MÉTODO PARA LA INHIBICIÓN DE LA ABSORCIÓN DE LÍPIDOS Y/O LA PROMOCIÓN DE EXCRECIÓN DE LÍPIDOS USANDO D-PSICOSA

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con un método para la inhibición de la absorción de lípidos y/o promoción de la excreción de lípidos usando D-psicosa.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La D-psicosa, el epímero C-3 de D-fructosa, es un azúcar natural presente en una cantidad traza en mezclas comerciales de D-glucosa y D-fructosa obtenidas de la hidrólisis de sacarosa o la isomerización de D-glucosa. La D-psicosa es un monosacárido con un dulzor del 70% en comparación con el azúcar. Se reportó que la D-psicosa es un edulcorante que contiene pocas o ningunas calorías porque no se metaboliza en el cuerpo y tiene poco efecto sobre el aumento de peso corporal porque funciona para inhibir la formación de grasa corporal. Según un informe publicado recientemente, la D-psicosa tiene efectos no cariogénicos y anticariogénicos. En estas circunstancias, la D-psicosa se encuentra actualmente en desarrollo activo como edulcorante que tiene el potencial de reemplazar el azúcar y ayudar a la salud dental. Por lo tanto, la D-psicosa ha recibido atención como edulcorante para prevenir

el aumento de peso en la industria alimentaria debido a sus características y funcionalidades.

La D-psicosa es generalmente reconocida como segura (GRAS) por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Algunos estudios reportaron que la D-psicosa afecta el metabolismo lipídico (Yasuo nagata et al., J. Agric, Food Chem. 2015, 63, 3168-3176), pero, hasta donde sabemos, hasta la fecha no se ha publicado ningún informe sobre el uso de D-psicosa para la reducción de la absorción de lípidos y promoción de la excreción de lípidos.

Los presentes inventores han descubierto que la D-psicosa tiene funciones de inhibir la absorción de lípidos en el intestino delgado y aumentar considerablemente los niveles de lípidos en las heces, reduce el peso corporal, la masa de grasa corporal y los niveles plasmáticos de lípidos (incluidos ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta densidad y apolipoproteína B) tales que el peso corporal, la masa de grasa corporal y los perfiles de lípidos plasmáticos están normalizados, y es eficaz para la redicción de la actividad de la ácido graso sintasa (FAS). La presente invención se ha realizado en base a este descubrimiento.

DIVULGACIÓN

Problema técnico

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un método para la inhibición de la absorción de lípidos ingeridos por un sujeto y/o promoción de la excreción de los lípidos ingeridos que comprende administrar D-psicosis al sujeto, uso de una composición que comprende D-psicosa para la reducción de la absorción de lípidos alimentarios, inhibidores de ácido graso sintasa (FAS) que comprende D-psicosa, un método para la inhibición de la actividad de ácido graso sintasa en un sujeto que comprende administrar D-psicosa al sujeto, un método para la prevención, mejora o tratamiento de hiperlipidemia, arteriosclerosis o hígado graso que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de D-psicosa a un sujeto que lo necesite, y una composición para la prevención, mejora o tratamiento de la hiperlipidemia, arteriosclerosis o hígado graso que comprende D-psicosa.

Ahora, la presente invención se describirá con más detalle. Las divulgaciones que no están incluidas en la presente serán fácilmente reconocidas y apreciadas por los técnicos en la materia, y por lo tanto se omite su descripción.

Solución Técnica

Un aspecto de la presente invención proporciona un

método para la inhibición de la absorción de lípidos ingeridos por un sujeto y/o promoción de la excreción de los lípidos ingeridos, que comprende administrar D-psicosa al sujeto.

El sujeto incluye mamíferos, incluidos humanos y mamíferos no humanos. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, cabras, cerdos y conejos.

Los lípidos incluyen lípidos de origen animal y vegetal, pero no están limitados a los mismos. Específicamente, los lípidos pueden ser lípidos de origen animal, vegetal o combinaciones de los mismos. Más específicamente, los lípidos pueden ser los que están presentes en los alimentos o piensos.

La administración puede ser administración oral o administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal o aplicación tópica). Específicamente, la administración puede ser administración oral.

La D-psicosa puede administrarse en una cantidad de 10 a 50 partes en peso, relativo a 100 partes en peso de los lípidos ingeridos por el sujeto. Más específicamente, la D-psicosa puede administrarse en una cantidad de 10-40, 10-30, 10-25, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 20-50, 20-40, 20-30, 20-25 o 25 partes en peso, relativo a 100 partes en

peso de los lípidos ingeridos por el sujeto.

En una modalidad de la presente invención, la absorción puede ser absorción en el intestino delgado. Específicamente, al ser administrada a ratones obesos alimentados con dieta alta en grasas, la D-psicosa reduce la expresión de ARNm de genes (CD36, FATP4 y ApoB48) implicados en la absorción de lípidos en el intestino delgado. Específicamente, la D-psicosa reduce la expresión de ARNm de genes (ABCG5 y ABCG8) implicados en la excreción de lípidos.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el uso de una composición que comprende D-psicosa para la inhibición de la absorción de lípidos alimentarios y/o promoción de la excreción de lípidos alimentarios.

A nuestro leal saber y entender, este es el primer informe sobre el mecanismo por el cual la D-psicosa, que se usa ampliamente como edulcorante, inhibe la absorción de los lípidos alimentarios y promueve la excreción de los lípidos alimentarios. Los detalles del mecanismo son los mismos que los descritos anteriormente.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método para la inhibición de la actividad de ácido graso sintasa (FAS) en un sujeto que comprende administrar un inhibidor de ácido graso sintasa que comprende D-psicosa o

D-psicosa al sujeto.

En una modalidad de la presente invención, la D-psicosa reduce la actividad de β-oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Alternativamente, la D-psicosa puede inducir actividad de β-oxidación de los ácidos grasos en el tejido adiposo.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método para la prevención, mejora o tratamiento de la hiperlipidemia, arteriosclerosis o hígado graso que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de D-psicosis a un sujeto que necesite tal prevención, mejora o tratamiento.

Todavía otro aspecto de la presente invención proporciona una composición para la prevención, mejora o tratamiento de la hiperlipidemia, la arteriosclerosis o el hígado graso que comprende D-psicosa.

Como se usa en la presente, el término "hiperlipidemia" se refiere a una enfermedad causada por niveles anormalmente altos de grasa en la sangre como resultado de un metabolismo insuficiente de grasas tales como triglicéridos y colesterol. Más específicamente, la hiperlipidemia se caracteriza por niveles elevados de lípidos (incluidos triglicéridos, colesterol LDL, fosfolípidos y ácidos grasos libres) en la sangre, y la hiperlipidemia incluye hipercolesterolemia o

hipertrigliceridemia, que se produce con frecuencia como resultado de niveles elevados de lípidos.

Como se usa en la presente, el término "arteriosclerosis" se refiere a una enfermedad en la que colesterol se deposita en las paredes internas de las arterias o las células endoteliales vasculares proliferan para estrechar u ocluir las arterias, provocando una mala circulación sanguínea hacia las periferias.

Como se usa en la presente, el término "hígado graso" se refiere a una afección en la que la grasa se acumula excesivamente en las células hepáticas debido al trastorno del metabolismo de las grasas en el hígado. El hígado graso es una causa de diversas enfermedades, tales como angina, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis, hígado graso y pancreatitis.

