

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 195**

51 Int. Cl.:

A23L 33/00 (2006.01)

A23L 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2009 PCT/EP2009/067297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10081604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009 E 09796696 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2387331**

54 Título: **Composición nutricional infantil**

30 Prioridad:

19.01.2009 EP 09150858

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

11.04.2018

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)

Avenue Nestlé 55

1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

MACE, CATHERINE;

APRIKIAN, OLIVIER KEVORK y

POUTEAU, ETIENNE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 663 195 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición nutricional infantil

- 5 La presente invención se refiere a la utilización de ácido linoleico y ácido α -linoleico en la preparación de una composición nutricional, más específicamente a una composición nutricional infantil que puede ayudar a reducir el riesgo de desarrollo de la obesidad posteriormente en la vida.
- 10 La leche materna es la recomendada para todos los lactantes. Sin embargo, en algunos casos la lactancia materna resulta inadecuada, infructuosa o no recomendable por motivos médicos o la madre elige no amamantar en absoluto o durante un periodo de no más de unas cuantas semanas. Se han desarrollado preparados para lactantes para dichas situaciones.
- 15 La prevalencia de la obesidad y del sobrepeso en adultos, niños y adolescentes se ha incrementado rápidamente durante los últimos 30 años en los Estados Unidos y a nivel mundial, y continúa incrementándose. El sobrepeso y obesidad infantiles actualmente afectan a 18 millones de niños de menos de 5 años en todo el mundo. Prácticamente el 30% de los niños y adolescentes estadounidenses y entre 10% y 30% de los niños europeos presentan sobrepeso u obesidad.
- 20 Crecientemente se cree que los primeros 6 meses de vida representan uno de los periodos postnatales más importantes para el desarrollo de masa adiposa en el ser humano y en consecuencia podría ser una ventana crítica para la programación de un exceso de adiposidad posteriormente en la vida. Además, los datos epidemiológicos humanos y los estudios animales ponen de manifiesto que un peso corporal elevado en el nacimiento o durante la infancia se asocian a un riesgo de desarrollo de enfermedades tales como el síndrome metabólico, la diabetes de tipo 2 y problemas cardiovasculares posteriormente en la vida.
- 25 Korotkova *et al.* han investigado la influencia de la proporción de ácido linoleico (LA) a ácido α -linolénico (ALA) en la dieta materna sobre los niveles séricos de leptina en crías lactantes y han encontrado que la alimentación de madres con una dieta rica en ALA (proporción LA/ALA de 0,42) reduce los niveles séricos de leptina en las crías lactantes en comparación con las crías de madres alimentadas con una dieta que contenía tanto LA como ALA (proporción LA/ALA de 9,0). Los niveles medios de leptina en suero de un tercer grupo de crías de madres que habían sido alimentadas con una dieta rica en LA (proporción de LA/ALA de 216) se encontraban entre los niveles de los otros dos grupos aunque no eran significativamente diferentes a ninguno de los dos. Los autores escogieron estudiar los niveles séricos de leptina en las crías ya que varios estudios anteriores ya sugerían que los niveles circulantes de leptina durante el periodo perinatal podrían ser importantes para el desarrollo normal y la salud. Basándose en sus resultados, predijeron que podría ser que el equilibrio entre LA y ALA en la dieta materna y no la cantidad de LA o de ALA *per se* fuese el factor importante para el incremento del tejido adiposo (Korotkova *et al.*, Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to α -linolenic acid in the maternal diet, *Journal of Lipid Research* 43:1743-1749, 2002).
- 30
- 35
- 40 En el documento n° WO2008/054192 se reivindica que la masa total de tejido adiposo del niño no es un buen factor predictivo para determinar los riesgos de enfermedades posteriores en la vida y que, por el contrario, debería considerarse la acumulación de masa adiposa visceral durante la primera infancia. Se ha demostrado que el recuento de adipocitos viscerales se determina principalmente durante la infancia y los inventores del documento n°
- 45 WO2008/054192 creen que resultaría útil poder controlar la adipogénesis visceral durante este periodo. La solución propuesta en el documento n° WO2008/054192 es reducir la cantidad de LA alimentada a los niños de manera que la proporción LA/ALA sea de entre 2 y 6, garantizando simultáneamente que las cantidades de LA sean inferiores a 14,5% en peso de los ácidos grasos totales.
- 50 Sin embargo, este enfoque puede presentar limitaciones prácticas con respecto a la nutrición de niños humanos, ya que tanto LA como ALA son ácidos grasos esenciales, es decir, ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo. Massiera, Florence *et al.* plantean la cuestión del elevado contenido de ácido linoleico de la leche de fórmula y de los alimentos infantiles en relación a la epidemia de obesidad infantil (Massiera, Florence *et al.*, "Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: A human health concern?", *Journal of Lipid Research* 44(2):271-279, febrero de 2003 (2003-02), XP002528921, ISSN: 0022-2275).
- 55 El documento n° WO2007/004878A da a conocer nutrición infantil que comprende proteínas hidrolizadas para la utilización en un método de tratamiento y/o prevención de la obesidad infantil.
- 60 Por lo tanto, existe claramente una necesidad de enfoques nutricionales alternativos destinados a reducir la acumulación de masa adiposa durante la infancia y, de esta manera, a reducir el riesgo de desarrollar obesidad posteriormente en la vida, así como el riesgo de desarrollar enfermedades asociadas a dicha obesidad.

Descripción resumida de la invención

Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que la alimentación de una composición relativamente rica en ácido α -linolénico durante la infancia reduce la acumulación de masa adiposa total posteriormente en la vida.

La presente invención se refiere a la utilización de ácido linoleico y ácido α -linolénico en la preparación de una composición nutricional para la reducción del riesgo de desarrollo de obesidad posteriormente en la vida, al administrarlo a un bebé en los primeros seis meses de vida del bebé, en la que la composición incluye 18% a 25% en peso de ácido linoleico y 6% a 11% de ácido α -linolénico expresado como porcentaje del contenido de ácidos grasos totales de la composición en cada caso y en cantidades tales que la proporción de ácido linoleico:ácido α -linolénico se encuentre comprendida en el intervalo de entre 1 y 10.

Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores creen, basándose en sus observaciones experimentales, que una dieta rica en ácido α -linolénico durante la infancia podría de algún modo reducir la adipogénesis y/o el incremento de tamaño de los adipocitos y que estos efectos beneficiosos podrían persistir en la vida posterior, reduciendo de esta manera el riesgo de desarrollar obesidad posteriormente en la vida. Además, es conocido que la obesidad está asociada a un riesgo incrementado de condiciones tales como la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa, que pueden conducir al desarrollo de diabetes de tipo 2.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la evolución del peso corporal de tres grupos de crías de cobaya alimentadas con diferentes dietas durante los primeros 136 días de vida.

