



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 628**

51 Int. Cl.:

A23L 1/305 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06777068 .5**

96 Fecha de presentación : **25.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1919304**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la integridad vascular funcional, la supervivencia celular y la reducción de la apoptosis después de un episodio isquémico en el cerebro.**

30 Prioridad: **26.08.2005 US 711547 P**
26.08.2005 US 711549 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2011

73 Titular/es: **NESTEC S.A.**
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es: **Pan, Yuanlong y**
Larson, Brian

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 365 628 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para mejorar la integridad vascular funcional, la supervivencia celular y la reducción de la apoptosis después de un episodio isquémico en el cerebro.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la nutrición de mamíferos y efectos de la misma sobre la potenciación de la integridad vascular y la protección contra los daños celulares asociados con la isquemia o un episodio de isquemia en el cerebro. En particular, la presente invención utiliza combinaciones de compuestos que liberan óxido nítrico, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, y opcionalmente otros ingredientes incluyendo antioxidantes, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento y vitaminas B, administrados como parte de una dieta regular, para mejorar la integridad vascular, promover la supervivencia celular y con ello reducir la lesión isquémica en el cerebro y/o otros órganos, por ejemplo, en la eventualidad de una isquemia cerebral.

10

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Varias publicaciones, incluyendo patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos eruditos, se citan a lo largo de la especificación.

20

La lesión cerebral isquémica hipóxica, se produce como resultado de un suministro disminuido de oxígeno al cerebro debido a una reducción pasajera o permanente o taponamiento del flujo de sangre al cerebro. La isquemia del cerebro da como resultado un ataque con la subsiguiente apoptosis y necrosis del tejido cerebral, lo cual conduce a un infarto. Similarmente a la isquemia cardiovascular, la isquemia cerebral puede ser causada por varios factores como por ejemplo coágulos de sangre, trombosis, embolias, bloqueo por placas ateroscleróticas u otras obstrucciones vasculares. La hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes, la obesidad, entre otros factores, han sido identificados como factores de riesgo para los ataques isquémicos. Los ataques isquémicos son una causa desencadenante de muerte de los seres humanos en todo el mundo y afectan también a otros animales, incluyendo los animales de compañía.

25

30

Las lesiones sistémicas son también conocidas por contribuir de manera importante al envejecimiento del cerebro y a la demencia. La demencia es una importante enfermedad que afecta a la población de más edad. La incidencia de la demencia aumenta desde 0,3 hasta el 1% en personas de 60 años hasta 64 años y en un 50%, en personas mayores de 95 años con un predominio doble cada 5 años (Mc Dowell, I, *Aging (Milano)* 13: (2001) 143-162). En las poblaciones del oeste, la enfermedad de Alzheimer (AD) se considera la forma más importante de demencia, mientras que la demencia vascular (VD) parece ser la forma predominante en las poblaciones del este (Fratiglioni, L. et al., *Drugs Aging* (1999) 15: 365-375; Ott, A., et al., *The Rotterdam Study, BMJ* (1995) 310: 970-973). Una evidencia creciente indica que la demencia vascular y la enfermedad de Alzheimer a menudo coexisten en la población con demencia. Por ejemplo, Kalaria (*Neurobiol Aging* (2000) 21: 321-330) informa que aproximadamente el 90% de pacientes con AD tienen una patología cerebrovascular y aproximadamente un 30% de pacientes VD tienen una patología AD. La coexistencia de una lesión cerebrovascular y AD en la población con demencia prematura fue confirmado por Snowden et al., (*J. Am. Med. Soc.* (1997) 277: 813-817). Además, el sello del diagnóstico patológico del AD (de posición amiloide, y ovillos neurofibrilares) se determinó que existía en las personas de edad sin demencia (Snowdon et al., 1997, *supra*). Estos datos sugieren que la deposición amiloide y los ovillos neurofibrilares no son suficientes para causar la demencia en los pacientes de AD, destacando la importante contribución de las lesiones isquémicas del cerebro al envejecimiento del cerebro, y el desarrollo y progresión tanto de la VD como del AD (Korczyn, A. J. *Neurol. Sci.* (2005) 230: 3-6). Por lo tanto, la prevención de la lesión cerebral inducida por la isquemia y la apoptosis de las neuronas en los humanos y animales puede retrasar el envejecimiento del cerebro, reducir el riesgo de discapacidad cognitiva, y retrasar la progresión de la demencia.

35

40

45

50

La isquemia puede producirse en cualquier tejido, pero está más comúnmente asociada con las lesiones cerebrales, cardíacas o renales. Como ya se ha descrito más arriba, la isquemia en el cerebro puede causar una lesión grave, por ejemplo, apoplejía, o discapacidad crónica como por ejemplo la demencia y las condiciones afines. En el corazón, los episodios isquémicos pueden dar como resultado una insuficiencia cardíaca; de manera similar puede dar por resultado una insuficiencia renal a partir de episodios isquémicos en el riñón.

55

Durante la apoplejía o episodios isquémicos del cerebro o cualquier otro tejido, tienen lugar reacciones bioquímicas en el sistema vascular que pueden conducir a edemas, transformación hemorrágica, y un peligro más en el tejido afectado, por ejemplo neurológico. Como tal, el tratamiento y la protección del sistema vascular ha sido identificado como una vía potencial para explorar el ataque isquémico agudo con el fin de desarrollar nuevas terapias. Además, la protección vascular tiene implicaciones para reducir la lesión del tejido que se produce como resultado de un episodio isquémico.

60

El endotelio vascular se ha demostrado que sirve para varias funciones reguladoras, incluyendo la modulación del tono vascular, la inflamación, y la homeostasis por mantenimiento de una superficie no adhesiva, antitrombocítica. (Boak, L., et al., *Cur. Vasc, Pharmacol.* (2004) 2:45-52). La homeostasis vascular es en parte una función de la

65

contracción y de la relajación del músculo liso vascular, la cual está mediada por una variedad de factores, incluyendo el radical libre óxido nítrico (NO), el cual es un fuerte relajante del músculo liso vascular.

El NO se produce por tres diferentes maneras: mediante las enzimas NO sintasa (NOS), mediante las NOS neuronales (nNOS), las cuales se localizan primordialmente en el tejido nervioso y generan NO para la neurotransmisión; las NOS inducibles (iNOS), las cuales se encuentran primordialmente en macrófagos y puede responder a mediadores pro inflamatorios; y NOS endoteliales (eNOS), las cuales se producen por las células endoteliales como por ejemplo las que se encuentran en el endotelio vascular (Michel, T., et al., *J. Clin. Invest.* (1927) 100: 2146-2152, Moncada, S., et al., *Pharmacol. Rev.* (1991) 43: 109-142, y Nathan, C. (1992) *FASEB J* 6: 3051-3064). El NO liberado por las eNOS juega un papel importante en la vasodilatación, proliferación del músculo liso, regulación de la presión sanguínea arterial, y tiene efectos anticoagulantes y antiinflamatorios mediante la inhibición de plaquetas y adhesión de leucocitos y agregación. (Gewaltig, M.T., et al., *Cardiovasc. Res.* (2002) 55:250-260, De Graaf, J.C. et al. *Circulation* (1992) 85:2284-2290, Freedman, J.E., et al. *Circ. Res.* (1999) 84:1416-1421, Furchgott, R.F., et al. *FASEB J* (1989) 3:2007-2018, Gaboury, J., et al. *Am J Physiol. Heart. Circ. Physiol.* (1993) 265: H862-H867, and, Kubes, P., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88: 4651-4655). Una disminución en la producción de NO durante una isquemia prolongada ha sido asociada con una lesión endotelial (Laude, L., et al. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (2001) 34:1-7).