Como se usa en la presente, el término "prevención" o "prevenir" significa todas las acciones que inhiben o retrasan el desarrollo de enfermedades objetivo. Específicamente, este término significa administrar D-psicosa para inhibir o retrasar el desarrollo de hiperlipidemia, arteriosclerosis y síntomas de hígado graso (por ejemplo, niveles elevados de ácido graso libre en plasma, triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL y niveles de Apo B, índice de arteriosclerosis (AI) alto, aumento de los niveles de ácidos grasos, triglicéridos y

colesterol en el tejido hepático y aumento del tamaño de los adipocitos).

Como se usa en la presente, el término "mejora" o "mejorar" significa todas las acciones que alivian o mejoran los síntomas y los efectos secundarios de las enfermedades. Como se usa en la presente, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a todas las acciones que alivian o cambian beneficiosamente los síntomas y los efectos secundarios de las enfermedades. Específicamente, estos términos significan administrar D-psicosa para mitigar, aliviar o mejorar hiperlipidemia, arteriosclerosis o síntomas de hígado graso, lo que resulta en ácido graso libre plasmático reducido, triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL o nivel de Apo B, índice de arteriosclerosis (AI) bajo, nivel reducido de ácidos grasos, triglicéridos o colesterol, o tamaño de los adipocitos en el tejido hepático reducido.

Como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue, se descubrió que la D-psicosa reduce significativamente los niveles de ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL, Apo B, leptina, niveles de resistina y proporción de leptina/adiponectina en el plasma de ratones con obesidad inducida con dieta alto contenido de grasa, tal que los niveles y la proporción se mantienen de manera similar a

aquellos del grupo con dieta normal, aumenta los niveles de colesterol HDL en plasma y Apo A-1 a valores más altos que los del grupo de dieta normal y disminuye el índice de arteriosclerosis (AI), por lo tanto, es efectivo para la prevención, mejora o tratamiento de la hiperlipidemia o la arteriosclerosis. También se descubrió que la D-psicosa reduce la actividad de ácido graso sintasa (FAS), los niveles de ácidos grasos, triglicéridos, colesterol y el tamaño de los adipocitos en los tejidos hepáticos de ratones con obesidad inducida con dieta con alto contenido en grasa para inhibir el desarrollo de hígado graso por dieta alta en grasas. Además, se confirmó que la D-psicosa reduce la expresión de ARNm de los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos en los hígados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas, por lo que es efectiva para la prevención o tratamiento del hígado graso.

Con base en estos descubrimientos, se puede concluir que la D-psicosa tiene funciones de inhibir la absorción de lípidos en el intestino delgado y aumentar considerablemente los niveles de lípidos en las heces y es efectiva para la reducción de los niveles plasmáticos de lípidos para normalizar los perfiles de lípidos en plasma. Por lo tanto, la D-psicosa puede encontrar aplicación en medicamentos y alimentos (específicamente, alimentos funcionales para la salud) para la prevención, mejora o

tratamiento de la hiperlipidemia, la arteriosclerosis o el hígado graso.

La composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o tópica) dependiendo del uso previsto. Específicamente, la composición de acuerdo con la presente invención puede ser administrada por vía oral.

La composición de acuerdo con la presente invención puede ser usada como composición farmacéutica. En este caso, la composición de acuerdo con la presente invención puede comprender además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración. El portador farmacéuticamente aceptable se puede usar en mezcla con uno o más componentes seleccionados de disolución salina, agua esterilizada, disolución de Ringer, disolución salina tamponada, disolución de dextrosa, disolución de maltodextrina, glicerol y etanol. Se pueden agregar, si es necesario, uno o más aditivos generales, como antioxidantes, disoluciones búfer y agentes bacteriostáticos. La composición de acuerdo con la presente invención se puede preparar en formulaciones inyectables (tales como disoluciones acuosas, suspensiones o emulsiones), píldoras, cápsulas, gránulos o tabletas. En este caso, la composición de acuerdo con la

presente invención puede comprender además uno o más aditivos seleccionados de entre diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. La composición de acuerdo con la presente invención puede prepararse en diversas formulaciones dependiendo del tipo de enfermedad o del tipo de componentes, de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica o cualquiera de los procedimientos convencionales divulgados en Remington's Pharmaceutical Science (la edición más reciente). Mack Publishing Company, Easton PA.

La dosis de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede determinarse tomando en cuenta diversos factores, que incluyen peso corporal, edad, sexo, estado de salud, dieta, tiempo y modo de administración, tasa de excreción y la gravedad de la enfermedad. Una dosis diaria de D-psicosa puede oscilar entre aproximadamente 0.0001 y aproximadamente 600 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 500 mg/kg, y se puede administrar en dosis únicas o divididas por día.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede usar sola o en combinación con la operación quirúrgica, terapia hormonal, tratamiento con medicamentos y reguladores biológicos.

La composición de acuerdo con la presente invención

puede ser usada como composición alimenticia o composición alimenticia saludable. En este caso, la D-psicosa se puede agregar tal como está o en combinación con otros alimentos o ingredientes alimenticios y se puede usar adecuadamente de acuerdo con cualquier método general conocido en la técnica. La cantidad del ingrediente activo puede determinarse de acuerdo con el propósito de uso (prevención, salud o régimen terapéutico). La composición alimenticia puede usarse sin limitación en cualquier alimento o alimento saludable que incluya lípidos. Ejemplos de alimentos adecuados incluyen carnes, salchichas, panes, pasteles, chocolates, dulces, bocadillos, galletas saladas, galletas, pizza, productos de harina (por ejemplo, fideos instantáneos), gomas, productos lácteos (incluidos helados), sopas, catsup, salsas, salsas espesas, aderezos, bebidas, tés, sodas, bebidas alcohólicas y complejos vitamínicos.

La composición alimenticia o composición alimenticia saludable de acuerdo con la presente invención pueden comprender además diversos sabores o carbohidratos naturales, como bebidas generales. Los carbohidratos naturales incluyen monosacáridos tales como glucosa y fructosa, disacáridos tales como maltosa y sacarosa, polisacáridos tales como dextrina y ciclodextrina, y alcoholes de azúcar tales como xilitol, sorbitol y

eritritol. La composición alimenticia o composición alimenticia saludable de acuerdo con la presente invención pueden comprender además agentes edulcorantes naturales o sintéticos. Los agentes edulcorantes naturales incluyen taumatina y extractos de estevia. Los agentes edulcorantes sintéticos incluyen sacarina y aspartamo. El carbohidrato natural se usa típicamente en una cantidad de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.20 g, específicamente de 0.04 a 0.10 g, por 100 ml de la composición alimenticia o composición alimenticia saludable.

La composición alimenticia o composición alimenticia saludable según la presente invención puede comprender además una variedad de nutrientes, vitaminas, electrolitos, aromatizantes, agentes colorantes, ácido péctico y sales del mismo, ácido algínico y sales del mismo, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, agentes de ajuste del pH., estabilizantes, conservantes, glicerina, alcoholes y agente de carbonatación para bebidas carbonatadas. La composición alimenticia o composición alimenticia saludable de acuerdo con la presente invención puede comprender además pulpa de fruta para la producción de jugos de frutas naturales, bebidas de jugos de frutas y/o bebidas de verduras. Estos ingredientes pueden utilizarse de forma independiente o en combinación. La

cantidad total de los ingredientes añadidos puede estar en el intervalo de 0.01 a 0.20 partes en peso, relativo a 100 partes en peso de la composición alimenticia o composición alimenticia saludable.

El uso de la reducción de la absorción de lípidos alimentarios, el inhibidor de la actividad de la ácido graso sintasa, el método para la inhibición de la actividad de la ácido graso sintasa, el método para la prevención, mejora o tratamiento de la hiperlipidemia, la arteriosclerosis o el hígado graso y la composición de acuerdo con la presente invención comparten D-psicosa, lípidos, administración y sujeto en común con el método para la inhibición de la absorción de lípidos y/o promoción de la absorción de lípidos, y por lo tanto se omite su descripción para evitar una complejidad excesiva de la descripción.