La figura 2 muestra la mediana de ganancia de peso corporal de las crías en los tres grupos entre los días 21 y 79.

La figura 3 muestra el número de adipocitos grandes representado como una función de la ingesta de ALA.

La figura 4 muestra la evolución de la masa adiposa en los tres grupos expresada en gramos entre los días 21 y 128.

La figura 5 muestra la evolución de la masa adiposa en los tres grupos expresada como porcentaje del peso corporal total los días 79, 107 y 128.

La figura 6 muestra los niveles medios de insulina en plasma de los tres grupos el día 136.

La figura 7 muestra el contenido de insulina pancreática de los tres grupos el día 136.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria, las expresiones siguientes presentan los significados asignados a ellas a continuación:

"ALA" se refiere a ácido α -linolénico (C18:3n-3).

El término "bebé" se refiere a un niño de menos de 12 meses e "infancia" se interpretará en consecuencia. Para el propósito del presente documento, el término "bebé" comprende crías de animales, tales como animales de compañía jóvenes, perros jóvenes, caballos jóvenes o gatos jóvenes.

"LA" se refiere a ácido linoleico (C18:2n-6).

La expresión "posteriormente en la vida" se refiere, en el contexto de un bebé, a cualquier punto en la vida tras haber completado la infancia. Un ejemplo de dicho punto sería la edad a la que se produce la adiposidad de rebote, que, en bebés humanos, se produce típicamente entre las edades de cinco y seis años.

Todos los porcentajes y proporciones son en peso, a menos que se indique lo contrario. La composición nutricional comprende entre 18% y 25% de LA de los ácidos grasos totales. El contenido de ALA es de entre 6% y 11% en peso de los ácidos grasos totales. La proporción LA:ALA preferentemente se encuentra comprendida entre 2 y 6.

Preferentemente, la composición nutricional presenta un contenido de proteínas inferior a 1,85 g/100 kcal. La constitución detallada de la fuente de proteínas no se cree que sea crucial para la presente invención si se satisfacen los requisitos mínimos de contenido de aminoácidos esenciales y se garantiza un crecimiento satisfactorio. De esta manera, las fuentes de proteínas basadas en proteínas lácteas de la vaca, tales como el suero, la caseína y las mezclas de los mismos pueden utilizarse también como fuentes de proteínas basadas en la soja. Sin embargo, las mezclas de proteínas de suero y caseína resultan preferentes. La proporción de caseína:suero puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre 70:30 y 30:70, aunque preferentemente es de 30:70.

La proteína o proteínas en la fuente de proteínas pueden encontrarse intactas o parcialmente hidrolizadas o puede utilizarse una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. La fuente de proteínas adicionalmente puede complementarse con aminoácidos libres en caso de que ello resulte necesario para satisfacer los requisitos mínimos de contenido de aminoácidos esenciales. Estos resultados se publican en, por ejemplo, la Directiva de la CE nº 2006/141/EC.

Tal como se ha indicado anteriormente, la fuente de proteínas preferente es una mezcla de las proteínas caseína y suero. La proteína del suero puede ser un aislado de proteínas de suero, suero ácido, suero dulce o suero dulce del que se ha eliminado el glucomacropéptido de caseína (suero dulce modificado). Preferentemente, sin embargo, la proteína del suero es suero dulce modificado. El suero dulce es un producto secundario fácilmente disponible de la fabricación del queso y frecuentemente se utiliza en la preparación de composiciones nutricionales basadas en la leche de vaca. Sin embargo, el suero dulce incluye un componente que es indeseablemente rico en treonina y pobre en triptófano denominado glucomacropéptido de caseína (CGMP, por sus siglas en inglés). La eliminación del CGMP del suero dulce resulta en una proteína con un contenido de treonina más próximo al de la leche humana. Se describe un procedimiento para eliminar el CGMP del suero dulce en la patente nº EP 880902.

En el caso de que se utilice suero dulce modificado como la proteína del suero en una mezcla de 70% suero y 30% caseína, la fuente de proteínas puede complementarse con histidina libre en una cantidad de entre 0,1% y 0,3% del contenido de proteínas totales.

La composición nutricional contiene una fuente de carbohidratos. La fuente preferente de carbohidratos es la lactosa, aunque también pueden añadirse otros carbohidratos, tales como sacarosa, maltodextrina y almidón. Preferentemente, el contenido de carbohidrato de la composición nutricional es de entre 9 y 14 g/100 kcal.

La composición nutricional contiene una fuente de lípidos. Además de LA y ALA, la fuente de lípidos puede incluir cualquier lípido o grasa que resulte adecuado para la utilización en composiciones nutricionales para la alimentación infantil. Entre las fuentes de lípidos preferentes se incluyen el aceite de coco, el aceite de colza pobre en ácido erúxico (aceite de canola), la lecitina de soja, la oleína de palma y el aceite de girasol. La fuente de lípidos puede incluir además cantidades pequeñas de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga preformados siguientes: ácido araquidónico (C20:4n-6) y ácido docosahexanoico (C22:6n-3). Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácido docosahexanoico, alternativamente los aceites microbianos unicelulares son fuentes adecuadas tanto de ácido araquidónico como de ácido docosahexanoico. En total, el contenido de lípidos puede ser de entre 4,4 y 6 g/100 kcal. La proporción de ácido araquidónico:ácido docosahexanoico en la fuente de lípidos preferentemente es de entre 2:1 y 1:1.

La composición nutricional puede contener además todas las vitaminas y minerales que se entiende que resultan esenciales en la dieta diaria en cantidades nutricionalmente significativas. Los requisitos mínimos han sido establecidos para determinadas vitaminas y minerales. Entre los ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes presentes opcionalmente en la composición nutricional se incluyen vitamina A, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, vitamina B₁₂, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, cinc, manganeso, cloro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Los minerales habitualmente se añaden en forma de sal.

En caso necesario, la composición nutricional puede contener emulsionantes y estabilizadores, tales como lecitina de soja, ésteres de ácido cítrico de mono- y di-glicéridos y similares. Lo anterior resulta especialmente cierto en el caso de que la composición se proporcione en forma líquida.

La composición nutricional puede contener opcionalmente otras sustancias que pueden presentar un efecto beneficioso, tal como bacterias probióticas, fibras, lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos y similares en cantidades habitualmente presentes en composiciones nutricionales para la alimentación infantil.

