



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 219 171**

② Número de solicitud: 200300433

⑤ Int. Cl.

A23K 1/16 (2006.01)

A61K 31/401 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **21.02.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2004**

Fecha de la concesión: **01.02.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2006**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.03.2006

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado, Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Fuente del Rey, Mónica de la y
Guayervas Valero, Noelia**

⑨ Agente: **No consta**

④ Título: **Utilización de compuestos antioxidantes en el aumento de la longevidad.**

⑤ Resumen:

Utilización de compuestos antioxidantes en el aumento de la longevidad.

La invención consiste en la utilización de compuestos antioxidantes en el aumento de la longevidad de animales prematuramente envejecidos. Para ello, animales clasificados como prematuramente envejecidos o PAM, según la realización de una prueba de exploración en un laberinto en T, se les somete a una dieta suplementada con 0,1% de N-acetilcisteína + 0,1% de Tioprolina. La suplementación tiene una duración de 4 semanas en la edad adulta y otras 4 semanas cuando los animales son viejos. Este tratamiento mejora la función inmunitaria y prolonga la longevidad de los animales envejecidos. La aplicación de esta invención es retrasar los efectos deletéreos del envejecimiento aumentando la esperanza de vida, lo que puede ser detectado por una mejoría en la función inmunitaria.

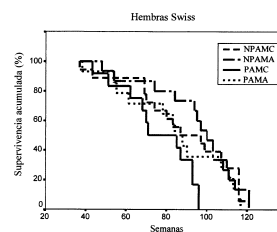


FIGURA 1

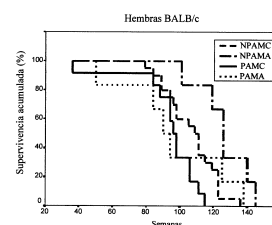


FIGURA 2

ES 2 219 171 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de compuestos antioxidantes en el aumento de la longevidad.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a la utilización de dos compuestos tiólicos con propiedades antioxidantes en un modelo murino de envejecimiento prematuro, de tal forma que se trata de conseguir un aumento en la longevidad de estos animales a través del efecto positivo que tienen estos compuestos en sistemas funcionales del organismo como el sistema inmunitario, sistema nervioso, etc.

Estado de la técnica

El envejecimiento es un proceso biológico inevitable que afecta a la mayoría de los organismos vivos. Dada la complejidad del proceso de envejecimiento, que tiene lugar en todos los niveles de organización biológica y está controlado por múltiples factores genéticos y medioambientales, no puede sorprender que se hayan propuesto numerosas teorías para explicar las alteraciones que se producen en los diversos niveles investigados. Según Medvedev se han publicado cerca de 300 teorías del envejecimiento, aunque la mayoría ya sólo tienen un valor histórico (Medvedev Z.A. *Biol Rev.* 65: 375-398. 1990). La teoría de los radicales libres en el envejecimiento, propuesta por primera vez por Harman en 1956 (Harman D. *J Gerontol.* 11: 298-300. 1956.), es una de las más relevantes para explicar el proceso del envejecimiento. Según Harman, los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) son los responsables del daño ocasionado a nivel celular y tisular asociado al envejecimiento. Los ROS tienen una elevada reactividad y todos los tipos de biomoléculas pueden ser dianas de los mismos, manifestando las consecuentes alteraciones (Gracy R.W., Talent J.M., Kong Y., Conrad C.C. *Mutat Res.* 428: 17-22. 1999). No obstante, dado que la fuente celular más importante y generalizada de ROS es la mitocondria, parece evidente que sea ésta la diana más directa e inmediata de sus acciones. El daño que producen las ROS en esta organela origina la destrucción de la misma, y si la mitocondria no puede regenerarse, hecho que sucede en las células postmitóticas, éstas manifestarán la pérdida mitocondrial con una falta de capacidad energética que lleva a su envejecimiento y muerte, y consecuentemente a la del individuo (Miquel J., Economos A.C., Fleming J., Johnson J.E. *Exp Gerontol.* 15: 575-591. 1980. Miquel J.; Fleming J.E. "Free radical aging and degenerative diseases" New York. pp:51-74. 1986; Miquel, J. *Exp Gerontol.* 33: 113-126. 1998; Sastre J., Pallardó F.V., García de la Asunción J., Viña J. *Free Rad Res.* 32: 189-198. 2000).