Las enzimas NOS oxidan la L- arginina en citrulina, dando por resultado la formación de NO como subproducto. De esta forma se ha sugerido que la suplementación con precursores de NO como por ejemplo la L- arginina, puede mejorar la salud vascular, y puede facilitar la reparación de estados de enfermedades vasculares. Efectivamente la suplementación con arginina de la dieta ha sido demostrado que induce la restauración de la vasodilatación y mejora la circulación coronaria en modelos animales y pacientes humanos con hipercolesterolemia, así como mejora también la función endotelial en general, en pacientes con la enfermedad de la arteria coronaria (Boak, L., et al., 2004). Además, la suplementación con L-arginina se ha demostrado también que aumenta los niveles de NO y atenúa la lesión miocárdica mediada por los radicales libres de O₂ en pacientes humanos (Kiziltepe, U., et al., *Int. J. Cardiol.* (2004) 97:93-100). Estudios más recientes han mostrado que la suplementación con arginina facilita la reparación endotelial en el intestino de ratas seguido de reperusión isquémica intestinal inducida (Sukhotnik, I., et al, *Pediatr. Surg. Int.* (2005) 3:191-196). De esta forma, la administración de precursores de NO como la L- arginina, tiene implicaciones para la activación y protección celular, especialmente con respecto a las células endoteliales vasculares.

Los ácidos grasos se ha demostrado también que modulan la activación de la célula endotelial. La administración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) se descubrió que inhibía la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales vasculares (Khalfoun, B., et al. *Transplantation* (1996) 62:1649-1657). Subsiguientes investigaciones determinaron que la administración de LCPUFA reduce la expresión de las células endoteliales de moléculas de adhesión y citocinas en respuesta a la estimulación, sugiriendo que los LCPUFA tienen propiedades antiheterogénicas y antiinflamatorias. (De Caterina R., et al., *Am. J. Clin. Nutr.* (2000) 71 (supl) 213S-223S) . La evidencia creciente indica que el consumo regular de LCPUFA, en particular los ácidos grasos n-3, protege el sistema cardiovascular, reduce la formación de placas ateroscleróticas y reduce el riesgo de mortalidad de la enfermedad cardiovascular, particularmente a continuación de un infarto de miocardio. (Calder, P.C. *Clin. Sci. (Lond)*. 2004 107: 1-11). En cambio, ha sido poca la investigación del efecto de los LCPUFA de la dieta sobre el sistema vascular y el tejido del cerebro, en particular con respecto a un episodio isquémico en el cerebro.

Se sabe desde hace tiempo que el estrés oxidativo y la lesión está involucrada en el proceso de envejecimiento. Se ha demostrado que el estrés oxidativo juega también un papel en la patogénesis de un número de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y ciertas formas de demencia (por ejemplo, Smith, M.A., *Dementia & Geriatric Cognitive Disorders* ("Demencia y trastornos cognitivos geriátricos") (1999), vol. 10, supl. 1). En consecuencia la suplementación con antioxidantes ha sido empleada para retrasar el proceso de envejecimiento y proteger contra los efectos degenerativos del estrés oxidativo. De manera similar, el ácido fólico de las vitaminas B, la vitamina B-6, y la vitamina B-12, son importantes para el bienestar y el normal funcionamiento del cerebro. El estatus de estas vitaminas es frecuentemente inadecuado en los ancianos, y estas inadecuaciones pueden dar por resultado una hiperhomocisteinemia, un factor de riesgo recientemente identificado para la aterosclerosis (Temple ME, et al., *Ann. Pharmacother* 2000; 34: 57-65; Hankey GJ, et al., *Lancet* 1999; 354: 407-413) y la enfermedad de Alzheimer (Clarke R, et al., *Arch. Neurol.* 1998 55:1449-1455). Estas inadecuaciones pueden dar por resultado una isquemia del cerebro u otros tejidos por vía de la enfermedad vascular oclusiva, apoplejía, o trombosis.

La patente DE 10214005 describe una composición que comprende 5-15 g de pectina y/o guar y 1-3 g de EPA/DHA en un ratio preferido de 2 a 3, con lo cual los ácidos grasos omega-3 están estabilizados contra la oxidación con la vitamina C. y/o la vitamina E, y antes de mezclarse con pectina/guar, se saborizan con caramelo o vainilla. La composición descrita puede incluir también 5 g de arginina. El documento describe que los ácidos grasos omega-3 tienen un efecto positivo sobre la presión de la sangre, arritmia cardíaca, infarto cardíaco, riesgo de apoplejía, arteriosclerosis, y sobre las enfermedades inflamatorias como por ejemplo, el reumatismo, la psoriasis, la artrosis, la celitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn.

La patente US 2002/0182196 se refiere a una composición y método para la normalización de la función neurológica afectada o deteriorada. El documento describe que las funciones neurológicas afectadas o deterioradas se manifiestan por una variedad de condiciones que abarcan un espectro de estados de disfunción del sistema nervioso. Ejemplos no limitativos de dichas condiciones incluyen el deterioro de la memoria, ciertos problemas de comportamiento, trastorno del déficit de atención (ADD), trastorno de hiperactividad del déficit de atención (ADHD), otras faltas de atención y/o síndromes de hiperactividad, demencia o declinación cognitiva de múltiples etiologías, varios trastornos genéticos (por ejemplo, síndrome de Down, síndrome X de fragilidad, etc.), trauma del sistema nervioso central (CNS), intoxicaciones (agudas y crónicas) o envenenamiento, mecanismos autoinmunes, condiciones anóxico-isquémicas, trastornos neurodegenerativos, trastornos metabólicos del sistema nervioso, trastornos vasculares, encefalopatía hipertensiva, trastornos reológicos, desmielinación, edema cerebral, condiciones neuronales inflamatorias, problemas de aprendizaje, comportamiento impulsivo, problemas emocionales específicos o problemas del estado de ánimo, funcionamiento dificultoso bajo presión, condiciones latrogénicas varias, infecciones, focos eleptogénicos y malformaciones congénitas del cerebro.

15 El documento describe que la composición contiene cantidades efectivas de:

(A) por lo menos un agente que promueve la síntesis de trifosfatos de adenosina (ATP) y/o fosfato de creatina en el cuerpo;

20 (B) por lo menos un antioxidante para el barrido de radicales libres por lo menos en una vía corporal;

(C) por lo menos un agente para la normalización o mantenimiento del funcionamiento de la membrana y la estructura en el cuerpo;

25 (D) por lo menos un agente para la normalización o mantenimiento del funcionamiento normal del neurotransmisor en el cuerpo;

(E) por lo menos un agente para la acción reguladora de la cortisona hacia abajo; y

30 (F) por lo menos un agente para suprimir la activación de las vías apoptóticas en el cuerpo, con posible inclusión de uno o más de los siguientes:

(G) por lo menos un agente para suprimir la inflamación en el cuerpo,

35 (H) por lo menos un agente para normalizar o mantener la función de la pared vascular y la estructura en el cuerpo;

(I) por lo menos un agente para normalizar o mantener la función de los factores de crecimiento nervioso y/o de los factores neurotrópicos en el cuerpo;

40 (J) por lo menos un agente para suprimir los efectos tóxicos de los iones metálicos;

(K) por lo menos un agente para normalizar o mantener el metabolismo del metilo en el cuerpo;

45 (L) por lo menos un agente para la normalización o mantenimiento del metabolismo de la insulina y de la glucosa en el cuerpo; y

(M) por lo menos un agente para la actividad máxima reguladora de las proteínas del shock térmico en el cuerpo.