La composición nutricional puede prepararse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, puede prepararse una composición nutricional mediante la mezcla de la fuente de proteínas, la fuente de carbohidratos y la fuente de lípidos en proporciones adecuadas. En caso de utilizarse, pueden incluirse emulsionantes en la mezcla en esta etapa. En este punto pueden añadirse las vitaminas y minerales aunque habitualmente se añaden posteriormente para evitar la degradación térmica. Pueden disolverse vitaminas lipofílicas, emulsionantes y similares en la fuente de grasas antes de la mezcla. A continuación, puede mezclarse agua, preferentemente agua que ha sido sometida a ósmosis inversa, para formar una mezcla líquida.

Seguidamente la mezcla líquida puede tratarse térmicamente para reducir las cargas bacterianas. Por ejemplo, la mezcla líquida puede calentarse rápidamente hasta una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 80°C y aproximadamente 110°C durante aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante inyección de vapor o mediante un intercambiador de calor, por ejemplo, un intercambiador de calor de placas.

A continuación, la mezcla líquida puede enfriarse hasta una temperatura de entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 85°C, por ejemplo mediante enfriamiento ultrarrápido. Seguidamente la mezcla líquida puede homogeneizarse, por ejemplo en dos etapas a una presión de entre aproximadamente 7 MPa y aproximadamente 40 MPa en la primera etapa y entre aproximadamente 2 MPa y aproximadamente 14 MPa en la segunda etapa. A continuación, la mezcla homogeneizada puede enfriarse adicionalmente y añadirse cualesquiera componentes sensibles al calor, tales como vitaminas y minerales. El pH y contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada se estandariza convenientemente en este punto.

Si se desea producir una composición en polvo, la mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado adecuado, tal como un secador por pulverización o un secador por congelación y convertirse en polvos. Los polvos deben presentar un contenido de humedad inferior a aproximadamente 5% en peso.

- 5 En el caso de que se desee producir una composición líquida, la mezcla homogeneizada se utiliza para rellenar recipientes adecuados, preferentemente de manera aséptica. Sin embargo, la composición líquida también puede esterilizarse en el recipiente. Un aparato adecuado para llevar a cabo un rellenado de esta naturaleza se encuentra disponible comercialmente. La composición líquida puede encontrarse en forma de una composición lista para la utilización con un contenido de sólidos de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 14% en peso o puede encontrarse en forma de un concentrado, habitualmente con un contenido de sólidos de entre aproximadamente 20% y aproximadamente 26% en peso. A continuación se ilustra la invención haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

15

A continuación se proporciona un ejemplo de composición de una composición nutricional:

Nutriente	por cada 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	630
Proteína (g) (leche desnatada en polvo, suero dulce modificado)	1,5	9,45
histidina libre (mg)	2,5	15,8
proporción caseína: suero	40:60	40:60
Grasas (g)	5,3	33,4
Ácido linoleico (g)	1,0	6,6
Ácido α -linolénico (g)	0,5	3,3
DHA (mg)	11,5	72,5
ARA (mg)	11,5	72,5
Ácido linoleico: ácido α -linolénico	2	2
Lactosa (g)	11,6	73,1
Minerales y electrolitos		
Na (mg)	25	158
K (mg)	89	561
Cl (mg)	64	403
Ca (mg)	64	403
P (mg)	32	202
Ca/P	2,0	2,0
Mg (mg)	6,9	43,5
Mn (μ g)	8,0	50,4
Vitaminas y elementos traza		
Vitamina A (UI)	350	2205
Vitamina D (UI)	60	378
Vitamina E (IU)	1,2	7,6
Vitamina K1 (μ g)	8,0	50,4
Vitamina C (mg)	10	63
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,44
Vitamina B2 (mg)	0,15	0,95
Niacina (mg)	1,0	6,3
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,47
Ácido fólico (μ g)	12	75,6
Ácido pantoténico (mg)	0,45	2,83
Vitamina B 12 (μ g)	0,3	1,89
Biotina (μ g)	2,2	13,9
Colina (mg)	10	63
Inositol (mg)	5,0	31,5
Taurina (mg)	7,0	44,1
Carnitina (mg)	1,6	10,1
Fe (mg)	1,2	7,56
I (μ g)	15	94,5
Cu (mg)	0,07	0,44
Se (μ g)	2,0	12,6
Zn (mg)	0,75	4,72

Nucleótidos		
CMP (mg)	2,3	14,5
UMP (mg)	1,5	9,5
AMP (mg)	0,7	4,4
GMP (mg)	0,3	1,9

Puede utilizarse una composición nutricional según la invención para alimentar un bebé como única fuente de nutrición desde el nacimiento hasta una edad de entre cuatro y seis meses y posteriormente como parte de una dieta mixta durante la introducción de alimentos sólidos hasta completar el destete a aproximadamente los 12 meses de edad.

Ejemplo 2

El presente ejemplo investiga el efecto de proporcionar una alimentación con dietas que contienen diferentes cantidades de LA y ALA a crías neonatas de cobaya sobre el desarrollo de la masa adiposa total de las crías en el periodo posterior al destete. Se considera que la cría de cobaya es un buen modelo animal para el estudio predictivo del desarrollo de la masa adiposa en bebés humanos porque, al igual que el bebé neonato humano, las crías neonatas de cobaya nacen con una cantidad apreciable de grasa corporal mientras que las crías neonatas de rata son muy magras.

Diseño del estudio:

Las cobayas neonatas se dividieron en tres grupos de 20 animales cada uno. Se alimentó a cada grupo con una dieta de lactancia/destete en la que el 44% de la energía se suministraba como grasa durante 21 días. Las diferentes dietas eran isocalóricas y diferían únicamente en su contenido de ALA. La dieta de alto contenido en ALA contenía 10% de ALA respecto al total de ácidos grasos; la dieta de contenido intermedio en ALA contenía 2,4% de ALA respecto al total de ácidos grasos y la dieta de bajo contenido contenía 0,85% de ALA respecto al total de ácidos grasos. Los niveles de LA se mantuvieron relativamente constantes entre dietas, de manera que las proporciones LA: ALA eran de aproximadamente 2, 10 y 30, respectivamente. Se proporciona más información sobre la composición de ácidos grasos de las tres dietas en la Tabla 1.