Ante esta toxicidad del oxígeno, las células han desarrollado una serie de defensas antioxidantes que impiden la formación de radicales o neutralizan a los mismos una vez generados. No obstante, estos sistemas defensivos no son perfectos y cuando la producción de ROS supera la de las defensas antioxidantes se produce un estrés oxidativo (Sies H. *Angewandte Chemie.* 25: 1058-71. 1986). Por tanto el funcionamiento de nuestro organismo se basa en un perfecto equilibrio entre niveles de pro-oxidantes y de antioxidantes, y es la pérdida de este equilibrio, por un exceso en la producción de los primeros o una menor disponibilidad de los segundos, lo que conlleva al estrés oxidativo que subyace a la enfermedad y al envejecimiento (Wei, Y.H.; Lee, H.C., *Exp Biol Med.* 227: 671-682. 2002). El *glutathion* es el principal antioxidante de la célula que disminuye considerablemente con la edad (Nuttall SL., Martín U., Sinclair AT., Kendall M.J. *Lancet* 351: 645-646. 1998). El cociente entre el *glutathion* oxidado (GSSG) y el reducido (GSH) es un indicador del grado de estrés oxidativo de la célula (Sastre J. 2000, cit). El uso del *glutathion* o de aportadores del mismo como la N-acetilcisteína y Tioprolina, reduciendo el estrés oxidativo modulan la tasa de envejecimiento y aumentan la longevidad.

El sistema inmunitario es un claro ejemplo de la necesidad de mantener el equilibrio oxidantes/antioxidantes para conservar el estado de salud, ya que para llevar a cabo gran parte de sus funciones requiere la producción de ROS, siendo los leucocitos activados una fuente importante de oxidación (Goldstone S.D., Hunt N.H. *Biochim Biophys Acta* 1355:353-360.1997; Knight J.A. Review. *Ann Clin Lab Sci.* 30: 145-157. 2000). Además, hay que tener presente que las células inmunitarias son particularmente sensibles a la oxidación dado el alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que tienen en sus membranas y la expresión génica que requieren en su labor defensiva. Por ello, si en cualquier célula del organismo es importante preservar el mencionado equilibrio, más lo es en las células de nuestro sistema defensivo (Meydani S.N., Wu D., Santos M.S., Hayek M. *Am J Clin Nutr.* 62: 1462S-1476S. 1995). Al envejecer, el sistema inmunitario se ha tenido que enfrentar a numerosos agentes extraños, lo que ha creado un desgaste de su equilibrio oxidantes/antioxidantes a favor de los primeros, dándose un estrés oxidativo crónico que, dado el papel que juega el sistema inmunitario en la salud y longevidad de los individuos contribuiría de forma determinante en la morbilidad y mortalidad de la población. Un hecho ilustrativo es que los individuos que sobrepasan los ochenta años y los que llegan a centenarios con buena salud son los que tienen una funcionalidad de sus células inmunitarias perfectamente conservada y semejante a la de los adultos (Franceschi C., Monti D., Sansoni P., Cossarizza A. *Immunol Today* 16: 12-16. 1995., Vallejo C. Evaluación de la influencia de programas de actividad física sobre el sistema inmunitario en los ancianos. Tesis Doctoral. 2001). En este contexto parece evidente que la administración de antioxidantes podría ser una intervención racional para combatir el estrés oxidativo y con ello retardar el envejecimiento y prolongar la longevidad.

Numerosos grupos de investigación, (Hernanz A.; Collazos, M.E.; De la Fuente M. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 91: 166-170. 1990; Meydani S.N. 1995, cit; De la Fuente M., Carazo M., Correa R., Del Río M. *Brith J Nutr.* 84: 25-29. 2000) han comprobado que los antioxidantes son necesarios y se utilizan para llevar a cabo una adecuada función de nuestro sistema.