50 Los apartados (B) y (H) pueden incluir arginina, y

El apartado (C) puede incluir ácido gamma linoléico y LCPUFAS poliinsaturados superiores, como por ejemplo el DHA

55 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona empleos y composiciones para emplear como se define en las reivindicaciones del apéndice. Se describen aquí composiciones que comprenden uno o más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) y uno o más compuestos que liberan óxido nítrico (NORC) en una cantidad efectiva para la potenciación de la integridad vascular, por ejemplo en el cerebro, y/o la reducción de la apoptosis en un animal. La integridad vascular potenciada por ejemplo del cerebro, y/o la supervivencia celular sirve para reducir la lesión isquémica en los tejidos, por ejemplo el cerebro, en la eventualidad de un episodio isquémico.

65 En ciertas versiones, la composición es una composición alimenticia para animales domésticos, un suplemento de la dieta, o un producto alimenticio formulado para el consumo humano. En varias versiones los LCPUFA incluyen por lo

menos un ácido araquidónico, un ácido eicosapentaenoico, un ácido docosapentaenoico o un ácido docosahexaenoico, y los NORC incluyen por lo menos una L- arginina o derivados de la misma. Las composiciones pueden comprender ingredientes adicionales. Por ejemplo, pueden incluirse uno o más antioxidantes, vitaminas B, factores de crecimiento celular, o agentes antiinflamatorios.

5 En ciertas versiones, las composiciones están formuladas para animales de compañía, como por ejemplo un perro o un gato. En otras versiones, las composiciones están formuladas para el consumo humano.

10 Se describen en la presente métodos para la potenciación de la integridad vascular y o para la reducción de la lesión cerebral inducida por la isquemia en un animal, los cuales comprenden la administración al animal, sobre una base regular, de una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC, opcionalmente suplementada con ingredientes adicionales como se ha descrito más arriba, en una cantidad efectiva para potenciar la integridad vascular en el (los) tejido(s) del animal y/o reducir la lesión cerebral inducida por la isquemia en la eventualidad de un episodio isquémico en el cerebro del animal. En ciertas versiones, el método se aplica a un animal de compañía como por ejemplo un perro o un gato. En otras versiones, el método se aplica a los humanos.

15 En ciertas versiones, la administración regular de la composición al animal da como resultado una reducción de la lesión cerebral en el caso de un episodio isquémico en el cerebro del animal. En otra versión, la administración regular de la composición al animal da como resultado una reducción en la apoptosis celular en el lugar del animal en donde se ha producido la isquemia, el cual puede ser cualquier tejido incluyendo el cerebro, el corazón y el riñón.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes con referencia a los dibujos, por la descripción detallada y por los ejemplos que siguen:

25 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Gráfica de barras que muestra el efecto del control y las dietas de prueba sobre el volumen de una lesión isquémica en todas las ratas sujetas a isquemia cerebral transitoria. Las composiciones del control y las dietas de ensayo están descritas en el ejemplo 1 (*p < 0,01 frente al control).

30 **Figura 2.** Gráfica de barras que muestra el efecto de las dietas de control y de prueba sobre el volumen de la lesión isquémica en ratas que presentan lesiones después de una isquemia cerebral transitoria. Las composiciones de las dietas de control y de prueba están descritas en el ejemplo 1 (*p < 0,01 frente al control).

35 **Figura 3.** Gráfica de barras que muestra el efecto de las dietas de control y de prueba sobre la apoptosis cerebral inducida por la isquemia en ratas. Las composiciones de las dietas de control y de prueba están descritas en el ejemplo 1 (*p<0,001 frente al control).

40 **Figura 4.** Gráfica que muestra la correlación entre el volumen de la lesión isquémica (eje de las X) y el porcentaje de células apoptóticas como se ha definido en el tinte de TUNEL (eje de las Y) en ratas sujetas a isquemia cerebral transitoria. Las composiciones de las dietas de control y de prueba están descritas en el ejemplo 1.

DESCRIPCION DETALLADA DE VERSIONES ILUSTRATIVAS

Definiciones

45 En el transcurso de la especificación y de las reivindicaciones se emplean una variedad de términos relacionados con los métodos y otros aspectos de la presente invención. Estos términos tienen el significado ordinario que se les da en la técnica a no ser que se indique otra cosa. Otros términos específicamente definidos deben ser interpretados de una manera consistente con la definición que se proporciona aquí.

50 Las siguientes abreviaturas pueden emplearse en la especificación y en los ejemplos: AA, ácido araquidónico; ALA, ácido alfa-linolénico; ANOVA, análisis de la varianza; DHA, ácido docosahexaenoico; DM, materia seca; DPA, ácido docosapentaenoico; EPA ácido eicosapentaenoico; LA ácido linoleico; LCPUFA, ácido graso poliinsaturado de cadena larga; NORC, compuestos de liberación de óxido nítrico; L-Arg, L- arginina.

55 Dentro del contexto de esta especificación el término "aproximadamente" se interpreta que significa opcionalmente más o menos el 20%, con más preferencia opcionalmente más o menos el 10%; todavía con más preferencia opcionalmente más o menos el 5%, con la mayor preferencia opcionalmente más o menos el 2%.

60 "Cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto, material, o composición como se ha descrito en la presente, que es efectiva para lograr un resultado biológico en particular. Dichos resultados incluyen, pero no están limitados a, la potenciación de la integridad vascular o la reducción de la lesión cerebral isquémica. Esta actividad efectiva puede lograrse, por ejemplo, mediante la administración de las composiciones de la presente invención al animal.

65

El término "integridad vascular", se refiere a la salud total de los vasos sanguíneos en un animal, incluyendo, sin limitación, el tono y la estructura vascular saludable, el crecimiento vascular saludable, la constricción saludable y la dilación, la baja permeabilidad, la baja proliferación, la baja inflamación, la baja adhesión de células y/o plaquetas, el mantenimiento de una presión sanguínea normal, y un flujo sanguíneo, y similares. "Integridad vascular potenciada" se refiere a cualquier mejora de la salud total de los vasos sanguíneos en un animal, medida por cualquier medio adecuada de la técnica.

Como se emplea en la presente, "ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga" ó "LCPUFA" se refiere a cualquier ácido monocarboxílico que tiene por lo menos 20 átomos de carbono y por lo menos dos dobles enlaces. Ejemplos no limitativos de LCPUFA incluyen ácidos grasos (n-6) como el ácido araquidónico, y ácidos grasos (n-3) como el ácido eicosapentaenoico, el ácido docosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico.

Como se emplea en la presente, la expresión "compuestos que liberan óxido nítrico" ó "NORC" se refiere a cualquier compuesto que ocasiona la liberación de óxido nítrico libre en un animal. Ejemplos preferidos de tales compuestos incluyen la L- arginina y análogos o derivados de la L- arginina como por ejemplo, el alfa-quetoglutarato de arginina, GEA 3175, el nitroprusido de sodio, el trinitrato de glicerilo, la S-nitroso-N-acetil-penicilamina, la nitroglicerina, el S-NO-glutation, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos conjugados con NO, como por ejemplo, el NO-naproxeno, la NO-aspirina, el NO-ibuprofeno, el NO-diclofenaco, el NO-flurbiprofeno y el NO-quetoprofeno, el compuesto 7 liberador de NO, el compuesto 5 liberador de NO, el compuesto 12 liberador de NO, el compuesto 18 liberador de NO, los diolatos de diazenio y derivados del mismo, NONOato de dietilamina o cualquier compuesto orgánico o inorgánico, biomoléculas, o análogos, homólogos, conjugados, o derivados de los mismos, que ocasionan la liberación de óxido nítrico libre en un animal.

El término "isquemia" se refiere a cualquier disminución o interrupción en el suministro de sangre a cualquier órgano corpóreo, tejido, o parte del cuerpo, causada por cualquier constricción u obstrucción del sistema vascular. "Episodio isquémico" se refiere a cualquier período transitorio o permanente de isquemia.