Efectos Ventajosos

Los presentes inventores han intentado aclarar la actividad fisiológica de la D-psicosa asignando dietas isocalóricas a cada grupo de dieta para excluir el efecto de la D-psicosa sobre la reducción de calorías, y como resultado, encontraron que la D-psicosa tiene funciones de inhibir la absorción de lípidos en el intestino delgado y aumenta considerablemente los niveles de lípidos en las

heces para inhibir la producción de grasa y reduce el peso corporal, la masa de grasa corporal y los niveles plasmáticos de lípidos de manera que el peso corporal, la masa grasa corporal y los perfiles de lípidos en plasma se normalizan en poco tiempo. Debido a estas ventajas, se espera que la D-psicosa se use para la prevención y/o tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas con los lípidos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los cambios en el peso corporal de ratones C57BL/6J alimentados con D-psicosa y dieta alta en grasas durante 16 semanas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 2 muestra los cambios en los niveles de triglicéridos en plasma y colesterol total de ratones C57BL/6J alimentados con D-psicosa y dieta alta en grasas durante 16 semanas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 3 muestra las influencias de la D-psicosa

en los niveles de leptina, resistina y adiponectina en plasma, y la proporción de leptina:adiponectina (proporción L: A) en ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 4 muestra las influencias de la D-psicosa en (A) los perfiles de lípidos hepáticos, (B) las actividades de las enzimas reguladoras de lípidos hepáticos y (C) las morfologías del tejido hepático de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 5 muestra las influencias de la D-psicosa en (A) las actividades de las enzimas reguladoras de lípidos hepáticos y (B) las morfologías del tejido hepático de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 6 muestra las influencias de la D-psicosa

en la expresión de ARNm de genes (FAS, ACC1, CPT1α, and CPT2) involucrados en la síntesis y oxidación de ácidos grasos en los hígados de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 7 muestra las influencias de la D-psicosa en los niveles de lípidos en heces de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 8 muestra las influencias de la D-psicosa en la expresión de ARNm de genes (CD36, FATP4, ApoB48, ABCG5 and ABCG8) involucrados en la absorción y excreción de lípidos en el intestino delgado de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas [grupo de dieta normal (ND), grupo de dieta alta en grasas (HFD), grupo PSI (HFD + 5 % D-psicosa, p/p), grupo ERY (HFD + 5% eritritol, p/p), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa, p/p)].

La Figura 9 es un diagrama que muestra

esquemáticamente los papeles de la D-psicosa en el metabolismo de los lípidos en el intestino delgado, el hígado y los tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida con la dieta alta en grasas, basándose en los resultados mostrados en las Figuras 1 a 8.

Mejor Modo

La presente invención proporciona un método para la inhibición de la absorción de lípidos y la actividad de la ácido graso sintasa (FAC) en un sujeto, que comprende administrar D-psicosa al sujeto, un inhibidor de la ácido graso sintasa que comprende D-psicosa, un método para la prevención o tratamiento de la hiperlipidemia, la arterioesclerosis o el hígado graso que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de D-psicosa a un sujeto que lo necesite, y una composición para la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, la arteriosclerosis o el hígado graso que comprende D-psicosa.

La composición pretende incluir una composición farmacéutica y una composición alimenticia.

En lo sucesivo, se presentan modalidades preferidas para asistir en la comprensión de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Influencias de la D-psicosa en el peso corporal, el peso de los órganos y el peso del tejido adiposo de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se realizó para investigar las influencias de la D-psicosa en el peso corporal, el peso de los órganos y el peso del tejido adiposo de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

Primero, se compraron ratones C57BL/6J machos de 4 semanas (60 en total) de Jackson Laboratory. Los animales fueron aclimatados al vivero en un termo-higrostato (20-23 °C, 45-65%) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y fueron alimentados con una dieta no purificada comercial peletizada durante 1 semana después de su llegada. Los ratones fueron divididos de forma aleatoria en 6 grupos (n=10) y alimentados con las dietas experimentales respectivas durante 16 semanas: grupo de dieta normal (ND, dieta semi-sintética del Instituto Estadounidense de Nutrición (AIN)-76), grupo de dieta alta en grasas (HFD, 20% de grasa + 1% de colesterol basada en la dieta AIN-76), grupo PSI (HFD + 5% D-psicosa, p/p, Sigma Chemical Company), grupo ERY (HFD + 5% de eritritol, p/p , Sigma Chemical Company), grupo GLU (HFD + 5% D-glucosa, p/p, Sigma Chemical Company) y grupo FRU (HFD + 5% D-fructosa,

p/p, Sigma Chemical Company). Se permitió que todos los grupos alimentados con dietas altas en grasas ingirieran las mismas calorías por medio de alimentación en parejas con base en el grupo PSI. Los ratones tuvieron acceso libre al agua destilada durante el periodo experimental. Sus ingestas de alimento y sus pesos corporales se midieron diariamente y cada dos semanas, respectivamente. Los pesos de los órganos y los pesos del tejido adiposo de los ratones se midieron después de sacrificar a los animales.

Este protocolo de estudio en animales fue aprobado por el Comité de Ética para Estudios con Animales de la Universidad Nacional de Kyungpook, Corea (aprobación No. KNU 2013-18).

Los cambios en el peso corporal de los ratones C57BL/6J alimentados con D-psicosa y dieta alta en grasas durante 16 semanas se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 2. Los pesos de los órganos y los pesos del tejido adiposo de los ratones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Composición de dietas experimentales (% de dieta, p/p)

Ingrediente (g)	ND	HFD	ERY	GLU	FRU	PSI
Caseina	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
D,L-metionina	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Almidón de maiz	150.00	111.00	111.00	111.00	111.00	111.00
Sacarosa	500.00	370.00	320.00	320.00	320.00	320.00
Polvo de celulosa	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Aceite de maiz	50.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Manteca de cerdo	-	170.00	170.00	170.00	170.00	170.00
Mezcla de minerales (AIN-76*)	35.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
Mezcla de vitaminas (AIN-76) †	10.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Bitartrato de colina	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Colesterol	-	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

Composiciones de dietas experimentales (% de dieta, p/p)

* Mezcla mineral (AIN-76): fosfato de calcio 500 g/kg, NaCl 74 g/kg, citrato de potasio 2220 g/kg, sulfato de potasio 52 g/kg, óxido de magnesio 24 g/kg, carbonato de manganeso 3.5 g/kg, citrato de hierro 6 g/kg, carbonato de zinc 1.6 g/kg, carbonato de cobre 0.3 g/kg, yodato de potasio 0.01 g/kg, selenito de sodio 0.01 g/kg, sulfato de potasio cromo 0.55 g/kg, sacarosa 118.03 g/kg

† Mezcla de vitaminas AIN-76: tiamina HCl 0.6 g/kg, riboflavina 0.6 g/kg, piridoxina HCl 0.7 g/kg, niacina 3 g/kg, pantotenato de calcio 1.6 g/kg, ácido fólico 0.2 g/kg, biotina 0.02 g/kg, vitamina B12 1 g/kg, vitamina A (500 000 UI/g) 0.8 g/kg, vitamina D3 (400 000 UI/g) 0.25 g/kg, acetato de vitamina E (500 UI/g) 10 g/kg, bisulfato sódico de menadiona 0.04 g/kg, sacarosa 981.15 g/kg.

