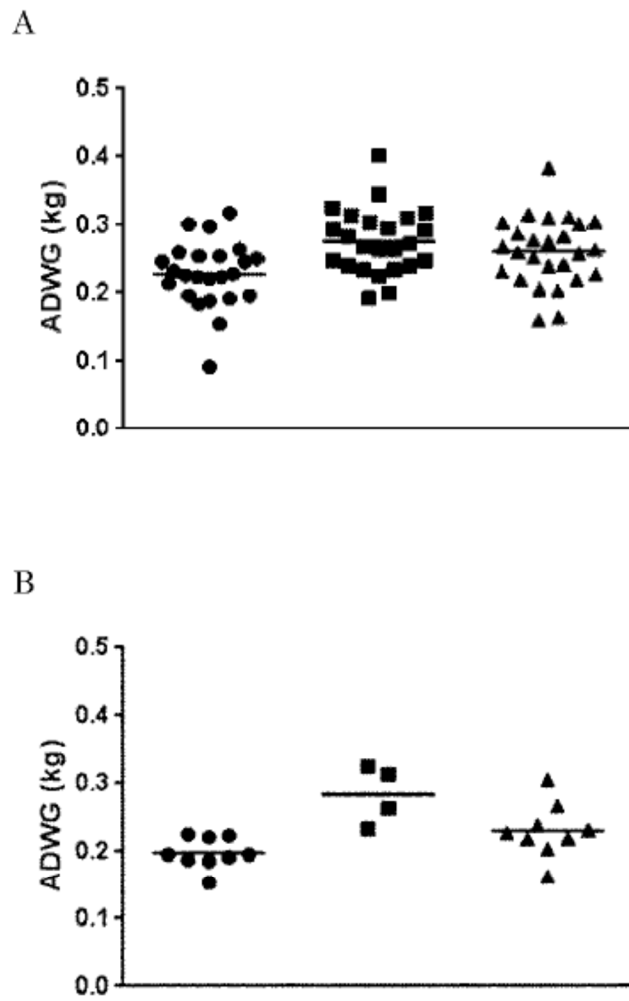


Figura 2

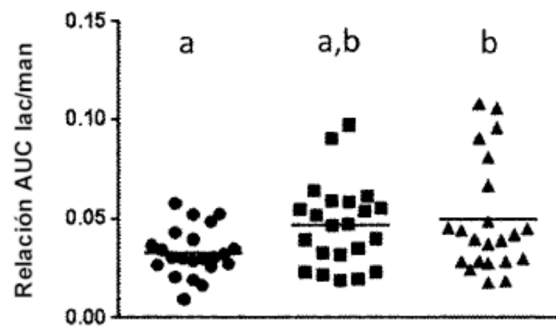
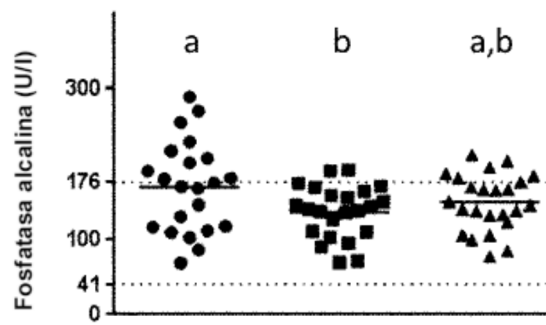