Tabla 1: composición de ácidos grasos de las dietas de lactancia/destete:

% del total de ácidos grasos	10% de ALA	2,4% de ALA	0,8% de ALA
C12:0	7,1	8,2	7,9
C14:0	3,4	3,9	3,7
C16:0	22,7	22,0	21,8
C16:1	0,2	0,1	0,1
C18:0	3,0	3,2	3,0
C18:1	33,5	33,0	33,3
C18:2n-6 (LA)	20,2	26,2	28,5
C18:3n-3 (ALA)	9,9	2,4	0,8
C20:0	0,0	0,0	0,0
C20:1	0,0	0,0	0,0
C20:4n-6	0,0	0,0	0,0
C20:5n-3	0,0	0,0	0,0
C22:0	0,0	0,0	0,0
C22:5n-3	0,0	0,0	0,0
C22:6n-3	0,0	0,0	0,0
LA/ALA	2,0	10,7	33,6

Al final del periodo de lactancia/destete (día 21), todos los grupos fueron alimentados con una dieta de contenido de grasa moderadamente elevado (35% de la energía procedente de grasas) que contenía 2% de ALA y 26% de LA hasta el día 136. Se registró el peso corporal y la masa adiposa los días 21, 51, 79, 107, 128 y 136 y se registró la celularidad del tejido adiposo retroperitoneal, la composición de ácidos grasos del plasma y la insulina los días 21 y 136.

Resultados:

Tal como se esperaba, al final del periodo de lactancia/destete (día 21), las concentraciones de ALA en las fracciones de fosfolípidos (Tabla 2) y triglicéridos (Tabla 3) del plasma eran superiores en el grupo de 10% de ALA que en los otros grupos.

Tabla 2: composición de ácidos grasos (µg/ml) en los fosfolípidos plasmáticos en d21. Medias ± SEM

	Contenido elevado de ALA	Contenido intermedio de ALA	Contenido bajo de ALA
C10:0	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,07
C12:0	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,13
C14:0	0,8 ± 0,23	1,0 ± 0,10	1,1 ± 0,17
C16:0	35,9 ± 9,1	49,3 ± 8,9	40,2 ± 3,6
C17:0	1,2 ± 0,38	1,9 ± 0,41	1,2 ± 0,10
C18:0	70,1 ± 23,6	98,6 ± 28,1	68,6 ± 4,2
C18:1 n-9 cis + trans	23,4 ± 7,6	30,8 ± 7,3	23,2 ± 1,9
C18:1 n-7 cis + trans	3,1 ± 0,8	6,2 ± 1,4	5,2 ± 0,9
C18:2 n-6 (LA)	67,5 ± 22,2	99,0 ± 26,3	77,0 ± 7,5
C18:3n-6 (GLA)	0,1 ± 0,06	0,1 ± 0,09	0,2 ± 0,13
C18:3n-3 (ALA)	2,9 ± 1,8	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2
C20:0	1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,03
C20:1n-9	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,08	0,6 ± 0,1
C20:2n-6	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2
C20:3n-6	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,25	1,0 ± 0,07
C20:4n-6 (AA)	11,4 ± 3,6	14,8 ± 3,0	11,7 ± 1,1
C20:3n-3	0,3 ± 0,08	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,03
C22:0	1,9 ± 0,9	2,1 ± 0,4	1,1 ± 0,2
C22:1n-9	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,5 ± 1,0
C20:5n-3 (EPA)	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03
C22:2n-6	1,1 ± 0,5	1,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1
C22:4n-6	1,2 ± 0,5	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2
C24:0	2,6 ± 1,2	3,4 ± 0,6	1,9 ± 0,4
C24:1n-9	2,4 ± 0,8	2,8 ± 0,3	2,0 ± 0,5
C22:5n-3 (DPA)	2,1 ± 0,8	1,7 ± 0,3	0,9 ± 0,1
C22:6n-3 (DHA)	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,1

Tabla 3: composición de ácidos grasos (µg/ml) en triglicéridos plasmáticos en d21. Medias ± SEM

5

	Contenido elevado de ALA	Contenido intermedio de ALA	Contenido bajo de ALA
C10:0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,01
C12:0	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,3
C14:0	4,0 ± 1,1	4,6 ± 0,7	4,0 ± 2,4
C16:0	49,1 ± 10,7	52,8 ± 5,7	42,2 ± 18
C17:0	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,09
C18:0	15,7 ± 3,3	14,4 ± 2,3	10,5 ± 3,5
C18:1n-9 cis	85,0 ± 17,8	85,4 ± 6,0	63,2 ± 18
C18:1n-7 cis	2,6 ± 0,5	2,8 ± 0,3	2,0 ± 0,6
C18:2 n-6 (LA)	72,8 ± 13,7	85,4 ± 6,0	71,1 ± 27,9
C18:3n-6 (GLA)	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,05	0,5 ± 0,1
C18:3n-3 (ALA)	11,1 ± 2,5 ^a	5,1 ± 0,7 ^b	2,7 ± 0,2 ^b
C20:0	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C20:1n-9	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,5
C20:2n-6	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,8
C20:3n-6	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,09	0,6 ± 0,09
C20:4n-6 (AA)	3,7 ± 0,4	3,5 ± 0,3	3,7 ± 0,3
C20:3n-3	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,09
C22:0	0,4 ± 0,04	0,4 ± 0,05	0,3 ± 0,02
C22:1n-9	0,3 ± 0,08	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03
C20:5n-3 (EPA)	0,3 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,08
C22:2n-6	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,06	0,2 ± 0,08
C22:4n-6	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2
C24:0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1
C22:5n-3 (DPA)	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,01
C22:6n-3 (DHA)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,06	0,2 ± 0,05

Diferentes letras indican significancia estadística con P<0,05. ND: no detectable.

Tal como puede observarse en la figura 1, el peso corporal medio no difería significativamente en los tres grupos durante el curso del experimento. Sin embargo, la figura 2 muestra que entre los días 21 y 78, el grupo alimentado con dieta de contenido elevado en ALA tendió a ganar menos peso corporal que los demás grupos.

5 Al final del periodo de lactancia/destete (día 21), la masa adiposa total medida mediante RMN no difería entre los grupos. Sin embargo, de promedio, el diámetro de los adipocitos procedentes del tejido adiposo retroperitoneal del grupo alimentado con dieta de contenido elevado en ALA tendió a ser más pequeño que en los demás grupos (Tabla 4).

10 Tabla 4: diámetro de los adipocitos. Medias \pm SEM

Grupos	Diámetro celular (μm)
Contenido elevado de ALA	27,5 \pm 0,8
Contenido intermedio de ALA	31,1 \pm 1,5
Contenido bajo de ALA	31,9 \pm 1,7

El grupo alimentado con dieta de contenido elevado en ALA presentaba un número más bajo de adipocitos en el intervalo de diámetros más grandes (entre 30 y 50 μm) (Tabla 5).