"Sistema vascular" se refiere a cualquier red de vasos sanguíneos en el cuerpo de un animal, incluyendo los vasos sanguíneos sin limitación, las arterias, las venas, y los capilares.

"Células endoteliales vasculares" o "endotelio vascular" se refiere a las células que comprende la capa de células planas finas que se alinean en la superficie interior de los vasos sanguíneos, formando una interfaz entre la sangre que circula en el lumen y el resto de la pared del vaso.

La presente invención se refiere a cualquier animal, de preferencia un mamífero, con más preferencia animales de compañía y con más preferencia los seres humanos. Un "animal de compañía" es cualquier animal domesticado, e incluye sin limitación, gatos, perros, conejos, cobayas, hurones, hamsters, ratones, jerbos, caballos, vacas, cabras, corderos, burros, cerdos, y similares.

Como se emplea en la presente el término "pienso para animal doméstico" o "composición de pienso para animal doméstico" significa una composición que se pretende sea ingerida por un animal y de preferencia por animales de compañía. Un "pienso para animal doméstico equilibrado nutricionalmente y completo", es un pienso que contiene todos los nutrientes requeridos conocidos en cantidades apropiadas y proporciones basado en las recomendaciones de reconocidas autoridades en el campo de la nutrición de los animales de compañía, y como consecuencia es capaz de servir como única fuente de ingesta dietética para mantener la vida o promover la producción, sin la adición de fuentes nutritivas suplementarias. Las composiciones de pienso para animales domésticos equilibradas nutricionalmente están ampliamente conocidas y ampliamente empleadas en la técnica.

Como se emplea en la presente, un "suplemento dietético" es un producto que se pretende que se ingiera adicionalmente a la dieta normal de un animal.

Como se emplea en la presente, "un producto alimenticio formulado para el consumo humano" es cualquier composición que se pretenda que sea ingerido por un humano.

Descripción

Los inventores observaron que la arginina como suplemento para los perros aumentaba la expresión de múltiples factores de crecimiento y proteínas antiinflamatorias de manera dependiente de la dosis. Muchos de estos factores de crecimiento, incluyendo el NGF, el nIGF, y el BDNF tienen potentes efectos protectores neuronales. (Mattson, MP et al. Neurobiol. Aging (2002) 23:695-705, y Kruttgen, A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:9614-9619). En posteriores investigaciones de perros empleando fuentes naturales de arginina incluyendo la comida de arenques (conteniendo aceite de pescado rico en LCPUFA), los inventores descubrieron una respuesta igual o mejor que la observada empleando L- arginina pura. Como se describe en detalle en los ejemplos de la presente, los estudios funcionales de isquemia cerebral transitoria en un modelo de rata ovariectomizada, mostró que una dieta conteniendo una combinación de L-arginina, aceite de pescado, antioxidantes, y vitaminas B reducían marcadamente las lesiones cerebrales y la apoptosis más que las dietas conteniendo arginina o aceite de pescado

solo. En consecuencia varios aspectos de la presente invención utilizan estos descubrimientos proporcionando composiciones dietéticas y métodos para mejorar la integridad vascular de un animal y reducir la lesión isquémica en el episodio de isquemia en el animal, por ejemplo una lesión cerebral en el caso de una isquemia cerebral en el animal.

5 Las composiciones dietéticas se espera que sean efectivas en una variedad de situaciones isquémica, incluyendo pero sin estar limitadas por, el envejecimiento cerebral (apoplejías y mini apoplejías) y trastornos afines, episodios cardíacos isquémicos, isquemia inducida y la cirugía de reperfusión (administración pre y post operatoria) isquemia periférica inducida por la diabetes, y como alternativa al tratamiento con estrógenos de la post menopausia, para
10 reducir el riesgo de apoplejía y enfermedad cardiovascular en las mujeres post menopáusicas.

En varias versiones, las composiciones y los métodos de la presente invención, aplican un método de multi-componentes para la mejora de la integridad vascular funcional, la reducción de la apoptosis y la potenciación de la supervivencia celular después de un episodio isquémico. Estos componentes incluyen (1) potenciación de la
15 integridad y la función vascular, (2) potenciación de la reparación celular, (3) mejora de los efectos antiinflamatorios (4) optimización del metabolismo celular, y (5) reducción del estrés oxidativo.

Composiciones

20 En la presente se describen composiciones que comprenden uno o más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) y uno o más compuestos que liberan óxido nítrico (NORC) en una cantidad efectiva para la potenciación de la integridad vascular en los animales. Los LCPUFA y NORC pueden estar presentes en la composición como un ingrediente o aditivo. En versiones preferidas de la composición, los LCPUFA comprenden por lo menos uno de los ácidos grasos (n-3) como por ejemplo el ALA, EPA, DPA y DHA, y los NORC comprenden por
25 lo menos uno de los L-Arg y derivados de los mismos. Las composiciones enriquecen el plasma sanguíneo con LCPUFA y NORC en aquellos animales a los cuales se administra la composición.

Las composiciones de la invención pueden incluir un número de componentes adicionales con el propósito de proporcionar un método de multi-componentes para promocionar la integridad vascular y la potenciación de la supervivencia celular en la isquemia como se ha indicado más arriba. Estos incluyen antioxidantes, vitaminas B,
30 factores de crecimiento y agentes antiinflamatorios.

En una versión preferida, las composiciones de la invención son composiciones de piensos para animales domésticos. Estos incluirán ventajosamente los piensos que se pretenden para el suministro de los requerimientos dietéticos necesarios, así como también golosinas (por ejemplo, galletas) u otros suplementos dietéticos. Opcionalmente, las composiciones de un pienso para animal doméstico pueden ser una composición seca (por ejemplo croquetas), una composición semi-húmeda, una composición húmeda o cualquier mezcla de los mismos.

En otra versión preferida, las composiciones de la invención son productos alimenticios formulados para el consumo humano. Estos incluirán ventajosamente alimentos y nutrientes que pretenden suministrar los necesarios requerimientos dietéticos de un ser humano así como también otros suplementos dietéticos humanos. En una versión detallada, los productos alimenticios formulados para el consumo humano están completamente y nutricionalmente equilibrados.

En otra versión preferida, la composición es un suplemento dietético, como por ejemplo una salsa, agua potable, una bebida, un concentrado líquido, un yogur, un polvo, un granulado, una pasta, una suspensión, un chiclet, un bocado, una golosina, un bocadillo, una pastilla, una píldora, una cápsula, un comprimido o cualquier otra forma de suministro. Los suplementos dietéticos pueden formularse especialmente para el consumo de un animal particular como por ejemplo un animal de compañía, o un ser humano. En una versión detallada el suplemento dietético puede comprender una alta concentración de LCPUFA y NORC de forma que el suplemento pueda administrarse al animal en pequeñas cantidades, o alternativamente puede ser diluido antes de la administración a un animal. El suplemento dietético puede requerir el ser mezclado con agua antes de ser administrado al animal.

La composición puede estar en forma congelada. Los LCPUFA y NORC pueden ser premezclados con otros componentes de la composición para proporcionar las cantidades beneficiosas necesarias, puede ser revestido sobre una composición de un pienso animal, un suplemento dietético o un producto alimenticio formulado para el consumo humano, o puede añadirse a la composición antes de ser ofrecido al animal, como por ejemplo, empleando un polvo o una mezcla.