Esto explicaría, tanto en animales de experimentación como en el ser humano, la mejoría de la capacidad funcional del sistema inmunitario, en la edad adulta, tras la incorporación *in vitro* o la suplementación *in vivo* con diferentes antioxidantes exógenos como la vitamina C, la vitamina E, el glutatión (GSH) y tioles como la tioprolina o la N-acetilcisteína (Del Río M., Ruedas G., Medina S., Víctor V.M., De La Fuente M.. *Life Sci.* 63: 871-881.1998; Blanco B., Ferrández MD., Correa R., Del Río M., Guaza C., De la Fuente M.. *Biofactors* 10: 179:185. 1999; De la Fuente M., 2000 cit.; Meydani S.N.; Erickson K.L.. *FASEB J*, 15: 2555. 2001). Si consideramos que al envejecer se producen mayores niveles de ROS junto a frecuentes estados de malnutrición y una clara disminución de los niveles de defensas antioxidantes (McArthur W.P. *Periodontology* 2000 16: 53-79. 1998; Meydani M., Lipman R.D., Han S.N., Wu D., Beharka A., Martin K.R., Bronson R.; Cao G.; Smith D., Meydani S.N. *Ann NY Acad Sci.* 854: 352-360. 1998) parece evidente que la suplementación con este tipo de compuestos podría tener un efecto beneficioso en la neutralización de dicho estrés oxidativo, consiguiéndose el equilibrio oxidantes/antioxidantes perdido. Por tal motivo, se han efectuado una serie de trabajos encaminados a comprobar si la administración de antioxidantes podría tener un efecto estimulador de la funcionalidad de nuestro sistema defensivo durante la vejez, habiéndose obtenido hasta el momento resultados muy prometedores al potenciarse el estado de salud y evitándose muchas de las patologías derivadas del estrés oxidativo (De la Fuente M., Ferrández M.D., Del Río M., Burgos S., Miquel J.. *Mech Ageing Dev.* 104: 213-225. 1998; Meydani M.. *Mech Ageing Dev.* 111: 123-132. 1999; Serafini M.. *Int J Devl Neurosci.* 18: 401-410. 2000). Precisamente, una de las observaciones que más acreditan la teoría oxidativa del envejecimiento es la comprobación del aumento en la esperanza de vida de algunos animales de laboratorio tras la ingestión de ciertos antioxidantes en la dieta (Miquel J., Economos A.C.. *Exp Gerontol.* 14: 279-85. 1979).

En estudios previos se ha demostrado el papel protector sobre el Sistema Inmunitario de estos antioxidante tiólicos. Así, una suplementación en la dieta con 0,07% de Tioprolina administrada a ratones cronológicamente viejos durante 24 y 37 semanas mejoró la función linfocitaria (De la Fuente M., Ferrández M.D., Muñoz F., De Juan E., Miquel J.. *Mech. Ageing Dev.* 68: 27-36. 1993; De la Fuente M., Miquel J.. *Rev. Esp Geriatr. Gerontol.* 29: 246-251. 1994). Resultados obtenidos (De la Fuente M., 1998. cit.) indican que incluso con un tratamiento de 5 semanas en ratones viejos se produce una estimulación significativa de las capacidades de movilidad, proliferativa y citotóxica de los linfocitos en cuanto a la N-acetilcisteína, recientemente se ha observado que una suplementación durante 5 semanas al 0,1% mejora las funciones de los macrófagos y linfocitos peritoneales de animales prematuramente envejecidos (Puerto M., Guayerbas N., Víctor V.M., De la Fuente M. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73: 797-804. 2002). La mezcla de ambos antioxidantes administrada al 0,1% de cada antioxidante durante 5 semanas aumentó la función inmunitaria de ratones adultos (Guayerbas N., Puerto M., Ferrández M.D., De la Fuente M.. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29: 1009-1014. 2002; Blanco B.1999, cit). Esta concentración resultó menos efectiva en animales viejos, siendo la de 0,3% la que tuvo mayor efecto (De la Fuente M., Miquel J., Catalán MP., Víctor VM., Guayerbas N.. *Free Rad Res.* 36: 119-126. 2002). Sobre estos estudios transversales se propuso en un estudio longitudinal, administrar en animales prematuramente envejecidos la mezcla de ambos antioxidantes al 0,1% durante dos etapas de la vida, en la edad adulta y en la vejez y así poder relacionar la mejoría en el Sistema Inmunitario con una mayor supervivencia.

En estudios previos a esta invención, se ha desarrollado un modelo murino para determinar el envejecimiento prematuro basado en el diferente comportamiento en una prueba comportamental, el laberinto en forma de T, de ratones de una misma población y edad. A los animales que realizaban peor el test se les denominó PAM (“prematurely-ageing mice”) y se les diferenció de aquellos que llevaban a cabo satisfactoriamente la prueba, NPAM (“non prematurely-ageing mice”). Los animales que realizan peor la prueba, los PAM, tienen una mayor edad biológica, esto es un envejecimiento prematuro, lo que manifiestan con un sistema inmunitario más envejecido, unos niveles de ansiedad e hiperemocionalidad mayores, una peor coordinación neuromuscular, una neuroquímica cerebral correspondiente a una mayor edad y una menor longevidad (De la Fuente M., 1998 cit.; Viveros M.P., Fernández B., Guayerbas N., De la Fuente M.. *J Neuroimmunol.* 114: 80-8. 2001. Guayerbas N., Puerto M., Víctor V.M., Miquel J., De la Fuente M. *Exp Gerontol.* 37: 249-256. 2002; Guayerbas N.; Catalán M., Víctor V.M.; Miquel, J., De la Fuente M.. *Behav Brain Res.* 134: 41-48. 2002).

Con esta invención se consigue prolongar la longevidad de los animales biológicamente envejecidos, mediante la utilización conjunta de dos compuestos antioxidantes.