Ingrediente (g)	ND	HFD	ERY	GLU	FRU	TODOS
Caseina	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
D,L-metionina	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Almidón de maiz	150.00	111.00	111.00	111.00	111.00	111.00
Sacarosa	500.00	370.00	320.00	320.00	320.00	320.00
Polvo de celulosa	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Aceite de maiz	50.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Manteca de cerdo	-	170.00	170.00	170.00	170.00	170.00
Mezcla de minerales (AIN-76*)	35.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
Mezcla de vitaminas (AIN-76) †	10.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Bitartrato de colina	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Colesterol	-	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
terc-Butilhidroquinona	0.01	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
D-alulosa						50.00
D-glucosa				50.00		
D-fructosa					50.00	
Eritritol			50.00			
Total (g)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
Calorias (kcal/kg)	3902	4584	4384	4584	4584	4384
Calorias (kcal/g)	3.902	4.584	4.384	4.584	4.584	4.384

Tabla 2.

	ND	HFD	ERY	GLU	FRU	PSI
Peso corporal inicial (g)	19.20±0.37	18.97±0.36	19.00±0.54	19.45±0.42	19.08±0.59	18.99±0.35
Peso corporal final (g)	29.37±0.58	39.38±1.40^{***a}	40.22±1.36^{a}	41.77±1.31^{a}	41.26±1.93^{a}	30.13±0.69^{b}
Ganancia de peso corporal (g/16 semanas)	0.64±0.0.02	1.28±0.08^{***a}	1.32±0.10^{a}	1.39±0.07^{a}	1.39±0.09^{a}	0.70±0.04^{b}
Ingesta de comida (g/día)	3.12±0.10	3.03±0.25	3.17±0.26	3.03±0.25	3.03±0.25	3.17±0.26
Ingesta de energía (kcal/día)	12.16±0.39	13.88±1.15	13.88±1.15	13.88±1.15	13.88±1.15	13.88±1.15
FER	0.029±0.001	0.060±0.002^{***a}	0.059±0.003^{a}	0.065±0.003^{a}	0.065±0.003^{a}	0.031±0.002^{b}
Peso de órganos (g/100g de peso corporal)						
Músculos	1.08±0.02	0.85±0.03^{***a}	0.77±0.03^{b}	0.82±0.03^{b}	0.83±0.04^{b}	1.01±0.02^{a}
Hígado	3.41±0.05	5.49±0.32^{***a}	5.37±0.25^{a}	5.22±0.15^{a}	5.68±0.35^{a}	4.35±0.08^{b}
Riñón	0.98±0.02	0.81±0.04^{*b}	0.77±0.04^{b}	0.74±0.02^{b}	0.84±0.05^{b}	1.03±0.02^{a}
Peso de tejido adiposo (g/100g de peso corporal)						
Grasa perinéfrica	0.43±0.04	1.25±0.09^{***a}	0.92±0.10^{a}	1.15±0.19^{a}	1.17±0.14^{a}	0.38±0.04^{a}
Grasa epidídima	3.04±0.21	8.28±0.61^{a}	7.92±0.60^{a}	8.42±0.89^{a}	8.50±0.71^{a}	3.67±0.45^{a}
Grasa retroperitoneal	0.88±0.07	2.32±0.08^{***a}	2.21±0.15^{a}	2.01±0.22^{ab}	2.19±0.22^{a}	1.34±0.32^{a}
Grasa subcutánea	1.61±.13	4.95±0.41^{***ab}	4.88±0.15^{ab}	5.47±0.47^{a}	3.78±0.84^{a}	1.99±0.19^{a}
Grasa mesentérica	1.16±0.06	2.95±0.23^{***a}	2.43±0.26^{a}	2.62±0.44^{a}	2.93±0.34^{a}	0.87±0.09^{a}
Grasa visceral	7.13±0.48	19.74±0.28^{***a}	18.36±0.54^{a}	19.67±0.41^{a}	18.22±0.42^{a}	8.26±0.17^{a}
WAT interscapular	1.54±0.10	4.42±0.04^{***a}	4.56±0.04^{a}	4.54±0.05^{a}	4.43±0.05^{a}	1.70±0.02^{a}
BAT interscapular	0.34±0.02	0.75±1.09^{***a}	0.57±1.66^{ab}	0.71±1.52^{a}	0.73±1.98^{a}	0.34±0.98^{a}
WAT total	9.01±0.59	24.16±1.34^{***a}	22.93±2.20^{a}	24.21±1.83^{a}	22.65±2.37^{a}	9.95±1.15^{a}

	ND	HFD	ERY	GLU	FRU	PSI
Peso corporal inicial (g)	19.20±0.37	18.97±0.36	19.00±0.54	19.45±0.42	19.08±0.59	18.99±0.35
Peso corporal final (g)	29.37±0.58	39.38±1.40^{***a}	40.22±1.36^{a}	41.77±1.31^{a}	41.26±1.93^{a}	30.13±0.69^{b}
Ganancia de peso corporal (g/16 semanas)	0.64±0.0.02	1.28±0.08^{***a}	1.32±0.10^{a}	1.39±0.07^{a}	1.39±0.09^{a}	0.70±0.04^{b}
Ingesta de comida (g/día)	3.12±0.10	3.03±0.25	3.17±0.26	3.03±0.25	3.03±0.25	3.17±0.26
Ingesta de energía (kcal/día)	12.16±0.39	13.88±1.15	13.88±1.15	13.88±1.15	13.88±1.15	13.88±1.15
FER	0.029±0.001	0.060±0.002^{***a}	0.059±0.003^{a}	0.065±0.003^{a}	0.065±0.003^{a}	0.031±0.002^{b}
Peso de órganos (g/100g de peso corporal)						
Músculos	1.08±0.02	0.85±0.03^{***a}	0.77±0.03^{b}	0.82±0.03^{b}	0.83±0.04^{b}	1.01±0.02^{a}
Hígado	3.41±0.05	5.49±0.32^{***a}	5.37±0.25^{a}	5.22±0.15^{a}	5.68±0.35^{a}	4.35±0.08^{b}
Riñón	0.98±0.02	0.81±0.04^{*b}	0.77±0.04^{b}	0.74±0.02^{b}	0.84±0.05^{b}	1.03±0.02^{a}
Peso de tejido adiposo (g/100g de peso corporal)						
Grasa perinéfrica	0.43±0.04	1.25±0.09^{***a}	0.92±0.10^{a}	1.15±0.19^{a}	1.17±0.14^{a}	0.38±0.04^{a}
Grasa epidídima	3.04±0.21	8.28±0.61^{a}	7.92±0.60^{a}	8.42±0.88^{a}	8.50±0.71^{a}	3.67±0.45^{a}
Grasa retroperitoneal	0.88±0.07	2.32±0.08^{***a}	2.21±0.15^{a}	2.01±0.22^{ab}	2.19±0.22^{a}	1.34±0.32^{a}
Grasa subcutánea	1.61±.13	4.95±0.41^{***ab}	4.88±0.15^{ab}	5.47±0.47^{a}	3.78±0.84^{a}	1.99±0.19^{a}
Grasa mesentérica	1.16±0.06	2.95±0.23^{***a}	2.43±0.26^{a}	2.62±0.44^{a}	2.93±0.34^{a}	0.87±0.09^{a}
Grasa visceral	7.13±0.48	19.74±0.28^{***a}	18.36±0.54^{a}	19.67±0.41^{a}	18.22±0.42^{a}	8.26±0.17^{a}
WAT interscapular	1.54±0.10	4.42±0.04^{***a}	4.56±0.04^{a}	4.54±0.05^{a}	4.43±0.05^{a}	1.70±0.02^{a}
BAT interscapular	0.34±0.02	0.75±1.09^{***a}	0.57±1.66^{ab}	0.71±1.52^{a}	0.73±1.98^{a}	0.34±0.98^{a}
WAT total	9.01±0.59	24.16±1.34^{***a}	22.93±2.20^{a}	24.21±1.83^{a}	22.65±2.37^{a}	9.95±1.15^{a}

Significancia estadística entre los grupos ND y NFD: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$.