Las composiciones de la invención comprenden LCPUFA y NORC en una cantidad efectiva para potenciar la integridad vascular en un animal al cual ha de ser administrada la composición. Para piensos animales y productos alimenticios formulados para el consumo humano, la cantidad de LCPUFA en tanto por ciento de la composición está en el margen de aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 13% de la composición sobre la base de materia seca, aunque puede ser suministrado un porcentaje mayor. En varias versiones las cantidades aproximadamente de un 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%,

1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7%, 3,8%, 3,9%, 4,0%, 4,1%, 4,2%, 4,3%, 4,4%, 4,5%, 4,6%, 4,7%, 4,8%, 4,9%, 5,0%, ó más, por ejemplo, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13% ó más, de la composición sobre la base de materia seca, y la cantidad de NORC como un tanto por ciento de la composición están en el margen de aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente un 12% de la composición sobre la base de materia seca, aunque puede ser suministrado en un tanto por ciento superior. En varias versiones, la cantidad es aproximadamente de un 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7%, 3,8%, 3,9%, 4,0%, 4,1%, 4,2%, 4,3%, 4,4%, 4,5%, 4,6%, 4,7%, 4,8%, 4,9%, 5,0%, ó más, por ejemplo, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, ó más, de la composición sobre la base de materia seca. En una versión específica se emplea un 2-2,5% de LCPUFA y un 2-2,5% de L-arginina pura. Pueden formularse suplementos dietéticos para contener concentraciones varias veces más altas de LCPUFA y NORC, fáciles de administrar al animal en forma de un comprimido, cápsula, concentrado líquido, u otra forma de dosificación similar, o ser diluido antes de las administraciones, como por ejemplo por disolución en agua, por dilución con agua, pulverización o aspersión sobre un pienso para animales domésticos, y otros modos de administración similares.

En una versión alternativa, la cantidad de LCPUFA y NORC en la composición es función de la cantidad requerida para establecer una concentración especificada de LCPUFA y NORC en el suero sanguíneo del animal. La concentración especificada de LCPUFA en el suero sanguíneo puede calcularse, determinando los niveles en suero sanguíneo de animales alimentados con las cantidades recomendadas de LCPUFA y NORC especificadas más arriba, como puede ser apreciado por un experto en la técnica.

Las fuentes de cada uno de los LCPUFA puede ser cualquier fuente adecuada, sintética o natural. Las fuentes preferidas de LCPUFA incluyen, sin limitación, las primulas, los vegetales de color verde oscuro como por ejemplo las espinacas, las algas, y las algas azul-verde como por ejemplo la espirulina, semillas vegetales y aceites como por ejemplo las semillas de lino, el canol, las habas de soja, la nuez, la calabaza, el cártamo, el sésamo, el germen de trigo, el girasol, el maíz, y el cáñamo, y los peces, especialmente los peces de agua fría como por ejemplo el salmón, el atún, la caballa, el arenque, la lubina, la lubina rayada, el tiburón, el mero, el pez gato, las sardinas, los camarones y las almejas, y sus aceites extraídos, o bien los LCPUFA pueden sintetizarse *de novo* de acuerdo con cualquier medio adecuado de la técnica.

Las fuentes de cada NORC pueden ser cualquier fuente adecuada, sintética o natural. Fuentes preferidas de arginina incluyen sin limitación, proteínas animales y vegetales. Ejemplos no limitativos de vegetales particularmente ricos en contenido de arginina incluyen vegetales como la soja, los altramuces y las algarrobas, granos como por ejemplo el trigo y el arroz, y frutos como por ejemplo la uva. Las semillas y nueces como por ejemplo el cacao y los cacahuets son también ricos en contenido de arginina. Ejemplos no limitativos de proteínas animales particularmente ricas en contenido de arginina incluyen los productos de las aves de corral y del pescado. Los NORC pueden ser sintetizados *de novo*, de acuerdo con cualquier medio adecuado de la técnica, o proporcionados por una fuente comercial.

Las composiciones de la invención pueden comprender opcionalmente sustancias suplementarias como por ejemplo, minerales, vitaminas, sales, condimentos, colorantes, y conservantes. Ejemplos no limitativos de minerales suplementarios incluye el calcio, el fósforo, potasio, sodio, el hierro, el cloruro, el boro, el cobre, el zinc, el magnesio, el manganeso, el yodo, el selenio y similares. Ejemplos no limitativos de vitamina suplementarias incluyen la vitamina A, varias vitaminas B, la vitamina C, la vitamina D, la vitamina E y la vitamina K. Suplementos dietéticos adicionales pueden ser también incluidos, por ejemplo, la niacina, el ácido pantoténico, la inulina, el ácido fólico, la biotina, los aminoácidos, y similares.

Las composiciones de la invención pueden opcionalmente comprender una o más sustancias suplementarias que promueven o mantienen la salud vascular, o además potencian la integridad vascular o la supervivencia celular. Dichas sustancias incluyen sin limitación, una o más de la vinpocetina, la coenzima Q₁₀, la fosfatidilserina, la acetil-L-carnitina, los ácidos alfa-lipoicos, extractos como por ejemplo el Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) o antioxidantes, incluyendo los tocoferoles, los tocotrienoles, los carotinoides como por ejemplo el alfa-y beta-caroteno, el licopeno, la luteína, la astaxantina, la zeaxantina y los flavonoides como por ejemplo, los flavanoles, las flavanonas, las flavonas, los flavan-3-oles. (catequinas), las antocianinas, las isoflavonas (isoflavonoides), y similares, así como también agentes antiinflamatorios y factores de crecimiento (particularmente aplicables para promover la supervivencia celular) como sería entendido por un experto en la técnica.

En varias versiones, los piensos para animales domésticos o suplementos dietéticos de composiciones de la invención pueden comprender sobre la base de materia seca, desde aproximadamente un 15% hasta aproximadamente un 50% de proteína cruda, en peso de la composición. El material de proteína cruda puede comprender proteínas vegetales como por ejemplo el haba de soja, la semilla de algodón, y el cacahuete, o proteínas animales como por ejemplo la caseína, la albúmina y la proteína de carne. Ejemplos no limitativos de proteína de carne para utilizar en la presente, incluyen el cerdo, el cordero, los equinos, las aves de corral, el pescado y mezclas de los mismos.

Las composiciones pueden comprender además, sobre la base de la materia seca, desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 40% de grasa, en peso de la composición. Las composiciones pueden comprender además una fuente de hidratos de carbono. Las composiciones pueden comprender, sobre una base de materia seca, desde aproximadamente un 15% hasta aproximadamente un 60% de hidratos de carbono, en peso de la composición. Ejemplos no limitativos de estos hidratos de carbono incluyen granos o cereales como por ejemplo, el arroz, el maíz, el sorgo, la alfalfa, la cebada, las habas de soja, la canola, la avena, el trigo, y mezclas de los mismos. Las composiciones pueden comprender también opcionalmente otros materiales como por ejemplo el suero de leche de vaca seco y otros subproductos lácteos.

Las composiciones pueden comprender también por lo menos una fuente de fibras. Una variedad de fibras solubles o insolubles puede ser utilizada como ya es conocido por los expertos en la técnica. La fuente de fibras puede ser pulpa de remolacha (remolacha de azúcar), goma arábiga, goma talha, psyllium, salvado de arroz, goma de habas de algarrobo, pulpa de citrus, pectina, fructooligosacárido adicional a la oligofructosa de cadena corta, mananoligofructosa, fibra de soja, fibra de altramuces, arabinogalactano, galactooligosacárido, arabinosilano o mezclas de los mismos. Alternativamente, la fuente de fibras puede ser una fibra fermentable. Una fibra fermentable ha sido previamente descrita para proporcionar un beneficio al sistema inmunológico de un animal de compañía. La fibra fermentable u otras composiciones conocidas por los expertos en la técnica proporcionan una composición prebiótica para potenciar el crecimiento de microorganismos probióticos dentro del intestino, y puede también ser incorporada en la composición para ayudar a la potenciación del beneficio proporcionado por la presente invención al sistema inmunológico de un animal. Adicionalmente, los microorganismos probióticos como por ejemplo las especies *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, por ejemplo pueden añadirse a la composición.