Descripción de la invención

Utilización de compuestos antioxidantes en el aumento de la longevidad.

La invención consiste en la utilización conjunta de compuestos antioxidantes en el aumento de la longevidad de animales prematuramente envejecidos. Se basa en el efecto de dos compuestos antioxidantes tiólicos, N-acetilcisteína y Tioprolina, sobre la longevidad de ratones caracterizados como prematuramente envejecidos según el modelo murino que sirve para determinar el envejecimiento prematuro basado en una prueba comportamental en el laberinto en forma de T.

Según los antecedentes expuestos, el uso que se especifica de estos dos compuestos de manera conjunta no se ha llevado a cabo previamente en ningún otro trabajo experimental.

En primer lugar se valora la capacidad exploratoria espontánea del animal en el laberinto en forma de T. El test se lleva a cabo cuatro veces en semanas alternativas y transcurrido este tiempo se clasifica a los animales en NPAM (aquellos que realizan el test en menos de 20 segundos el 100% de las veces) y PAM (aquellos que realizan el test en

más de 20 segundos el 100% de las veces) el resto de los animales que no cumplen estas condiciones se descartan. La prueba se realiza bajo luz roja. Los animales clasificados como PAM presentan un sistema inmunitario más envejecido, unos niveles de ansiedad e hiperemocionalidad mayores, una peor coordinación neuromuscular, además de una neuroquímica cerebral similar a edades cronológicamente más avanzadas. Todas estas alteraciones se relacionan con una menor longevidad (De la Fuente M. 1998, cit; Viveros M.P. 2001, cit. Guayerbas N. 2002, cit; Guayerbas N. 2002, cit).

El siguiente paso es la suplementación en la dieta con los dos antioxidantes tiólicos, N-acetilcisteína y Tioprolina a una concentración de 0,1% peso/peso de cada uno. La suplementación tiene una duración de 4 semanas en la edad adulta y otras 4 semanas cuando los animales son viejos. Simultáneamente se estudia un grupo de animales control que no reciben tratamiento con antioxidantes.

Se estudiaron tanto en los animales controles como en los tratados de 60 semanas de edad las etapas que constituyen el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales, éstas son la capacidad de adherencia, quimiotaxis, eficacia fagocítica y producción de anión superóxido. Todas estas funciones mejoraron tras el tratamiento con 0,1% de NAC + 0,1% de TP respecto a los valores controles hasta alcanzar valores de adultos de 32 semanas.

A continuación se determina la supervivencia media y máxima tras el seguimiento de los animales y se somete a un tratamiento estadístico donde se observa el efecto de la suplementación de la dieta con N-acetilcisteína y Tioprolina sobre la supervivencia de los animales.

La suplementación en la dieta con 0,1% de N-acetilcisteína más 0,1% de Tioprolina aumenta la supervivencia media tanto en los animales clasificados como PAM como en los denominados NPAM. El mayor efecto se aprecia en los animales PAM en los que aumenta entre 3 y 18 semanas. La supervivencia máxima también resultó aumentada.

Explicación de los dibujos

La invención se ilustra con los siguiente dibujos:

La Figura 1 representa la curva de supervivencia (expresada en semanas) de los ratones hembras de la cepa Swiss. Cada línea representa la supervivencia acumulada en porcentaje de cada grupo experimental: NPAMC (NPAM controles, alimentados con dieta estándar); NPAMA (NPAM tratados con 0,1% de NAC + 0,1% de Tioprolina); PAMC (PAM controles, alimentados con dieta estándar); PAMA (NPAM tratados con 0,1% de NAC + 0,1% de Tioprolina).

La Figura 2 representa la curva de supervivencia (expresada en semanas) de los ratones hembras de la cepa BALB/c. Cada línea representa la supervivencia acumulada en porcentaje de cada grupo experimental: NPAMC (NPAM controles, alimentados con dieta estándar); NPAMA (NPAM tratados con 0,1% de NAC + 0,1% de Tioprolina); PAMC (PAM controles, alimentados con dieta estándar); PAMA (NPAM tratados con 0,1% de NAC + 0,1% de Tioprolina).

La Figura 3 representa el cociente GSSG/GSH (expresado, tanto el glutatión oxidado (GSSG) como el reducido (GSH), en $\mu\text{moles}/10^6$ células) obtenido en las células peritoneales de los ratones hembras de la cepa Swiss. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en la comparación entre animales controles y tratados con 0,1% de N-acetilcisteína + 0,1% de Tioprolina dentro de cada grupo.