15 Tabla 5: número total de células ($\times 10^6$) en cada intervalo de diámetros y por g de tejido adiposo retroperitoneal en d21. Medias \pm SEM

Diámetro celular	10% de ALA	2,4% de ALA	0,8% de ALA
15 a 19	1,27 \pm 0,2	1,19 \pm 0,2	0,91 \pm 0,2
19 a 29	3,82 \pm 0,6	3,70 \pm 0,5	3,68 \pm 0,8
30-39	2,18 \pm 0,4	3,54 \pm 0,2	4,43 \pm 0,8
40-49	0,37 \pm 0,1	1,47 \pm 0,2	1,85 \pm 0,7
50-60	0,07 \pm 0,02	0,34 \pm 0,04	0,49 \pm 0,3

20 Curiosamente se observó una relación de dosis-respuesta entre el número de adipocitos grandes ($>40 \mu\text{m}$) y el porcentaje de ALA en la dieta. Tal como puede observarse en la figura 3, a mayor ingesta de ALA, menor número de adipocitos grandes.

25 Inesperadamente y tal como puede observarse en las figuras 4 y 5, el grupo de bajo contenido de ALA presentaba valores de masa adiposa más elevados, tanto en gramos como en porcentaje, que el grupo de alto contenido de ALA el día 79 ($p < 0,01$), el día 107 ($p < 0,01$) y el día 128 ($p = 0,08$).

30 Los niveles plasmáticos de insulina no eran diferentes entre grupos el día 21. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 6, al final del experimento, el grupo de bajo contenido de ALA mostraba concentraciones aproximadamente 1,5 veces más altas de insulina en plasma que los otros dos grupos. La figura 7 muestra que se observaban resultados similares de contenido de insulina pancreática. El grupo de contenido bajo de ALA mostraba un incremento de aproximadamente 1,4 veces del contenido de insulina pancreática en comparación con el grupo de contenido elevado de ALA ($p = 0,08$).

35 El presente ejemplo demuestra claramente que la alimentación con una dieta rica en ALA durante la infancia desempeña un papel importante en la programación o impronta del tejido adiposo de manera que reduce su susceptibilidad a un desarrollo excesivo posteriormente en la vida. Específicamente, los resultados indican que una ingesta reducida de ALA con una proporción LA:ALA elevada durante el periodo de lactancia/destete conduce a una adiposidad incrementada y a una tendencia a la hiperinsulinemia posteriormente en la vida.

Ejemplo 3

45 El presente ejemplo investiga el efecto de la alimentación con dietas que contienen diferentes cantidades de LA y ALA de crías de cobaya sobre las tasas de proliferación de las células del tejido adiposo (células del TA) y sobre la lipogénesis *de novo* (LDN) mediante la utilización del método de D₂O. Se investigó el grupo de contenido elevado de ALA y el grupo de contenido bajo de ALA del Ejemplo 2. Diez crías de cada grupo recibieron D₂O durante 5 días antes del sacrificio el día 21. Las otras 10 crías recibieron D₂O durante 5 días antes del sacrificio el día 136. El agua deuterada se administró por vía intraperitoneal (0,9% de NaCl esterilizada y 99% de D₂O a razón de 35 mg/g de peso corporal) en la mañana del primer día. Después, las crías bebieron agua deuterada (enriquecida al 8% en deuterio) *ad libitum* durante el resto de los 5 días. A continuación fueron sacrificadas mediante exsanguinación bajo anestesia con isoflurano. Se recogió la sangre de la aorta en viales heparinizados (de mínimo 200 μl). Se recolectaron los tejidos adiposos retroperitoneal, epididimal y subcutáneo y el hígado, así como la médula ósea de las extremidades traseras y se conservaron a -80°C hasta el análisis.

55

El procedimiento analítico ha sido descrito en detalle anteriormente (Neese R.A., Siler S.Q., Cesar D., Antelo F., Lee D., Misell L., Patel K., Tehrani S., Shah P., Hellerstein M.K., "Advances in the stable isotope mass spectrometric measurement of DNA synthesis and cell proliferation", Anal. Biochem. 298: 189-195, 2001). Brevemente, se extrajo el ADN genómico de células AT y los triglicéridos (TG) a partir de los tejidos adiposos (aproximadamente 50 mg). Se determinó el enriquecimiento en deuterio del ADN y de palmitato en los TG mediante espectrometría de masas-cromatografía de gases (CG/EM, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA).

La utilización de la incorporación de O₂ para la estimación de la replicación del ADN (proliferación celular) y la lipogénesis *de novo* (LDN) se basa en la relación de precursor-producto (Hellerstein M.K., Neese R., Mass isotopomer data analysis: a technique for measuring biosynthesis and turnover of polymers, Am. J. Physiol. 263: E988-E1001, 1992). En este método, las divisiones celulares que se produjeron durante el periodo de marcaje se contaron mediante cuantificación de la proporción de cadenas de ADN marcadas. Se calculó la tasa fraccional de proliferación de las células del tejido adiposo (tasa fraccional de síntesis TFS/célula en % de células nuevas/5 días) como el EM1 (enriquecimiento isotópico en exceso) en ADN del tejido adiposo dividido por (normalizado respecto a) EM1 en el ADN de la médula ósea. Se utilizó el enriquecimiento en la médula ósea como aproximación del enriquecimiento máximo del ADN alcanzable en cada animal.

Se calculó la LDN o "tasa fraccional de síntesis de palmitato" (TFSpalmitato en % de palmitato nuevo/5 días) en TG como la incorporación de marcaje deuterio procedente de agua en TG-palmitato utilizando el análisis de distribución de isotómeros de masa (MIDA, por sus siglas en inglés). El presente enriquecimiento máximo de deuterio alcanzable en palmitato se calculó basándose en el enriquecimiento medido en el agua corporal (los cálculos se detallan en Hellerstein M.K. y Neese R.A., Mass isotopomer distribution analysis at eight years: theoretical, analytic, and experimental considerations, Am. J. Physiol. 276: E1146-E1170, 1999).

Resultados

Los pesos de tejido adiposo y del hígado se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Pesos del tejido adiposo (TA) y del hígado (en g) los días 21 y 136.