En una versión detallada, la composición es un pienso para animales domésticos completo y equilibrado nutricionalmente. En este contexto, el pienso para animales domésticos puede ser pienso húmedo, un pienso seco o un pienso con un contenido intermedio de humedad, como sería reconocido por los expertos en la técnica de formulación y fabricación de piensos para animales domésticos. "Pienso húmedo" se refiere a un pienso para animales domésticos, que se vende típicamente en latas o bolsas de papel, y tiene un contenido en humedad típicamente en el margen de aproximadamente un 70% hasta aproximadamente un 90%. "Pienso seco" se refiere a un pienso para animales domésticos que es de una composición similar al pienso húmedo, pero contiene un contenido limitado de humedad, típicamente en el margen desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 15%, y por lo tanto se presenta por ejemplo como pequeñas croquetas similares a galletas. Las composiciones y los suplementos dietéticos pueden ser especialmente formulados para animales adultos, o para animales más viejos o jóvenes, por ejemplo, un "pienso de cachorro" "pienso de gatito" o una formulación "senior". En general, las formulaciones especializadas comprenderán la energía y los requerimientos nutricionales apropiados para animales en diferentes estados de desarrollo o edad.

Ciertos aspectos de la invención se emplean de preferencia en combinación con un alimento completo y equilibrado (por ejemplo como se ha descrito en el National Research Council ("Consejo Nacional de Investigación"), 1985, Nutritional Requirements for Dogs ("Requerimientos nutritivos para perros"), National Academy Press, Washington D.C. ó Association of American Feed Control Officials ("Asociación de controles americanos oficiales de alimentación"), Official Publication 1996). Es decir, las composiciones que comprenden LCPUFA ó DHA de acuerdo con ciertos aspectos de esta invención se emplean de preferencia con un pienso comercial de alta calidad. Como se emplea en la presente, "un pienso comercial de alta calidad" se refiere a una dieta manufacturada para producir la digestibilidad de los nutrientes del 80% ó más, como se ha mencionado por ejemplo en las recomendaciones del National Research Council de más arriba para perros. Similares estándares de altos nutrientes se emplearían para otros animales.

Las personas expertas comprenderán de qué manera se determina la cantidad apropiada de LCPUFA y NORC que hay que añadir a una composición determinada. Dichos factores que pueden ser tenidos en cuenta incluyen el tipo de composición (por ejemplo, una composición para pienso de animales domésticos, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para consumo humano), el consumo medio de los tipos específicos de composiciones por diferentes animales y las condiciones de fabricación, con las cuales se prepara la composición. De preferencia, las concentraciones de LCPUFA y NORC que hay que añadir a la composición, se calculan sobre la base de las necesidades de energía y nutrición del animal. De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, los LCPUFA y NORC pueden añadirse en cualquier momento de la fabricación y/o del procesado de la composición. Esto incluye, sin limitación, como parte de la formulación de la composición del pienso para animales domésticos, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para consumo humano o como un revestimiento aplicado a la composición del pienso para animales domésticos, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para consumo humano.

Las composiciones pueden hacerse de acuerdo con cualquier método adecuado en la técnica como por ejemplo el descrito en el Waltham Book of Dog and Cat Nutrition ("Libro Waltham de nutrición de perros y gatos"), editorial ATB Edney, capítulo por A. Rainbird, titulado "Una dieta equilibrada" en las páginas 57 a 74, Pergamon Press Oxford.

Métodos

Se describen en la presente, métodos para la potenciación de la integridad vascular y/o la promoción de la supervivencia celular en un animal, los cuales comprenden la administración al animal de una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC, en una cantidad efectiva para la potenciación de la integridad vascular y/o promover la supervivencia celular en el animal. Todavía otro aspecto de la invención caracteriza métodos profilácticos para la reducción de la lesión inducida por la isquemia al cerebro u otros tejidos de un animal, los cuales comprenden la administración al animal, sobre una base regular, de una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC en una cantidad efectiva para reducir la lesión inducida por la isquemia, por ejemplo al cerebro, en la eventualidad de un episodio isquémico en el animal, por ejemplo, en el cerebro del animal.

En versiones detalladas de cualquiera de los dos aspectos más arriba mencionados de la invención, la composición es una composición de pienso para animales domésticos, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para el consumo humano como se ha ejemplificado en la presente. En otra versión detallada los LCPUFA son uno o más de un LCPUFA (n-3), incluyendo pero sin limitar, el EPA, DPA y DHA, y el NORC es uno o más de L-Arg y derivados del mismo. Los animales pueden incluir cualquier animal domesticado o de compañía como se ha descrito más arriba o pueden incluir los humanos. En ciertas versiones, el animal es un animal de compañía como por ejemplo un perro o un gato. En otra versión el animal es un humano.

Las composiciones pueden ser administradas al animal por cualquiera de las varias rutas alternativas de administración. Dichas rutas incluyen, sin limitación, la ruta oral, la intranasal, la intravenosa, la intramuscular, la intragástrica, la transpilórica, la subcutánea, la rectal, y similares. De preferencia las composiciones se administran por vía oral. Como se emplea en la presente, el término "administración oral" o bien "administrar oralmente" significa que el animal ingiere o un humano recibe la indicación de alimentarse o alimenta al animal con una o más de las composiciones de la invención descritas en la presente.

Cuando el humano recibe la indicación de alimentarse con la composición, dicha indicación puede ser que instruya y/o informe al humano que el empleo de la composición puede y/o quiere proporcionar el beneficio referenciado, por ejemplo la potenciación de la integridad vascular en el animal o la supervivencia celular en el animal, la reducción de la lesión inducida por la isquemia, por ejemplo al cerebro, al corazón y a otros tejidos, protección de la lesión relacionada con la isquemia en la eventualidad de un episodio isquémico, por ejemplo en la cirugía por reperfusión, la isquemia periférica inducida por la diabetes y otros, como se ha mencionado más arriba. Esta indicación puede ser una indicación oral (por ejemplo a través de una instrucción oral, por ejemplo por un médico, veterinario, u otro profesional de la salud o por medio de la radio o de la televisión (es decir, anuncios) o puede ser una indicación escrita (por ejemplo, a través de una indicación escrita por ejemplo por un médico, por un veterinario o por otro profesional de la salud (por ejemplo, prescripciones), por un profesional de ventas o de organización (por ejemplo a través de folletos de marketing, panfletos, u otra parafernalia instructiva), medios escritos (por ejemplo internet, correo electrónico, u otros medios relacionados con el ordenador), y/o en el envasado asociado con la composición (por ejemplo, una etiqueta presente sobre el envase que contiene la composición).

La administración puede efectuarse sobre una base en función de las necesidades o en función de los deseos, por ejemplo una vez mensualmente, una vez semanalmente, una vez diariamente, o más de una vez diariamente. De manera similar, la administración puede ser cada dos días, cada dos semanas o cada dos meses, cada tres días, cada tres semanas o cada tres meses, cada cuatro días, cada cuatro semanas o cada cuatro meses, etc. La administración puede ser varias veces por día. Cuando se utiliza como un suplemento por necesidades dietéticas ordinarias, la composición puede ser administrada directamente al animal o de otra manera puesta en contacto o mezclada con el pienso o la comida diaria. Cuando se emplea el pienso o la comida diaria, la administración será bien conocida por los expertos ordinarios.