Significancia estadística entre los grupos HFD, ERY, GLU, FRU y PSI ($p<0.05$); Promedio^{a,b,c}.

BWG ganancia de peso: FER, relación de eficiencia alimentaria = ganancia de peso / ingesta de dieta, eficiencia de la dieta

Como se muestra en la Fig. 1 y Tabla 2, los pesos corporales iniciales de los ratones en todos los grupos experimentales fueron casi los mismos, pero los pesos corporales de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasa aumentaron significativamente en comparación con los ratones en el grupo de dieta normal (ND) a partir de 4 semanas después de la alimentación. Sin embargo, los aumentos en el peso corporal de los ratones con obesidad alimentados con PSI se inhibieron considerablemente a partir de 4 semanas después de la alimentación con dieta, y como resultado, sus pesos corporales se mantuvieron casi en los mismos niveles que aquellos de los ratones del grupo ND. Es decir, la eficiencia de la dieta del grupo PSI fue significativamente más baja que aquella de otros grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) y se mantuvo casi al mismo nivel que aquella del grupo ND.

Además, se realizó una investigación sobre si la pérdida de peso corporal del grupo PSI fue causada por el peso reducido de los órganos. Para este fin, se midieron los pesos de los órganos (músculos, hígados y riñones) y los tejidos adiposos (grasa perirrenal, grasa epididimal, grasa retroperitoneal, grasa subcutánea, grasa mesentérica, grasa visceral, WAT interescapular, BAT interescapular y WAT total). Como se muestra en la Tabla 2, el peso de los músculos y los riñones por unidad de peso corporal del

ratón en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) excepto el grupo PSI disminuyó significativamente en comparación con aquellos del grupo ND y los pesos de los hígados por unidad de peso corporal del ratón en los grupos de dieta alta en grasa aumentaron significativamente en comparación con aquellos del grupo ND. Sin embargo, se descubrió que los pesos de los músculos y los riñones por unidad de peso corporal del ratón en el grupo PSI eran similares a los del grupo ND. Los pesos de la grasa perinéfrica, grasa epidídima, grasa retroperitoneal, grasa subcutánea, grasa mesentérica, grasa visceral, WAT interescapular, BAT interescapular y WAT total por unidad de peso corporal del ratón en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU), excepto el grupo PSI, aumentaron significativamente, mientras que los pesos de todos los tipos de grasas en el grupo PSI disminuyeron significativamente y se mantuvieron casi en los mismos niveles que aquellos del grupo ND.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la D-psicosa inhibió el aumento de peso en los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas y redujo las eficiencias de la dieta y los pesos de los hígados y tejidos adiposos por unidad de peso corporal del ratón en los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasa a niveles similares a aquellos del grupo ND. En conclusión,

la D-psicosa es efectiva para normalizar el peso corporal y la masa de grasa corporal.

Ejemplo 2: Influencias de la D-psicosa en los perfiles de lípidos en plasma de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se realizó para investigar las influencias de la D-psicosa en los perfiles de lípidos en plasma de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas.

Se midieron los niveles de ácidos grasos libres, fosfolípidos, apolipoproteína A-I (Apo A-I) y apolipoproteína B (ApoB B) usando kits enzimáticos de Nittobo (Nittobo medical Co., Tokio, Japón). Los niveles plasmáticos de HDL-colesterol, triglicéridos (TG) y colesterol total (C total) se midieron usando kits enzimáticos de Asan (Asan, Seúl, Corea del Sur).

Los resultados se muestran en la Figura 2 y la Tabla 3.

Tabla 3.

	ND	HFD	ERY	GLU	FRU	PSI
FFA (mmol/L)	0.38±0.04	0.52±0.05*a	0.53±0.02a	0.49±0.06a	0.48±0.04a	0.41±0.02b
TG (mmol/L)	0.84±0.06	1.28±0.06***a	1.25±0.07a	1.28±0.08a	1.17±0.03a	0.99±0.04b
PL (mg/dL)	88.64±8.51	115.58±5.28**b	135.46±6.28a	104.86±6.92b	115.27±5.85b	107.23±2.82b
Total-C (mmol/L)	2.95±0.17	4.17±0.17***b	5.35±0.98a	4.07±0.17b	4.14±0.29b	2.99±0.09c
HDL-C (mmol/L)	0.91±0.04	1.16±0.06*a	1.22±.08a	0.82±0.03b	0.83±0.09b	1.28±.07a
C no HDL (mmol/L)	2.01±0.15	3.00±0.15***b	4.36±0.73a	3.25±0.15b	3.32±0.29b	1.84±.13c
ApoA-I (mg/dL)	26.41±1.01	28.62±0.85*b	27.28±0.58b	27.23±.95b	27.69±0.48b	29.39±0.95a
ApoB (mg/dL)	7.35±0.89	9.16±0.4*ab	8.61±0.90b	9.32±1.04ab	9.96±0.79a	7.63±0.52c
AI	2.25±0.15	2.65±0.16ab	3.55±0.13ab	3.76±0.15ab	4.55±0.66a	1.42±0.13b
HTR	31.20±1.37	28.12±1.18b	23.95±3.53b	20.19±0.60b	20.62±2.56b	42.98±2.62a
APO-A I/ APO-B	3.59 ±0.56	3.12±0.17*b	3.16±0.34b	2.92±0.35b	2.77±0.21b	3.80±0.23a

Significancia estadística entre los grupos ND y HFD: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$.

Significancia estadística entre los grupos HFD, ERY, GLU, FRU y PSI ($p<0.05$); Promedio^{a,b,c}.

TG, triglicérido; C, colesterol; PL, fosfolípido; HDL-C, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; Apo A-I, apolipoproteína A-1; Apo-B, apolipoproteína B; AI, índice aterogénico, [(C Total)-HDL-C)]/HDL-C; HTR, (HDL-C/C Total)×100

Como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 3, los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, triglicéridos,

fosfolípidos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol no HDL, apolipoproteína AI (Apo AI) y apolipoproteína B (ApoB B) en los grupos de dietas altas en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU), excepto que el grupo PSI aumentó significativamente en comparación con aquellos del grupo ND, pero se descubrió que los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL y Apo B en el grupo PSI eran similares a aquellos en el grupo de dieta normal. Particularmente, los niveles de colesterol HDL y Apo A-I en el grupo PSI fueron más altos que aquellos del grupo ND y se descubrió que el índice de arteriosclerosis (AI) del grupo PSI era más bajo que en el grupo ND.

A partir de estos resultados, se puede observar que la D-psicosa redujo los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL y Apo B en los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas a valores similares a aquellos del Grupo ND, siendo así efectivo en la normalización de los perfiles de lípidos en plasma. Además, la D-psicosa aumentó los niveles plasmáticos de colesterol HDL y Apo AI en los ratones con obesidad inducida por con dieta alta en grasas a valores más altos que aquellos del grupo ND y redujo los índices de arteriosclerosis de los ratones con obesidad inducida por con dieta alta en grasas a valores más bajos

que aquellos del grupo ND. Por lo tanto, se espera que la D-psicosa se use para prevenir la arteriosclerosis.

Ejemplo 3: Influencias de la D-psicosa en los niveles plasmáticos de leptina, resistina y adiponectina y proporción leptina:adiponectina (proporción L:A) en ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se llevó a cabo para investigar las influencias de la D-psicosa en los niveles plasmáticos de leptina, resistina y adiponectina y la proporción leptina:adiponectina (proporción L:A) en ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas.