Grupos	Hígado	TA epididimal*	TA retroperitoneal
d21			
Contenido elevado de ALA	8,57 ± 0,54	0,15 ± 0,02	0,56 ± 0,14
Contenido bajo de ALA	7,09 ± 0,40	0,09 ± 0,01	0,38 ± 0,06
d136			
Contenido elevado de ALA	29,73 ± 2,15	8,09 ± 1,55 ^a	9,36 ± 1,21
Contenido bajo de ALA	30,10 ± 1,11	10,94 ± 0,58 ^b	10,98 ± 0,54
Letras diferentes indican significancia estadística con P<0,05.			
* En d136, P=0,020 entre contenido elevado/contenido bajo de ALA			

El efecto del tratamiento de dieta temprana sobre la tasa fraccional de síntesis (TFS o tasa fraccional de proliferación) de las células en el depósito adiposo se resume en la Tabla 7. Entre las células del TA se incluyen todos los tipos de células, tales como los adipocitos y las células vasculares del estroma (preadipocitos, enterocitos, macrófagos, etc.) del tejido adiposo completo.

Tabla 7: TFS (en % de nuevas células / 5 días) los días d21 y d136

Grupos	TA subcutáneo*	TA epididimal	TA retroperitoneal
d21			
Contenido elevado de ALA	8,9 ± 8,7	13,5 ± 2,0	5,3 ± 2,3
Contenido bajo de ALA	18,7 ± 13,7	15,0 ± 4,1	3,3 ± 0,7
d136			
Contenido elevado de ALA	8,6 ± 1,7 ^a	7,7 ± 1,3	4,0 ± 0,6
Contenido bajo de ALA	15,2 ± 1,3 ^b	7,8 ± 2,6	7,9 ± 2,3
Letras diferentes indican significancia estadística con P<0,05.			
*: En d136, P=0,021 entre contenido elevado/contenido bajo de ALA			

Estos resultados demuestran una tasa de proliferación celular más alta (doble) en el tejido adiposo subcutáneo el día 136 (P=0,021) y una proliferación celular más alta (pero no significativa) en el retroperitoneo y una proliferación celular no modificada en los tejidos adiposos epididimales en el grupo de ALA bajo en comparación con el grupo de ALA elevado. Debido a que el tejido adiposo subcutáneo es el principal depósito de grasas en todo el cuerpo de las cobayas adultas, el incremento de la proliferación celular en este tejido adiposo podría explicar la composición de masa adiposa incrementada que se observa después de una ingesta baja en ALA (resultados obtenidos en el Ejemplo 2). A nivel de mecanismo los resultados sugieren que el incremento de la masa adiposa corporal en el

grupo de ALA bajo implica un incremento de la tasa de proliferación celular en el tejido adiposo (una hiperplasia) en los cobayas en el periodo posterior de adultez.

- 5 Una ingesta baja de ALA no indujo cambios en la lipogénesis *de novo* (LDN) en los depósitos adiposos aunque se observó una LDN hepática más elevada ($P < 0,001$) en el grupo de ALA bajo en comparación con el grupo de ALA elevado el día 21 (Tabla 8).

Tabla 8: LDN (en % de nuevo palmitato / 5 días) los días 21 y 136

Grupos	Hígado	TA subcutáneo	TA epididimal	TA retroperitoneal
d21				
Contenido elevado de ALA	$8,8 \pm 2,6^a$	$9,3 \pm 6,6$	$14,9 \pm 2,8$	$13,8 \pm 5,4$
Contenido bajo de ALA	$17,4 \pm 3,7^b$	$2,2 \pm 1,8$	$17,1 \pm 2,5$	$12,9 \pm 2,3$
d136				
Contenido elevado de ALA	$5,7 \pm 0,6$	$1,87 \pm 0,26$	$1,18 \pm 0,16$	$1,40 \pm 0,39$
Contenido bajo de ALA	$5,6 \pm 0,4$	$1,29 \pm 0,18$	$0,92 \pm 0,12$	$1,06 \pm 0,07$
Letras diferentes indican significancia estadística con $P < 0,001$.				

El presente ejemplo 3 demuestra que una ingesta baja en ALA durante los periodos de lactancia/destete incrementa la tasa de LDN hepática en cobayas de 21 días de edad e incrementa la tasa de proliferación celular en el tejido adiposo subcutáneo en cobayas adultas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de ácido linoleico y ácido α -linolénico en la preparación de una composición nutricional para la reducción del riesgo de desarrollo de obesidad posteriormente en la vida, al administrarla en un lactante durante los primeros seis meses de vida del lactante, en el que dicha composición nutricional comprende una fuente de proteínas, una fuente de lípidos y una fuente de carbohidratos en la que la fuente de lípidos incluye entre 18% y 25% de ácido linoleico y entre 6% y 11% en peso de ácido α -linolénico expresado como porcentaje del contenido de ácidos grasos totales en cada caso y en cantidades tales que la proporción de ácido linoleico:ácido α -linolénico se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 y 10.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho lactante es un animal de compañía joven, tal como un perro o un gato.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha reducción del riesgo de desarrollo de obesidad posteriormente en la vida se caracteriza por una reducción estadísticamente significativa de la masa adiposa en comparación con una población de control que no recibe dicha composición.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 1 o 3, en la que dicha reducción del riesgo de desarrollo de obesidad posteriormente en la vida se caracteriza por que dicha reducción del riesgo resulta evidente en la edad de rebote de adiposidad.