La administración puede efectuarse también sobre una base regular como por ejemplo como parte de un régimen dietético en el animal. Un régimen dietético puede comprender la causa de una ingestión regular por el animal de una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC en una cantidad efectiva para potenciar la integridad vascular o para reducir la lesión al cerebro inducida por la isquemia, en la eventualidad de un episodio isquémico en el animal. La ingestión regular puede ser una vez al día, ó dos, tres, cuatro, o más veces por día, sobre una base diaria o semanal. De manera similar, la administración regular puede ser cada dos días o cada dos semanas, cada tres días o cada tres semanas, cada cuatro días o cada cuatro semanas, cada cinco días o cada cinco semanas o cada seis días o cada seis semanas y en este tipo de régimen dietético la administración puede ser varias veces por día. El objetivo de una administración regular es el de proporcionar al animal la dosis diaria preferida de LCPUFA y NORC, como se ha ejemplificado en la presente.

La administración de las composiciones que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC, incluyendo la administración como parte de un régimen dietético, puede abarcar un periodo de tiempo que oscila desde la gestación hasta toda la vida completa del animal.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con más detalle. Los mismos pretenden ilustrar la invención.

Ejemplo 1

5 **Efecto del β -estradiol 17 ó suplemento dietético con arginina, aceite de pescado o una combinación de los mismos sobre la lesión cerebral a partir de la isquemia cerebral transitoria en un modelo de rata ovariectomizada**

10 El tratamiento crónico con β -estradiol 17 (E2) se comparó con tres dietas de prueba que contenían arginina, LCPUFA en forma de aceite de pescado o una combinación de los mismos, respectivamente, para el estudio de sus efectos sobre la lesión cerebral causada por una isquemia cerebral transitoria en un modelo de rata ovariectomizada.

15 Métodos:

Animales. Se aclimataron ratas hembras Charles Rivers Sprague-Dawley (250 g, Wilmington, MA) a las instalaciones de los animales, tres días antes de la cirugía con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Se efectuó una ovariectomía bilateral 2 semanas antes de empezar la alimentación con dieta. Cuatro semanas después de iniciar la alimentación con dieta, se efectuó una oclusión de la arteria cerebral central transitoria (tMCA) con anestesia después de una inyección intraperitoneal (i.p.) de cetamina (60 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg)

25 **Dieta y administración de hormonas.** De catorce a 15 ratas por grupo fueron asignadas al azar de uno a cinco grupos de tratamiento. Estos grupos fueron como sigue:

Grupo 1, dieta de control (dieta blanca)

Grupo 2, dieta de control + implante de estradiol SILASTIC[®] durante 1 semana (blanca + E2)

30 Grupo 3, dieta I (dieta rosa)

Grupo 4, dieta II (dieta púrpura)

Grupo 5, dieta III (dieta gris)

35 La dieta de control fue una dieta de rata estándar que contenía 140 g/kg de caseína, 100 g/kg de sucrosa, 50 g/kg de fibra, 155 g/kg de dextrina, 466 g/kg de almidón de maíz, 35 g/kg de mezcla de sal estándar, 40 g/kg de aceite de soja, 10 g/kg de mezcla de vitaminas estándar, 1,8 g/kg de L-cistina y 2,5 g/kg de cloruro de colina. Todas las tres dietas de prueba (dieta I, II y III) se suplementaron con (1) vitaminas B adicionales, incluyendo 45 mg/kg de ácido nicotínico, 35 mg/kg de pantotenato, 24 mg/kg de piridoxina, 15 mg/kg de tiamina, 9 mg/kg de riboflavina, 3 mg/kg de ácido fólico, 0,8 mg/kg de biotina y 0, 225 mg/kg de vitamina B 12, y (2) un cocktail antioxidante que comprende 500 mg/kg de vitamina E, 150 mg/kg de vitamina C, 100 mg/kg de astaxantina y 0,4 mg/kg de selenio. La dieta I incluía además 2% de arginina (20 g/kg), la dieta II incluía además un 2% de arginina y un 2% de aceite de pescado lacha (20 g/kg). La dieta III incluía además un 2% de aceite de pescado lacha.

45 Todas las dietas fueron administradas *ad libitum* a la ratas durante cuatro semanas. Cada semana tenían lugar cambios en la alimentación. También una vez por semana se determinaron los pesos corporales y la ingesta de comida. Una semana antes de la inducción de una oclusión tMCA, el grupo 2 de ratas fueron tratadas con E2 a una dosis de 4 mg/ml en una píldora SILASTIC[®] que se implantó subcutáneamente. Este procedimiento ha sido empleado para proteger el cerebro de una variedad de ataques y produce un nivel de E2 en suero fisiológicamente importante (Simpkins et al., 1997, Jung et al. 2003). Este era un control positivo puesto que había sido mostrado previamente que esta dosis y tiempo de tratamiento con E2 daba como resultado la protección de los efectos de la oclusión tMCA (Simpkins et al., 1997, Yang et al., 2004a, Yang et al., 2004b).

50 **Oclusión de la arteria cerebral media y preparación de muestras.** Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de cetamina (60 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). La oclusión tMCA se efectuó como se ha descrito previamente (Simpkins et al., 1997) con una ligera modificación. En breves palabras, la arteria carótida izquierda común, la arteria carótida externa, y la arteria carótida interna, fueron mostradas mediante una incisión en la línea media del cuello uterino. Una sutura con monofilamento de 3,0, se introdujo dentro del volumen de la arteria carótida interna y suavemente se avanzó hasta que dejó de producirse resistencia. El procedimiento quirúrgico se efectuó dentro de 20 minutos con un mínimo sangrado. La sutura se mantuvo en su lugar durante 60 minutos y a continuación se retiró para permitir la reperusión. La temperatura rectal fue monitorizada y mantenida entre 36,5 y 37 °C con una almohadilla de calentamiento durante el proceso. A las 24 horas después del comienzo de la reperusión, los animales fueron sacrificados y se extirparon los cerebros. Los cerebros fueron a continuación diseccionados coronalmente en secciones de 2 mm empleando una matriz metálica de cerebro (ASI Instruments Inc.; Warren, MI) y se tizaron mediante incubación en una solución al 2% de cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC) en solución salina fisiológica a 37 °C, y a continuación se fijó en formalina al 10%.

El análisis de fragmentación del ADN con la oclusión MCA marcado con dUTP en el extremo mellado, inducido con TdT (ensayo TUNEL), es un modelo de ataque isquémico focal ampliamente empleado (Bederson et al., 1986). Este modelo in vivo para la muerte de neuronas puede inducir rápidamente un proceso apoptótico sincronizado en un gran número de neuronas y otras células (Li et al., 1997). Los efectos de la isquemia transitoria sobre la apoptosis fueron por lo tanto examinados mediante análisis de fragmentación del ADN con el ensayo TUNEL. El tintado TUNEL se efectuó de acuerdo con las instrucciones modificadas del fabricante (Gavrieli et al., 1992). Las secciones fijadas con formalina, incrustadas en parafina, fueron desparafinadas con xilol, rehidratadas con un tratamiento graduado con etanol, y se dio un lavado final con PBS. Las secciones fueron fijadas posteriormente con el 4% de paraformaldehído durante 20 minutos. Las secciones se lavaron a continuación y se trataron durante 15 minutos con 100/μg/mililitro de proteinasa K en PBS, se equilibró con tampón de equilibrado durante 10 minutos, y a continuación se incubó con tampón que contenía la enzima TdT y dUTP marcado con FITC (Promega, Madison, WI) a 37 °C en una cámara de humidificación. La reacción se concluyó mediante incubación en tampón 2xSSC durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se montaron a continuación con reactivos antidecolorantes, que contenían DAPI (pruebas moleculares, Eugene, OR). Las secciones de control positivo se sumergieron en una solución de DNasa I durante 10 minutos a temperatura ambiente antes del equilibrado en tampón TdT. Las secciones se observaron mediante un microscopio de fluorescencia con pares de filtros de excitación/emisión apropiados.