Figura 3

A



B

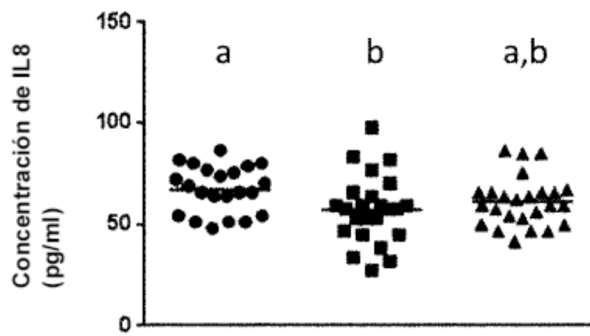


Figura 4

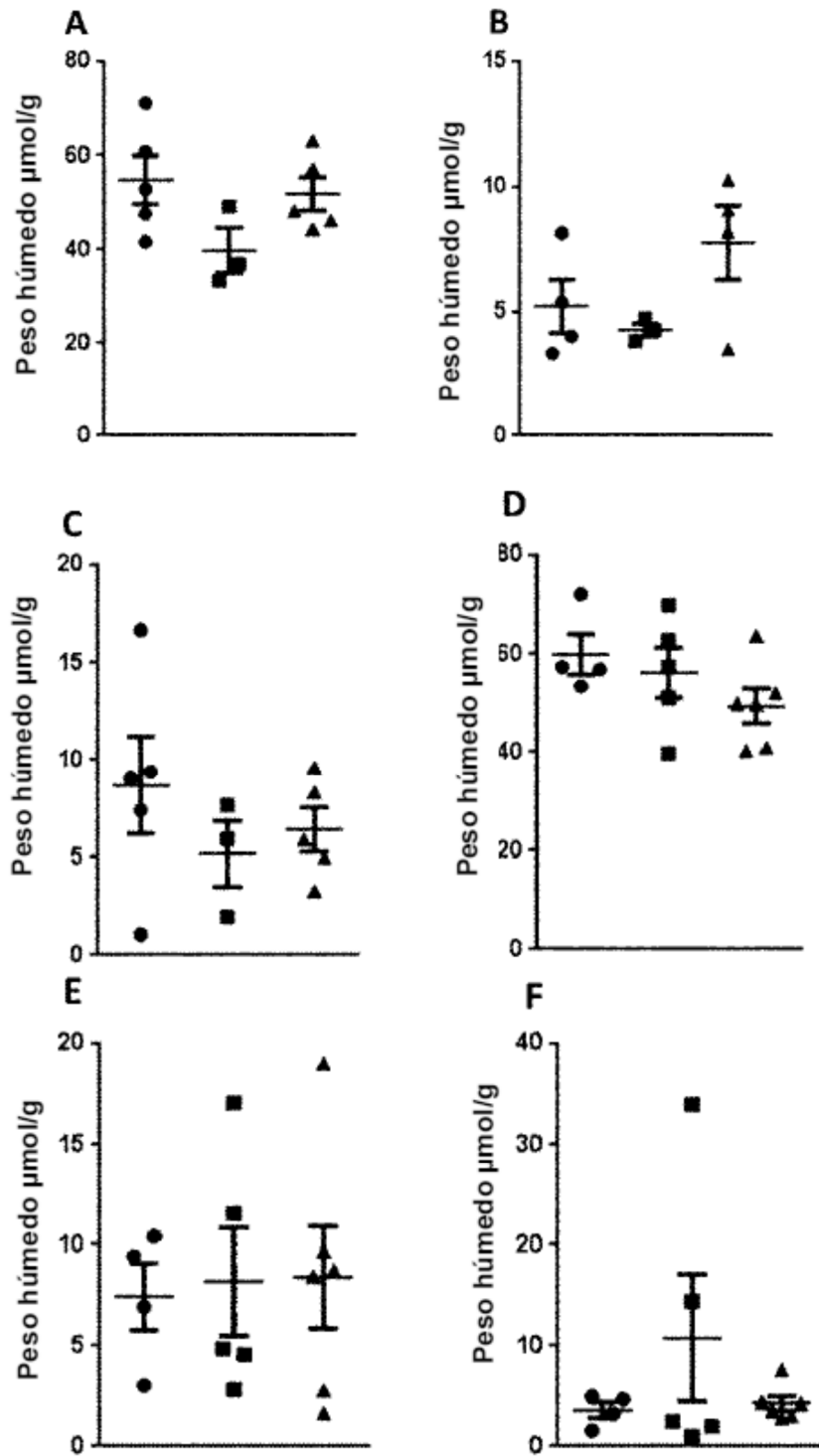


Figura 5

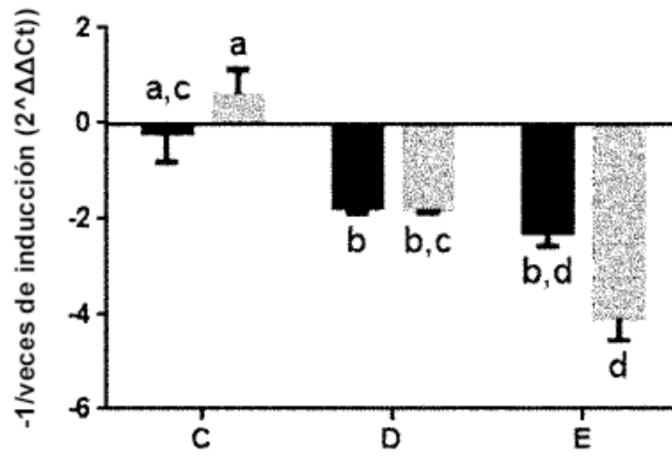


Figura 6