La Figura 4 representa el cociente GSSG/GSH (expresados, tanto el glutatión oxidado (GSSG) como el reducido (GSH), en $\mu\text{moles}/10^6$ células) obtenido en las células peritoneales de los ratones hembras de la cepa BALB/c. *** $p < 0,01$ en la comparación entre animales controles y tratados con 0,1% de N-acetilcisteína + 0,1% de Tioprolina dentro de cada grupo. $^{\$}p < 0,05$ en la comparación entre NPAM y PAM.

Modo de realización de la invención

La presente invención sobre la utilización de compuestos antioxidantes en la prolongación de la longevidad de animales previamente envejecidos, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

En este caso los animales escogidos fueron ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa albina OF-1 Swiss. A las 16 ± 2 semanas se les sometió a la prueba del laberinto en T por primera vez. Este aparato consta de tres brazos de madera recubiertos por la cara interna de una superficie de metacrilato negra. Las dimensiones de cada brazo son: 10 cm de ancho, 25 cm de largo y 10 cm de alto. El suelo se compone de barritas cilíndricas de aluminio de 3 mm de grosor dispuestas perpendicularmente a la pared de cada brazo.

La prueba se lleva a cabo situando al animal en el brazo "vertical" del laberinto mirando hacia el extremo del brazo. El desarrollo de la prueba se evalúa determinando con un cronómetro el tiempo que tarda el animal en cruzar con sus patas traseras la intersección de los tres brazos. Se dan 60 segundos para realizar la prueba. Tras realizar cuatro veces la prueba se clasificó a los animales en NPAM y PAM según el procedimiento descrito. La población de animales se dividió para tener un grupo tratado con antioxidantes y otro grupo control. De las 29 hasta las 32 semanas y de las 75-

ES 2 219 171 B1

79 semanas se les suministró galletas suplementadas con 0,1% de N-acetilcisteína más 0,1% de Tioprolina o galletas controles. Para ello se prepararon galletas con el pienso estándar (PANLAB) de mantenimiento previamente molido al que se le añadió la correspondiente cantidad de cada antioxidante en polvo. A la mezcla se le añadió agua destilada en la proporción 1,5 agua/2 pienso. Se formó una masa compacta a la cual se le dio la forma de galleta cuadrada y se la dejó secar a temperatura ambiente durante 3 días. Paralelamente se prepararon galletas control sin el suplemento de los antioxidantes. Se dispusieron 200 gr de comida por cada 5 animales/jaula.

En este ejemplo el número de animales que se tenían era el siguiente:

- 10 18 animales clasificados como NPAMC (NPAM controles)
- 12 animales clasificados como PAMC (PAM controles)
- 15 8 animales clasificados como NPAMA (NPAM tratados con antioxidantes)
- 14 animales clasificados como PAMA (PAM tratados con antioxidantes)

Tras el seguimiento de los animales se obtuvo la gráfica de supervivencia que se representa en la Figura 1.

Las supervivencias medias que se obtuvieron en cada grupo fueron las siguientes:

- NPAMC: 89,44 semanas
- NPAMA: 93,63 semanas
- 25 PAMC: 76,25 semanas
- PAMA: 84 semanas

Y las supervivencias máximas fueron:

- NPAMC: 121 semanas
- NPAMA: 121 semanas
- 35 PAMC: 96 semanas
- PAMA: 117 semanas

40 Ejemplo 2

En este caso los animales escogidos fueron ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c. La clasificación y el tratamiento de los animales es exactamente igual que en el ejemplo 1. Excepto en el inicio del tratamiento con los antioxidantes que fue de las 32 hasta las 35 semanas y de las 56 hasta las 59 semanas.

En este ejemplo el número de animales que se tenían era el siguiente:

- 20 animales clasificados como NPAMC (NPAM controles)
- 50 12 animales clasificados como PAMC (PAM controles)
- 6 animales clasificados como NPAMA (NPAM tratados con antioxidantes)
- 6 animales clasificados como PAMA (PAM tratados con antioxidantes)

Tras el seguimiento de los animales se obtuvo la gráfica de supervivencia que se representa en la Figura 2.