Los niveles plasmáticos de leptina, resistina y adiponectina se midieron usando kits multiplex Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Todas las muestras se analizaron por duplicado y se analizaron usando un sistema de mapa de laboratorio Luminex 200 (Luminex, Austin, TX, EE. UU.). El análisis de los datos se realizó utilizando el *software* Bio-Plex Manager versión 4.1.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Como se muestra en la Figura 3, los niveles plasmáticos de leptina y resistina y las proporciones leptina:adiponectina en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) excepto el grupo PSI aumentaron

significativamente en comparación con los del grupo ND, pero los niveles plasmáticos de leptina y resistina y la proporción leptina:adiponectina en el grupo PSI se redujeron considerablemente a niveles similares a aquellos del grupo ND.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la D-psicosa redujo los niveles plasmáticos de leptina y resistina y las proporciones leptina:adiponectina en los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas a valores normales.

Ejemplo 4: Influencias de la D-psicosa en los perfiles de lípidos hepáticos, actividad enzimática reguladora de los lípidos hepáticos y morfologías del tejido hepático de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se llevó a cabo para investigar las influencias de la D-psicosa en los perfiles de lípidos hepáticos, las actividades enzimáticas reguladoras de los lípidos hepáticos y las morfologías del tejido hepático de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas.

Ejemplo 4-1. Perfiles de lípidos hepáticos

Los lípidos hepáticos se extrajeron de ratones en el grupo de dieta normal (ND) y los grupos de dieta alta en

grasas (HFD, ERY, GLU, FRU y PSI) y se secaron. Luego, cada uno de los extractos de lípidos hepáticos desecados se disolvió en 1 ml de etanol. Se emulsionaron 200 µl de la disolución lipídica en una disolución de Triton X-100 y colato de sodio en agua destilada. Los niveles de ácidos grasos hepáticos, triglicéridos y colesterol se analizaron usando los mismos kits enzimáticos que aquellos usados en el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en (A) de la Figura 4.

Como se muestra en (A) de la Figura 4, los niveles de ácidos grasos hepáticos, triglicéridos y colesterol en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU, FRU y PSI) fueron significativamente más altos que en el Grupo ND pero los niveles de ácidos grasos hepáticos, triglicéridos y colesterol en el grupo PSI disminuyeron significativamente en comparación con aquellos de otros grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU).

Ejemplo 4-2. Actividad enzimática reguladora de los lípidos hepáticos

Las muestras se prepararon y analizaron de acuerdo con el método desarrollado por Hulcher y Oleson. Específicamente, la actividad de la ácido graso sintasa (FAS) como una enzima reguladora de lípidos hepáticos se midió por ensayo espectrofotométrico de acuerdo con el método descrito por Nepokroeff et al. Cada muestra se

mezcló con 100 µl de fracción citoplasmática y la mezcla se dejó reaccionar a 30 °C durante 2 min. Se midió una reducción en la absorbancia a 340 nm. Las unidades de actividad de la ácido graso sintasa (FAS) se expresaron como nanomoles (nmol) de NADPH oxidado durante 1 minuto por mg de fracción citoplásmica. La actividad de β-oxidación de ácidos grasos se midió controlando la reducción de NAD+ a NADH en presencia de palmitoil-CoA, de acuerdo con lo descrito por Lazarow. Las unidades de actividad de β-oxidación se expresaron como nanomoles (nmol) de NADH producido durante 1 minuto por mg de proteína mitocondrial.

Los resultados se muestran en (B) de la Figura 4.

Como se muestra en (B) de la Figura 4, las actividades de FAS y las actividades de β-oxidación de ácidos grasos en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) excepto el grupo PSI aumentaron significativamente en comparación con aquellos del grupo ND pero las actividades de FAS y las actividades de β-oxidación de ácidos grasos en el grupo PSI disminuyeron significativamente en comparación con aquellas de otros grupos de dietas altas en grasas y resultaron ser similares a aquellas del grupo ND.

Ejemplo 4-3. Morfologías de tejido hepático

Los tejidos hepáticos fueron extraídos de los ratones en el grupo de dieta normal (ND) y en los grupos de dieta

alta en grasas (HFD, ERY, GLU, FRU y PSI) y fueron fijados en una disolución búfer de formalina al 10%. Los tejidos hepáticos fijos fueron embebidos en parafina. Se prepararon secciones de 4 mm a partir de los tejidos hepáticos y sus secciones transversales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las áreas teñidas se observaron utilizando un microscopio óptico con un aumento de 200× (Nikon, Tokio, Japón).

Los resultados se muestran en (C) de la Figura 4.

Como se muestra en (C) de la Figura 4, la acumulación de adipocitos en los tejidos hepáticos de los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) excepto el grupo PSI se observó más claramente que en los tejidos hepáticos del grupo ND y el tamaño de los adipocitos en los tejidos hepáticos del grupo PSI fue menor que en los tejidos hepáticos de otros grupos de dieta alta en grasas.

Estos resultados revelan que la D-psicosa disminuyó los niveles de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol, las actividades de FAS y el tamaño de los adipocitos en los hígados de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas. En conclusión, la D-psicosa es efectiva para la inhibición del hígado graso. Además, la D-psicosa redujo las actividades de β-oxidación de ácidos grasos hepáticos, que se habían incrementado con dietas altas en grasas, a niveles similares a aquellos del grupo de dieta normal. En

conclusión, la D-psicosa es efectiva para mantener la homeostasis del metabolismo de los lípidos hepáticos a un nivel normal.

Ejemplo 5: Influencias de la D-psicosa en las actividades enzimáticas que regulan los lípidos y las morfologías tisulares en los tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se llevó a cabo para investigar las influencias de la D-psicosa en las actividades enzimáticas que regulan los lípidos y las morfologías tisulares en los tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas.

Ejemplo 5-1. Lípidos que regulan las actividades enzimáticas en los tejidos adiposos

Las muestras se prepararon y analizaron de acuerdo con el método desarrollado por Hulcher y Oleson. Específicamente, la actividad de la ácido graso sintasa (FAS) como una enzima reguladora de lípidos del tejido adiposo blanco se midió por ensayo espectrofotométrico de acuerdo con el método descrito por Nepokroeff et al. Cada muestra se mezcló con 100 µl de fracción citoplasmática y la mezcla se dejó reaccionar a 30 °C durante 2 min. Se midió una reducción en la absorbancia a 340 nm. Las unidades de actividad de FAS se expresaron como nanomoles

(nmol) de NADPH oxidado durante 1 minuto por mg de fracción citoplásmica. La actividad de β-oxidación de ácidos grasos se midió controlando la reducción de NAD+ a NADH en presencia de palmitoil-CoA, de acuerdo con lo descrito por Lazarow. Las unidades de actividad de β-oxidación se expresaron como nanomoles (nmol) de NADH producido durante 1 minuto por mg de proteína mitocondrial.

Los resultados se muestran en (A) de la Figura 5.

Como se muestra en (A) de la Figura 5, las actividades de FAS en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) excepto el grupo PSI aumentaron significativamente en comparación con aquellos del grupo ND y las actividades de β-oxidación de ácidos grasos en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU), excepto el grupo PSI, disminuyeron significativamente en comparación con aquellos del grupo ND. Las actividades de FAS en el grupo PSI disminuyeron significativamente en comparación con aquellas de otros grupos de dieta alta en grasas, mientras que las actividades de β-oxidación de ácidos grasos en el grupo PSI aumentaron significativamente en comparación con aquellas de otros grupos de dieta alta en grasas y se descubrió que eran similares a aquellas en el grupo de dieta normal. A partir de estos resultados, se puede observar que la D-psicosa redujo la síntesis de ácidos grasos y aumentó la oxidación de ácidos grasos en

los tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas. En conclusión, la D-psicosa es efectiva para la reducción de la masa de grasa corporal.