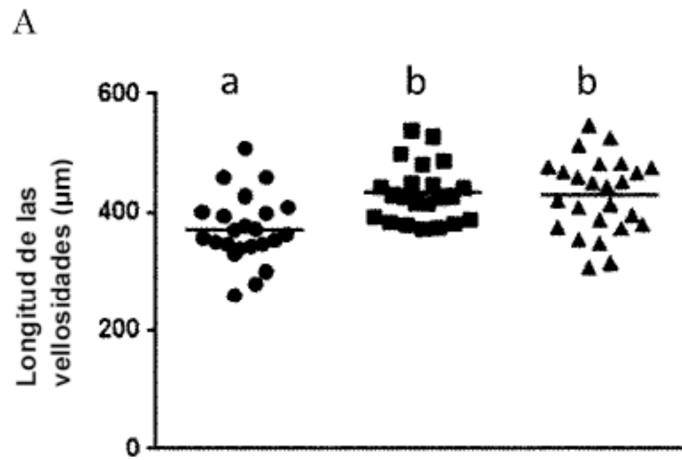


Figura 7



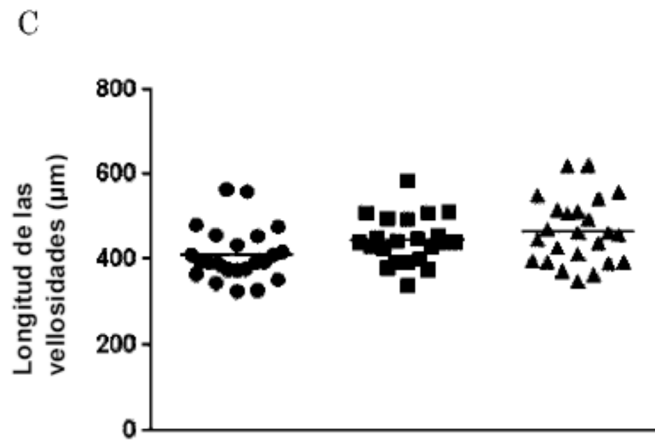
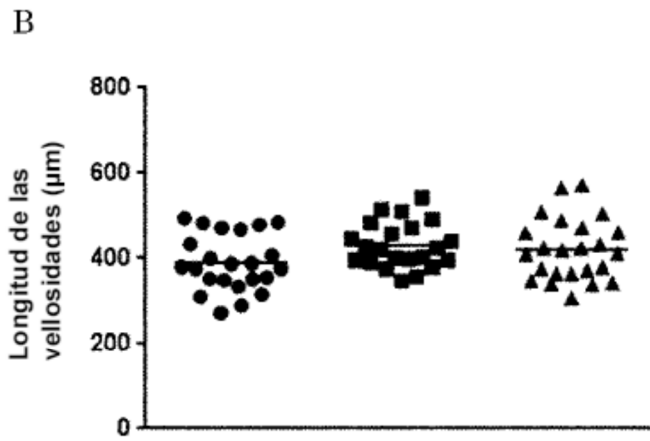


Figura 7 continuación

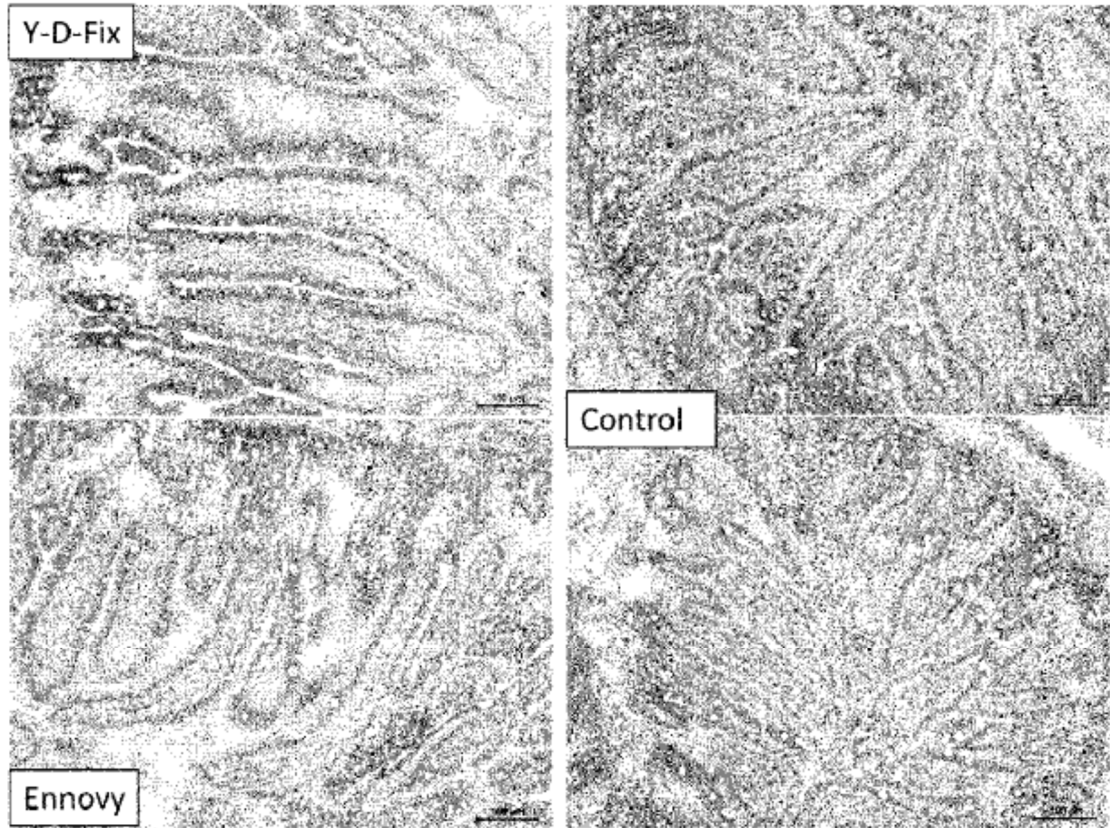


Figura 8