Las supervivencias medias que se obtuvieron en cada grupo fueron las siguientes:

- 60 NPAMC: 106,8 semanas
- NPAMA: 126,17 semanas
- PAMC: 93,83 semanas
- 65 PAMA: 96,83 semanas

ES 2 219 171 B1

Y las supervivencias máximas fueron:

NPAMC: 136 semanas

5 NPAMA: 145 semanas

PAMC: 115 semanas

10 PAMA: 138 semanas

Ejemplo 3

En este caso los animales escogidos fueron ratones hembras de la cepa BALB/c. La clasificación de los animales es exactamente igual que en el ejemplo 1. De las 56 hasta las 59 semanas los animales se alimentaron con una dieta enriquecida con 0,1% de N-acetilcisteína + 0,1% de Tioprolina. Paralelamente se disponía de un grupo alimentado con dieta estándar. Tras las cuatro semanas de tratamiento se extrajeron muestras de la suspensión peritoneal de los animales sin necesidad de sacrificarlos. En los macrófagos peritoneales se valoraron las etapas que constituyen el proceso fagocítico de estas células: la capacidad de adherencia a sustrato tisulares, la capacidad de migración hacia un gradiente químico o quimiotaxis, la capacidad de fagocitosis de partículas de látex, y la destrucción del material fagocitado mediante la producción del radical anión superóxido. Los resultados de la Tabla 1, indican que el tratamiento mejoró estas funciones manifestándose en una disminución de la capacidad de adherencia y producción extracelular del anión superóxido (dos funciones que aumentan significativamente al envejecer), y en un aumento de la quimiotaxis y de la eficacia fagocítica (dos actividades que disminuyen al envejecer). Estos efectos se observaron principalmente en los animales PAM. Los animales tratados presentaban valores similares o muy parecidos a los de animales controles adultos de 32 semanas de edad. Esto significa que la ingestión de la dieta suplementada con los antioxidantes “rejuveneció” la función inmunitaria.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se representan las etapas del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales de ratones hembras BALB/c a las 60 semanas de edad alimentados con una dieta control (NPAMC y PAMC) y con una dieta suplementada con 0,1% de N-acetilcisteína + 0,1% de Tioprolina (NPAMA y PAMA). Como controles de edad se han incluido ratones adultos de 32 semanas. Los resultados se expresan en medias \pm desviación estándar de los valores obtenidos del número de animales supervivientes en el momento de la experimentación. La adherencia se expresa en porcentaje de células adherentes, la quimiotaxis se expresa en el número de células que han migrado, la eficacia fagocítica es el porcentaje de macrófagos que han fagocitado partículas de látex y la producción extracelular de anión superóxido se expresa en nmoles/10⁶ células. *p < 0,05; **p < 0,01 respecto al correspondiente control.

TABLA 1

Proceso fagocítico de hembras BALB/c

	NPAMC	NPAMA	PAMC	PAMA	NPAMC adultos (32 sem)	PAMC adultos (32 sem)
Adherencia	52 \pm 8	46 \pm 5	65 \pm 4	44 \pm 5**	47 \pm 12	49 \pm 7
Quimiotaxis	169 \pm 58	427 \pm 18**	157 \pm 36	274 \pm 60*	554 \pm 103	303 \pm 46
E. fagocítica	32 \pm 5	47 \pm 7*	15 \pm 1**	43 \pm 6	33 \pm 9	34 \pm 9
Superóxido extracelular	37 \pm 3	19 \pm 4**	59 \pm 8	31 \pm 1**	22 \pm 8	42 \pm 8

55 Ejemplo 4

En este caso los animales escogidos fueron ratones hembras de las cepas Swiss y BALB/c. La clasificación de los animales es exactamente igual que en el ejemplo 1. El tratamiento con los antioxidantes se llevó a cabo de la semana 29 a la 32 de vida y se valoró la relación GSSG/GSH, cociente que nos indica el grado de estrés oxidativo celular. Los resultados representados en la Figura 3 (cepa Swiss) y Figura 4 (cepa BALB/c) indican que el tratamiento con 0,1% de N-acetilcisteína + 0,1% de Tioprolina disminuye significativamente este cociente en ambas cepas de ratones y principalmente en los animales prematuramente envejecidos.

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de compuestos antioxidantes en la preparación de un compuesto alimentario para aumentar la longevidad, **caracterizado** porque los compuestos antioxidantes tiólicos utilizados conjuntamente son la N-acetilcisteína y la Tioprolina.

10 2. Utilización de compuestos antioxidantes en la preparación de un compuesto alimentario para aumentar la longevidad, según reivindicación 1, donde los dos compuestos antioxidantes tiólicos se suministran con la dieta, a una concentración de 0,1% peso/peso, durante 4 semanas.

15 3. Utilización de compuestos antioxidantes en la preparación de un compuesto alimentario para aumentar la longevidad, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el compuesto alimentario está formado por una masa tras añadir 150ml de agua destilada a 200 gr. de pienso molido a la cual se le da la forma de galleta cuadrada y se la deja secar a temperatura ambiente preferentemente durante 3 días.

20 4. Utilización de compuestos antioxidantes en la preparación de un compuesto alimentario para aumentar la longevidad, **caracterizado** porque la dieta suplementaria de las reivindicaciones 2 y 3 se administra en animales prematuramente envejecidos y animales no prematuramente envejecidos.