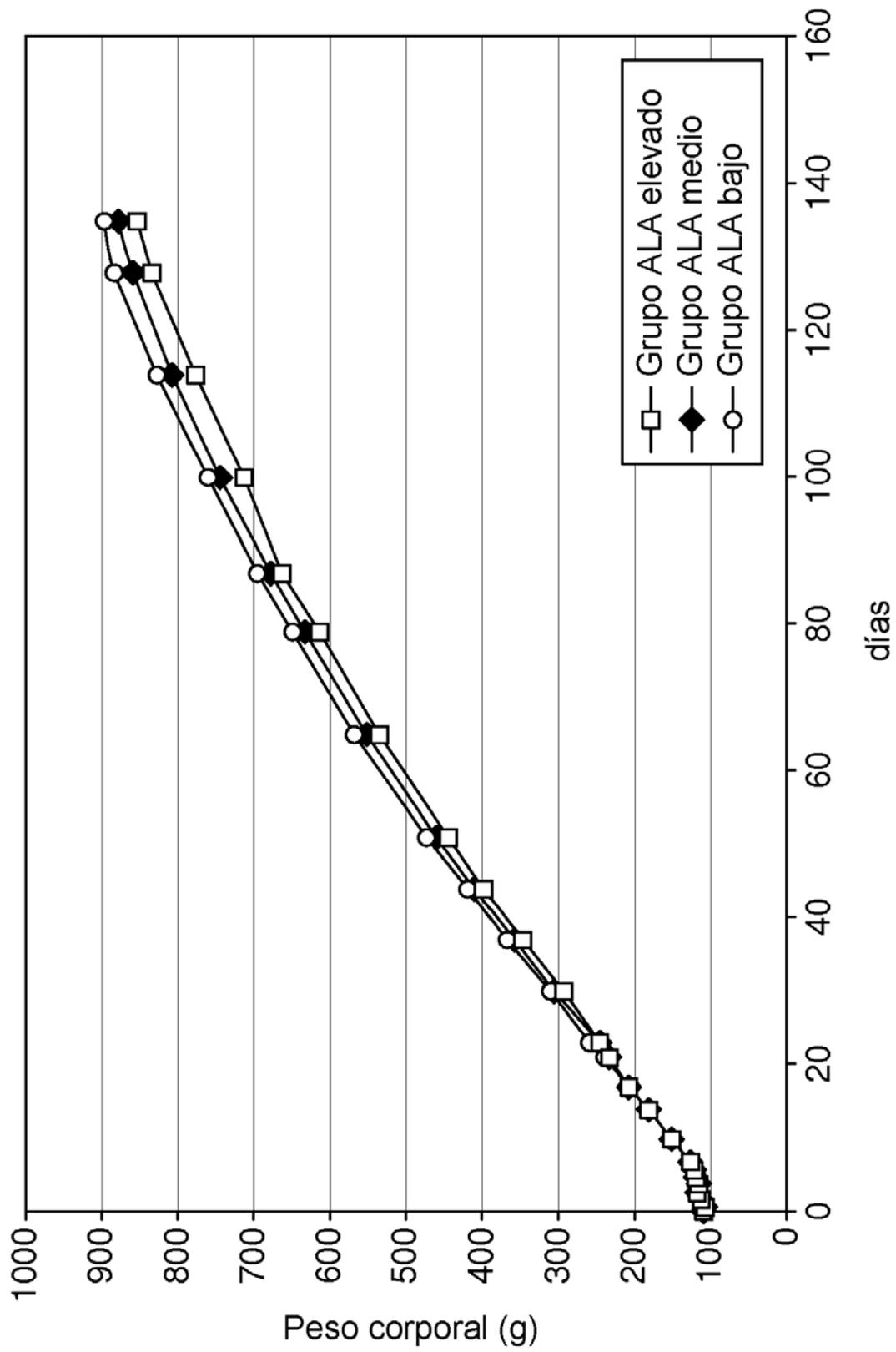


FIG. 1

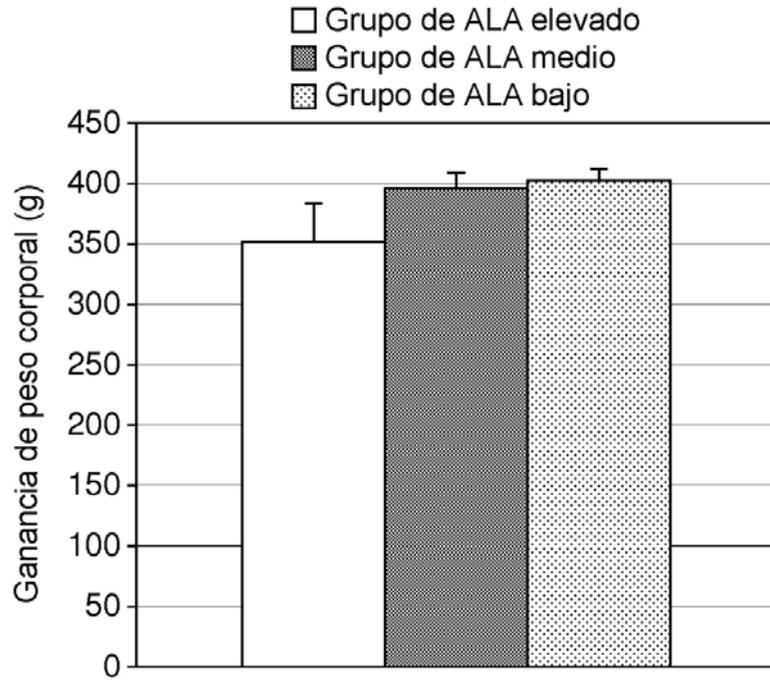


FIG. 2

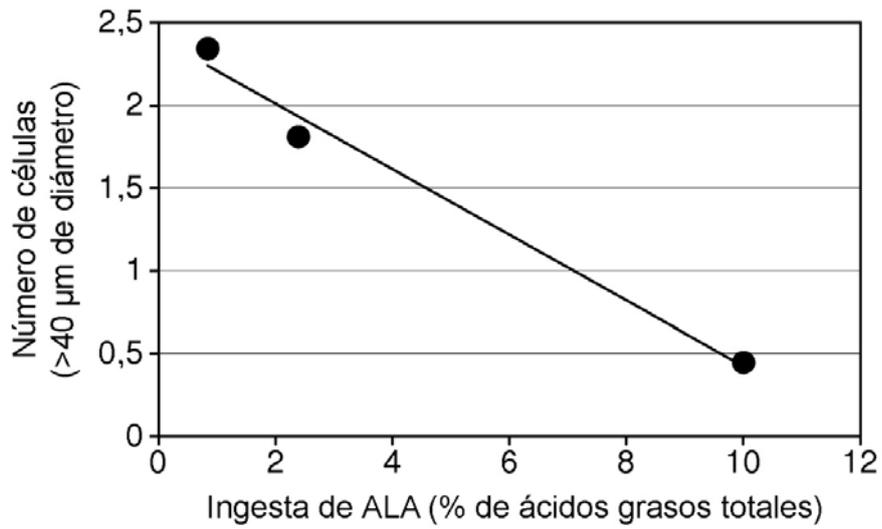


FIG. 3

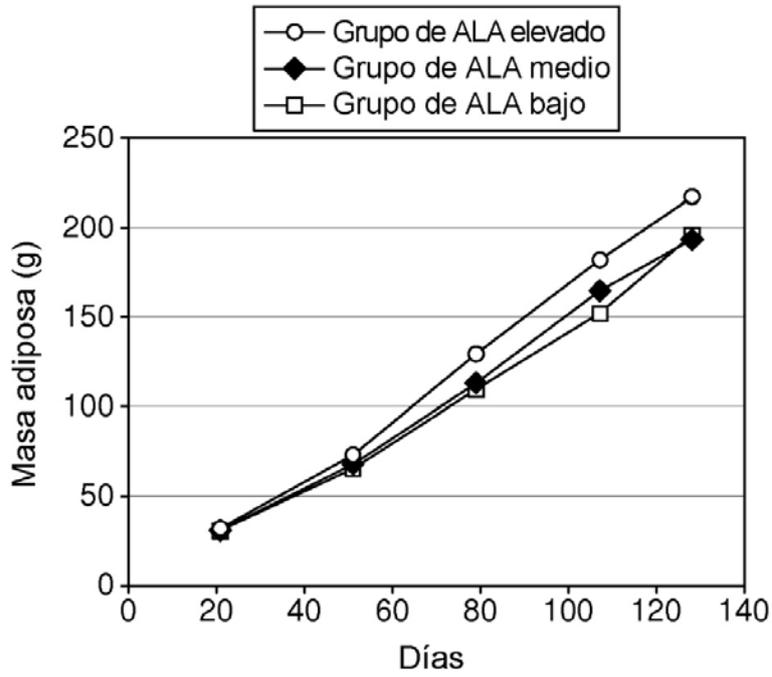