Ejemplo 5-2. Morfologías de tejido adiposo

Los WAT epidídimos fueron extraídos de los ratones en el grupo de dieta normal (ND) y en los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU, FRU y PSI) y fueron fijados en una disolución búfer de formalina al 10%. Los WAT epidídimos fijos fueron embebidos en parafina. Se prepararon secciones de 4 mm a partir de los WAT epidídimos y sus secciones transversales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las áreas teñidas se observaron utilizando un microscopio óptico con un aumento de 200× (Nikon, Tokio, Japón).

Los resultados se muestran en (B) de la Figura 5.

Como se muestra en (B) de la Figura 5, se observó claramente un aumento en el tamaño de los adipocitos en los WAT epidídimos de los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) excepto el grupo PSI en comparación con los WAT epidídimos del grupo ND. Se descubrió que el tamaño de los adipocitos en el grupo PSI era relativamente pequeño en comparación con aquel de otros grupos de dieta alta en grasas.

A partir de estos resultados, se puede observar que la D-psicosa redujo la síntesis de ácidos grasos y aumentó

la oxidación de ácidos grasos en los tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas, resultando en una reducción del tamaño de adipocitos y una inhibición de la acumulación de lípidos. En conclusión, la D-psicosa es efectiva para la normalización de la masa de grasa corporal al nivel normal.

Ejemplo 6: Influencias de la D-psicosa en la expresión del ARNm de genes implicados en la síntesis y oxidación de ácidos grasos en los hígados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se llevó a cabo para investigar las influencias de la D-psicosa en la expresión del ARNm de genes (FAS, ACC1, CPT1α, and CPT2) implicados en la síntesis y oxidación de ácidos grasos en los hígados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

Las muestras fueron preparadas y analizadas según se describió anteriormente. Específicamente, el ARN total fue sintetizado en ADNc usando un kit de transcripción inversa QuantiTect (QIAGEN Gmbh, Hilden, Alemania). La expresión de ARN fue cuantificada con PCR cuantitativa en tiempo real usando un kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN Gmbh, Hilden, Alemania). Los oligonucleótidos fueron diseñados para detectar FAS (ácido graso sintasa, 14101), ACC1 (Acetil-CoA carboxilasa 1, 107476), CPT1α (Carnitina

palmitoiltransferasa 1α, 12894) y CPT2 (Carnitina palmitoiltransferasa 2, 12896). GAPDH fue usado como un marcador de transcripción interno. La reacción fue realizada en un total de 40 ciclos (cada uno de los cuales consistió en 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C, 30 segundos a 72 °C, y 15 segundos a 65 °C). Las señales de fluorescencia fueron monitorizadas en cada ciclo y los ciclos umbral (Ct) resultantes fueron analizados. La expresión de ARNm en cada grupo experimental fue cuantificada utilizando un sistema de tiempo real CFX96 (Bio-rad, EE. UU.).

Los resultados se muestran en la Figura 6.

Como se muestra en la Figura 6, los niveles de expresión de ARNm de genes (FAS y ACC1) implicados en la síntesis de ácidos grasos hepáticos y genes (CPT1α y CPT2) implicados en la oxidación de ácidos grasos en todos los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU, FRU, PSI) fueron significativamente más bajos que aquellos en el grupo ND. Particularmente, los niveles de expresión de ARNm de genes (FAS y ACC1) implicados en la síntesis de ácidos grasos hepáticos y genes (CPT1α y CPT2) implicados en la oxidación de ácidos grasos en el grupo PSI fueron significativamente más bajos que aquellos en el grupo ND.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la D-psicosa redujo la expresión de ARNm de los genes

implicados en la síntesis de ácidos grasos en los hígados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas para inhibir la producción de grasa en los hígados.

Ejemplo 7: Influencias de la D-psicosa en la excreción de lípidos en heces de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se realizó para investigar las influencias de la D-psicosa en la excreción de lípidos en heces de los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas.

Los lípidos fueron extraídos de las heces de ratones en el grupo de dieta normal (ND) y los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU, FRU y PSI) y se secaron. Luego, cada uno de los extractos de lípidos desecados se disolvió en 1 ml de etanol. Se emulsionaron 200 µl de la disolución lipídica en una disolución de Triton X-100 y colato de sodio en agua destilada. Los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos en las heces se analizaron usando los mismos kits enzimáticos que aquellos usados en el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Figura 7.

Como se muestra en la Figura 7, los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos en las heces de los grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU, FRU y

PSI) fueron significativamente más altos que aquellos del grupo de dieta normal. Particularmente, se confirmó que los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos en las heces del grupo PSI eran significativamente más altos que aquellos de otros grupos de dietas altas en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU).

A partir de estos resultados, se puede concluir que la D-psicosa aumenta la excreción de lípidos en las heces de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas, lo cual está asociado con el efecto inhibidor de la D-psicosa sobre la absorción de grasa entérica.

Ejemplo 8: Influencias de la D-psicosa en la expresión del ARNm de genes implicados en la absorción de lípidos en los intestinos delgados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

El siguiente experimento se llevó a cabo para investigar las influencias de la D-psicosa en la expresión del ARNm de genes (CD36, FATP4, and ApoB48) implicados en la absorción de lípidos y genes (ABCG5 and ABCG8) implicados en la excreción en los intestinos delgados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas

Las muestras fueron preparadas y analizadas según se describió anteriormente. Específicamente, el ARN total fue sintetizado en ADNc usando un kit de transcripción inversa

QuantiTect (QIAGEN Gmbh, Hilden, Alemania). La expresión de ARN fue cuantificada con PCR cuantitativa en tiempo real usando un kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN Gmbh, Hilden, Alemania). Los oligonucleótidos fueron diseñados para detectar CD36 (*cluster* de diferenciación 36, 12491), ApoB48 (apolipoproteína B 48, 238055), FATP4 (transportador de ácidos grasos 4, 26569), ABCG5 (*cassette* de unión a ATP subfamilia G, miembro 5, 27409), y ABCG8 (*cassette* de unión a ATP subfamilia G miembro 8, 67470). GAPDH fue usado como un marcador de transcripción interno. La reacción fue realizada en un total de 40 ciclos (cada uno de los cuales consistió en 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C, 30 segundos a 72 °C, y 15 segundos a 65 °C). Las señales de fluorescencia fueron monitorizadas en cada ciclo y los ciclos umbral (Ct) resultantes fueron analizados. La expresión de ARNm en cada grupo experimental fue cuantificada utilizando un sistema de tiempo real CFX96 (Bio-rad, EE. UU.).

Los resultados se muestran en la Figura 8.

Como se muestra en la Figura 8, los niveles de expresión de ARNm de genes (CD36, FATP4 y ApoB48) implicados en la absorción de lípidos en el intestino delgado fueron significativamente más altos en los grupos de dieta alta en grasas (DFH, ERY, GLU y FRU), excepto el grupo PSI, que aquellos en el grupo ND. Los niveles de

expresión de ARNm de genes (CD36, FATP4 y Apo B48) implicados en la absorción de lípidos en el intestino delgado fueron significativamente más bajos en el grupo PSI que en otros grupos de dieta alta en grasas (HFD, ERY, GLU y FRU) y se mantuvieron en los mismos niveles que aquellos en el grupo de dieta normal.