25 5. Uso, según reivindicación anterior, donde los animales son clasificados mediante el modelo murino basado en una prueba comportamental en el laberinto en forma de T.

30 6. Uso, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque produce una disminución de la capacidad de adherencia y producción extracelular del anión superóxido, y un aumento de la quimiotaxis y de la eficacia fagocítica.

35 7. Uso, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque produce una disminución del cociente GSSG/GSH que indica el grado de estrés oxidativo celular.

30

35

40

45

50

55

60

65

Hembras Swiss

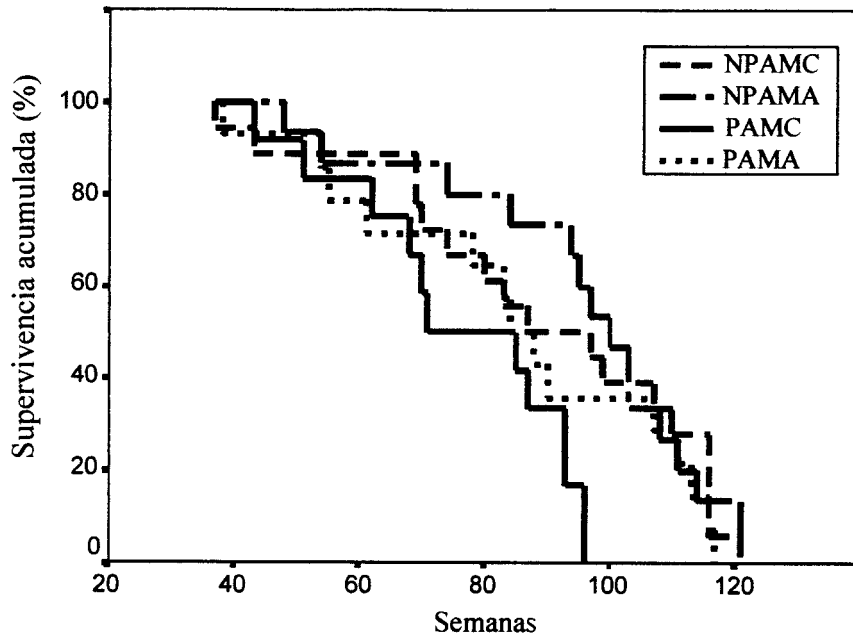


FIGURA 1

Hembras BALB/c

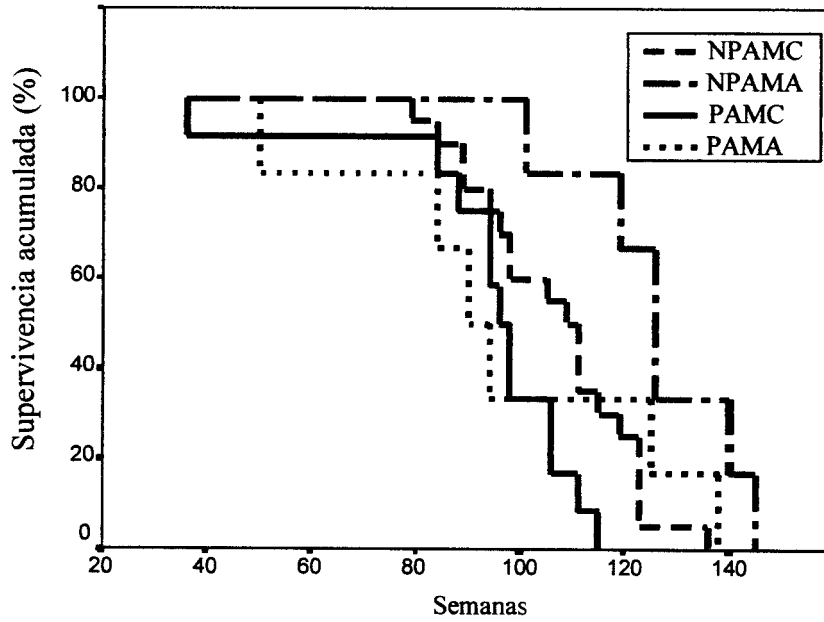


FIGURA 2

GSSG/GSH

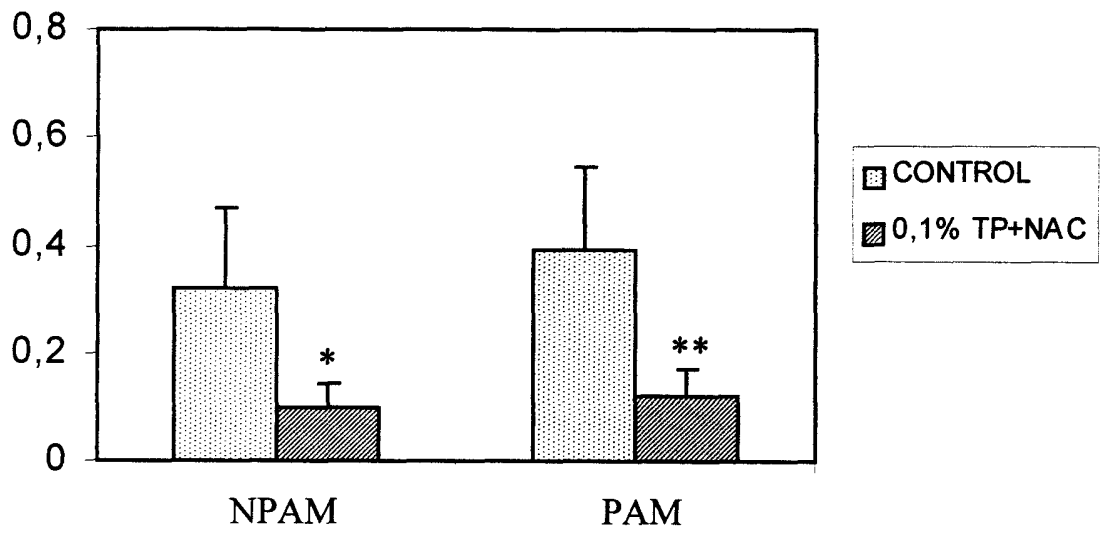


FIGURA 3

GSSG/GSH

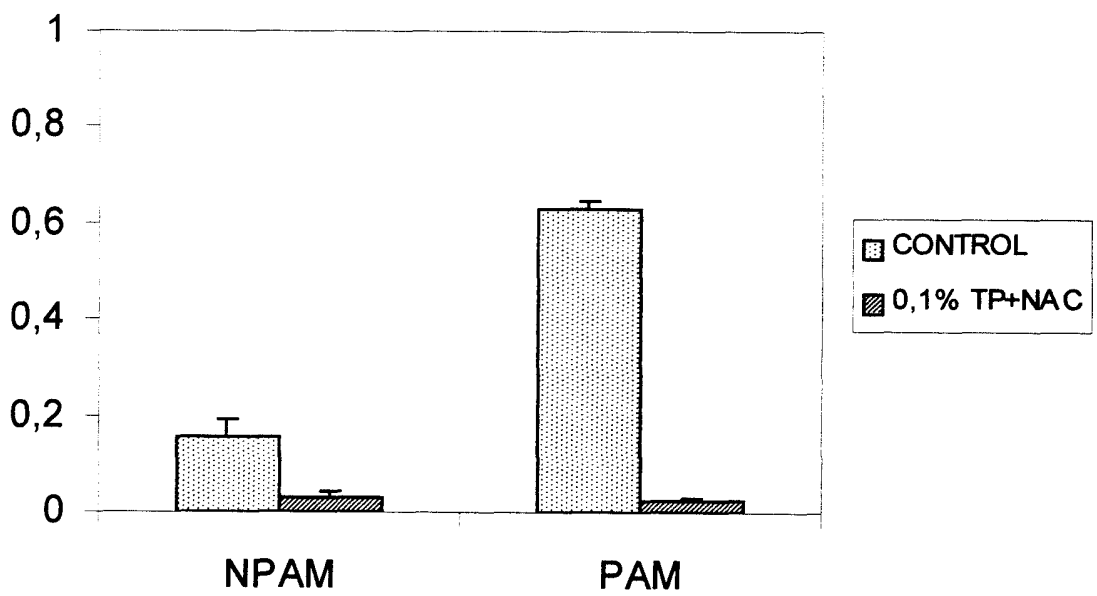


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 219 171

② Nº de solicitud: 200300433

③ Fecha de presentación de la solicitud: 21.02.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A23K 1/16, A61K 31/401, 31/198

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DE LA FUENTE, M. et al.: "Enhancement of leukocyte function in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline", Mechanisms Ageing Develop., (1998), Vol. 104, páginas 213-225, todo el documento, en particular, resumen; página 215, primer párrafo; página 223, último párrafo.	1-7
X	GUAYERBAS, N. et al.: "A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice", Clin. Exper. Pharmacol. Physiol., (2002), Vol. 29, páginas 1009-1014, todo el documento, en particular, página 1013, último párrafo.	1-7
X	MIQUEL, J.: "Envejecimiento y salud", Geriatrika, (1996), Vol. 12, nº 9, páginas 429-434, todo el documento, en particular, página 433, último párrafo.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.09.2004

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1