FIG. 4

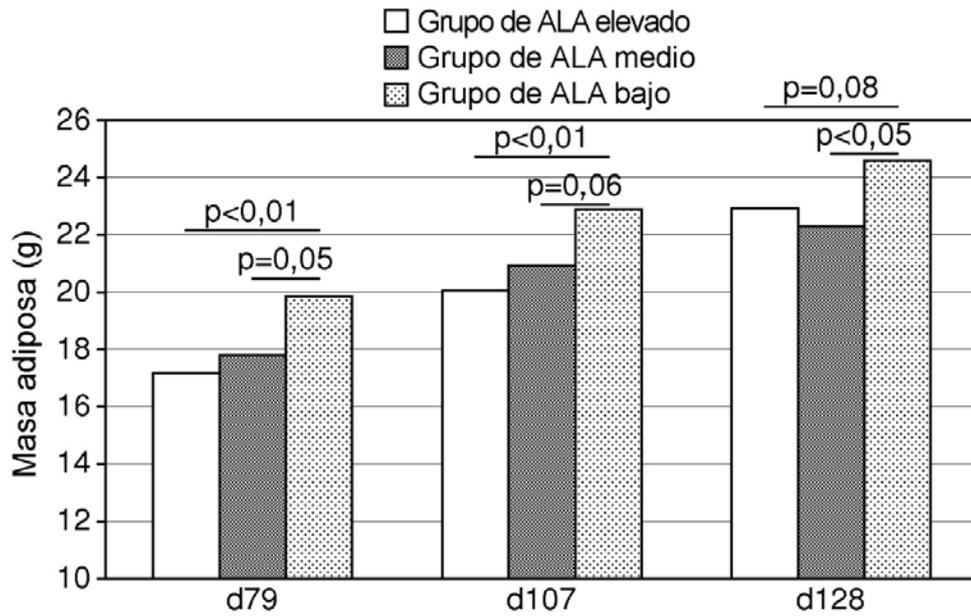


FIG. 5

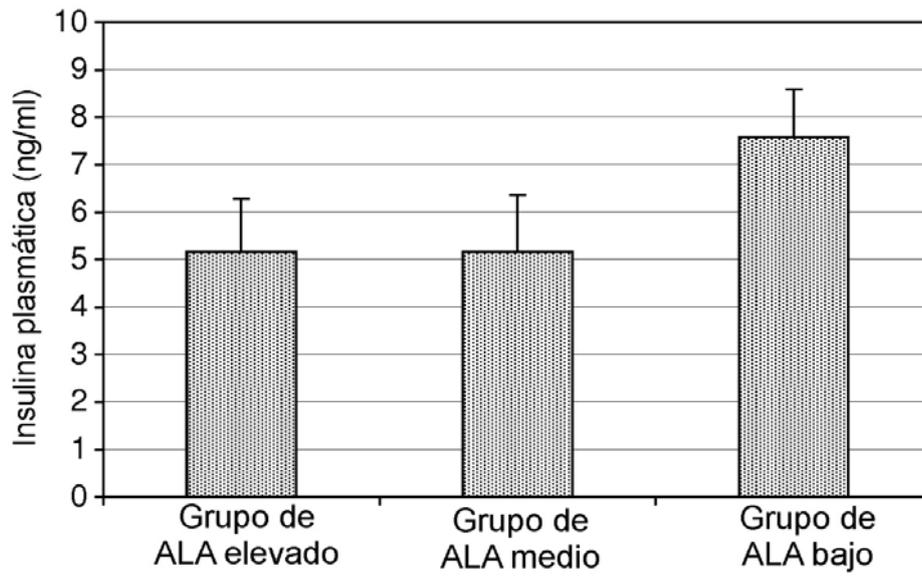


FIG. 6

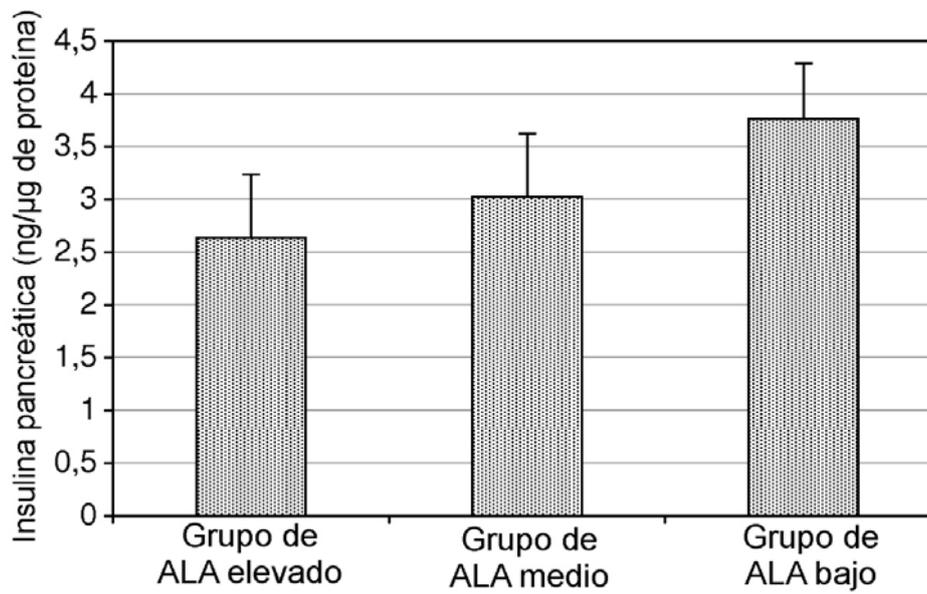


FIG. 7