A partir de estos resultados se puede concluir que la D-psicosa redujo la expresión del ARNm de genes implicados en la absorción de lípidos en los intestinos delgados de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas. En conclusión, la D-psicosa tiene un efecto inhibitorio sobre la disponibilidad de lípidos debido a su capacidad para inhibir la absorción de lípidos en el intestino delgado.

Con base en los resultados obtenidos en los Ejemplos 1-8, las funciones de la D-psicosa en el metabolismo de los lípidos en el intestino delgado, los tejidos hepáticos y los tejidos adiposos de ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasas se resumen brevemente en la Figura 9.

La composición de acuerdo con la presente invención se preparó en las siguientes formulaciones.

<u>Ejemplo de preparación 1:</u> Preparación de formulaciones farmacéuticas

1. Preparación de polvos

D-psicosa 200 mg

Lactosa 100 mg

Los ingredientes se mezclaron y se ingresaron en bolsas herméticas para preparar polvos

2. Preparación de comprimidos

D-psicosa 200 mg

Almidón de maíz 100 mg

Lactosa 100 mg

Estearato de Magnesio 2 mg

Los ingredientes se mezclaron uno con el otro y se comprimieron para preparar comprimidos de acuerdo con un método adecuado conocido en la técnica.

3. Preparación de cápsulas

D-psicosa 200 mg

Almidón de maíz 100 mg

Lactosa 100 mg

Estearato de Magnesio 2 mg

Los ingredientes se mezclaron uno con el otro y se ingresaron en cápsulas de gelatina para preparar cápsulas de acuerdo con un método adecuado conocido en la técnica.

4. Preparación de inyectables

D-psicosa 200 mg

Manitol 100 mg

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2 mg

Agua destilada esterilizada para inyección q.s

Los ingredientes se mezclaron uno con el otro en

ampolletas (de 2 ml cada una) para preparar inyectables de acuerdo con un método adecuado conocido en la técnica.

Ejemplo de preparación 2: Preparación de alimentos

Los alimentos que incluyen D-psicosa se prepararon por medio de los siguientes procedimientos:

1. Preparación de salsas para cocinar

Se prepararon salsas para cocinar saludables que incluían el 20-95% en peso de D-psicosa.

2. Preparación de cátsups de jitomate y salsas

Se prepararon cátsups de jitomate y fuentes saludables que incluían el 0.2-1.0% en peso de D-psicosa.

3. Preparación de alimentos de harina

Se añadió 0.5-5.0% en peso de D-psicosa a la harina. La mezcla se usó para preparar panes, pasteles, galletas, galletas saladas y productos de harina saludables.

4. Preparaciones de sopas y salsas espesas

Se añadió 0.1-5.0% en peso de D-psicosa a sopas y salsas espesas para productos procesados de carne y productos de harina saludables.

5. Preparación de carne picada

Se preparó carne picada que incluía el 10% en peso de D-psicosa.

6. Preparación de productos lácteos

Se añadió 5-10% en peso de D-psicosa a la leche. La

mezcla se usó para preparar productos lácteos tales como mantequillas y helados.

Ejemplo de preparación 3: Preparación de bebidas

1. Preparación de bebidas carbonatadas

Se mezcló el 10-15% de D-psicosa, 5-10% de azúcar, 0.05-0.3% de ácido cítrico, 0.005-0.02% de caramelo y 0.1-1% de vitamina. La mezcla se mezcló con el 75-80% de agua purificada para preparar un jarabe. El jarabe se esterilizó a 85-98°C durante 20-180 segundos y se mezcló con agua de refrigeración en una proporción de 1:4. A la mezcla se inyectó el 0.5-0.82% de gas de ácido carbónico para preparar una bebida carbonatada que contenía D-psicosa.

2. Preparación de bebidas saludables

D-psicosa (contenido de sólidos: 2.5%, 97.16%), extracto de azufaifa (65 brix, 2,67%), extracto de complejos de bebida de fruta (contenido sólido: 70%, 0.12%), vitamina C (0.02%), pantotenato de calcio (0.02%) y extracto de regaliz (contenido de sólidos: 65%, 0.01%) fueron mezclados uno con el otro. La mezcla fue homogeneizada, esterilizada instantáneamente y envasada en envases pequeños tales como botellas de vidrio y botellas PET para preparar bebidas saludables.

3. Preparación de jugos de verduras

Se agregaron 0.5 g de D-psicosa a 1,000 ml de un jugo

de jitomate o zanahoria para preparar un jugo de verduras saludable.

4. Preparación de jugos de frutas

Se agregaron 0.1 g de D-psicosa a un jugo de manzana o uva para preparar un jugo de frutas saludable.

Aunque la presente invención se ha descrito aquí con referencia a las modalidades anteriores, los técnicos en la materia entenderán que la invención puede implementarse en otras formas específicas sin cambiar el espíritu o las características esenciales de la invención. Por lo tanto, cabe notar que las modalidades anteriores son meramente ilustrativas en todos los aspectos y no deben interpretarse como limitativas de la invención.

Aplicabilidad industrial

En la presente invención, la actividad fisiológica de la D-psicosa fue aclarada asignando dietas isocalóricas a grupos de dieta para excluir el efecto de la D-psicosa sobre la reducción de calorías. Como resultado, se descubrió que la D-psicosa tiene funciones de inhibir la absorción de lípidos en el intestino delgado y aumenta considerablemente los niveles de lípidos en las heces para inhibir la producción de grasa y reduce el peso corporal, la masa de grasa corporal y los niveles plasmáticos de

lípidos de manera que el peso corporal, la masa grasa corporal y los perfiles de lípidos en plasma se normalizan en poco tiempo. Debido a estas ventajas, se espera que la D-psicosa se use para la prevención y/o tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas con los lípidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la inhibición de la absorción de lípidos ingeridos por un sujeto y/o promoción de la excreción de los lípidos ingeridos, que comprende administrar D-psicosa al sujeto.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la D-psicosa es administrada en una cantidad de 10 a 50 partes en peso, con respecto a 100 partes en peso de los lípidos ingeridos por el sujeto.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la D-psicosa es usada en una cantidad de 10 a 50 partes en peso, con respecto a 100 partes en peso de los lípidos.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la absorción es absorción en el intestino delgado.

5. Uso de una composición que comprende D-psicosa para la reducción de la absorción de lípidos alimentarios y/o promoción de la excreción de lípidos alimentarios.

6. Un inhibidor de la ácido graso sintasa (FAS) que

comprende D-psicosa.

7. Un método para la inhibición de una actividad de la ácido graso sintasa en un sujeto que comprende administrar D-psicosa al sujeto.

8. Un método para la prevención o tratamiento de la hiperlipidemia, la arteriosclerosis o el hígado graso que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de D-psicosa a un sujeto que lo necesite.

9. Una composición para la prevención, mejora o tratamiento de la hiperlipidemia, la arteriosclerosis o el hígado graso, que comprende D-psicosa.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con una composición para la prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas con lípidos. La composición de acuerdo con la presente invención comprende D-psicosa como ingrediente activo. La D-psicosa tiene la capacidad de inhibir la absorción de lípidos en el intestino delgado y aumentar considerablemente los niveles de lípidos en las heces. Debido a su capacidad, la D-psicosa es efectiva para inhibir la formación de grasa corporal. Además, la D-psicosa reduce el peso corporal, la masa de grasa corporal y los lípidos plasmáticos a niveles normales para normalizar el peso corporal, la masa de grasa corporal y los perfiles de lípidos en plasma. Debido a estas ventajas, se espera que la D-psicosa encuentre aplicación en medicamentos farmacéuticos, alimentos funcionales para la salud y alimentos funcionales adecuados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas con los lípidos.