Algunos animales fueron eliminados del estudio durante el protocolo. El número de animales cuantificados por volumen de la lesión oscilaron de 12 a 15 por grupo

Métodos estadísticos. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de una vía de la varianza (ANOVA) empleando el programa Prism (Graphpad Inc; San Diego, CA). El significado de las diferencias entre los grupos se determinó por el ANOVA de una vía seguido por pruebas de comparación múltiple de Tukey. Todos los valores se expresaron como la media ± SEM.

Resultados:

Volumen de los ataques. Todas las cuatro condiciones experimentales (estradiol y dietas I, II y III redujeron el tamaño del infarto (**figura 1**). El tratamiento con estradiol (grupo 2) redujo el volumen del infarto en un 68% a un valor típico de una protección con estrógenos de las lesiones del ataque (Simpkins, et al., 1997; Fan et al., 2003; Yang et al., 2004a; Yang et al., 2004b). De forma similar, la dieta II redujo el volumen del infarto significativamente en un 67%. Las otras dos dietas, ensayadas redujeron también los volúmenes medios del infarto, pero los datos fueron demasiado variables para que los valores fueran estadísticamente significativos.

En la medida en que cada grupo tenía ratas con lesiones no observables (valor 0 en nuestros cálculos de volumen de la lesión), los datos fueron evaluados después de que estos valores fueran omitidos, para determinar la extensión en la cual los valores 0 contribuían a diferencias en el grupo. Como se muestra en la **figura 2**, los mismos dos grupos fueron significativamente menores que el grupo de la dieta de control con esta modificación en los datos. Así, las diferencias entre los grupos fueron impulsadas por el animal en el cual las lesiones fueron observadas así como también por el número de animales sin lesiones observables. Los efectos protectores tanto del tratamiento con estrógenos como de las dietas tuvieron lugar principalmente en el córtex, un área del cerebro llamado la penumbra, puesto que se cree que es "rescatable" en un ataque experimental. Es decir, en contraste con los ganglios basales llamados el núcleo del infarto, el cual no es fácilmente salvado por ningún tratamiento ensayado hasta la fecha en un ataque experimental.

Apoptosis. El dictamen de la apoptosis empleando el método de tinción TUNEL se efectuó para determinar las consecuencias del tratamiento con estradiol y las tres dietas de prueba acerca de la respuesta apoptótica a la isquemia experimental. Tres regiones del cerebro para la tinción TUNEL fueron valoradas en todos los animales que completaban el estudio. El método TUNEL se valoró en el núcleo del córtex cerebral, la penumbra del córtex cerebral y el núcleo del subcórtex, en base a nuestra valoración de las regiones del cerebro dañadas, empleando la tinción con TTC (Wen et al., 2004). El número de células positivas al ensayo TUNEL se normalizó al número total de células en el campo empleando la contratinción nuclear DAPI. Se contaron las secciones de todas las tres regiones cerebrales y se emplearon los contajes celulares medios de cada animal para calcular la media del grupo. Los contajes celulares se efectuaron en campos microscópicos seleccionados al azar (secciones de 320 μm cuadrados) en rodajas de la máxima extensión del infarto cerebral, determinada mediante la tinción con TTC. La tinción TUNEL fue extensiva en las tres regiones cerebrales en los animales de control. Cuando se hizo una comparación de los cinco grupos de tratamiento, la tinción TUNEL en cada cerebro correlacionó con los resultados encontrados empleando la tinción con TTC para cuantificar el volumen de la lesión (**figura 3**). Es decir, hubo una substancial reducción en la tinción TUNEL tanto en los animales tratados con E2 como también en los animales alimentados con la dieta II. Los animales alimentados con las dietas I y III fueron intermedios entre los controles y los animales de la dieta II. Esta correlación entre la tinción con TTC y la tinción TUNEL está mostrada en la **figura 4**. La caracterización de los efectos de las hormonas y las dietas sobre la tinción TUNEL, indica que una substancial porción de la protección mediante E2 y la dieta número II a partir de la muerte celular, está mediada por una inhibición de la apoptosis.

Conclusiones:

5

Las tres dietas de ensayo redujeron el volumen del infarto medio, así como también las cuentas de células TUNEL-positivas, y la dieta II redujo estos parámetros al nivel encontrado con un neuroprotector ya conocido, el estradiol.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de uno o más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA), y uno o más compuestos liberadores de óxido nítrico (NORC) en la elaboración de un medicamento o medicamentos para la co-administración para la potenciación de la integridad vascular, reduciendo la apoptosis celular en el lugar donde está localizada una isquemia en un animal.
- 10 2. El empleo de la reivindicación 1, en donde la isquemia tiene lugar en un tejido seleccionado del cerebro, corazón y riñón.
- 15 3. Empleo de uno o más LCPUFA y de uno o más NORC en la elaboración de un medicamento o medicamentos para la co-administración para la reducción de las lesiones cerebrales inducidas por una isquemia en un animal.
- 20 4. Empleo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medicamento es una composición para pienso de animal doméstico, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para el consumo humano.
- 25 5. Empleo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los LCPUFA incluyen por lo menos un ácido del grupo formado por el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenoico, el ácido docosapentaenoico o el ácido docosahexaenoico.
- 30 6. Empleo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el NORC incluye por lo menos una L-arginina o uno de los derivados de la misma.
- 35 7. Empleo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los LCPUFA están en una cantidad desde por lo menos aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 13% en peso de la formulación y la L-arginina en una cantidad desde por lo menos aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 12% en peso de la formulación.
- 40 8. Empleo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el animal es un animal de compañía.
- 45 9. Empleo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el animal de compañía es un gato o un perro.
- 50 10. Empleo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el animal es un humano.
- 55 11. Una composición que comprende una o más LCPUFA y uno o más NORC para emplear en la reducción de la lesión cerebral inducida por isquemia, en un animal en donde la composición se administra al animal sobre una base regular.
- 60 12. La composición de la reivindicación 11, en donde la composición es una composición de pienso para un animal doméstico, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para el consumo humano.
13. La composición de la reivindicación 11, en donde los LCPUFA incluyen por lo menos un ácido araquidónico, un ácido eicosapentaenoico, un ácido docosapentaenoico, o un ácido docosahexaenoico.
14. La composición de la reivindicación 11, en donde los NORC incluyen por lo menos una L-arginina o derivados de la misma.
15. La composición de la reivindicación 14, en donde los LCPUFA están en una cantidad desde por lo menos aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 13% en peso de la formulación, y la L-arginina en una cantidad desde por lo menos aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 12% en peso de la formulación.
16. La composición de la reivindicación 11, en donde el animal es un animal de compañía.
17. La composición de la reivindicación 16, en donde el animal de compañía es un gato o un perro.
18. La composición de la reivindicación 11, en donde el animal es un humano.
19. Una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC, para emplear en la potenciación de la integridad vascular y la reducción de la lesión cerebral en la eventualidad de un episodio isquémico en el cerebro.

20. Una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC, para emplear en la potenciación de la integridad vascular y la reducción de la apoptosis celular en el lugar de localización de una isquemia en un animal.

5 **21.** La composición de la reivindicación 20, en donde la isquemia tiene lugar en un tejido seleccionado del cerebro, del corazón, y del riñón.

22. Una composición que comprende uno o más LCPUFA y uno o más NORC para emplear en la reducción de la lesión cerebral inducida por una isquemia en un animal.

10

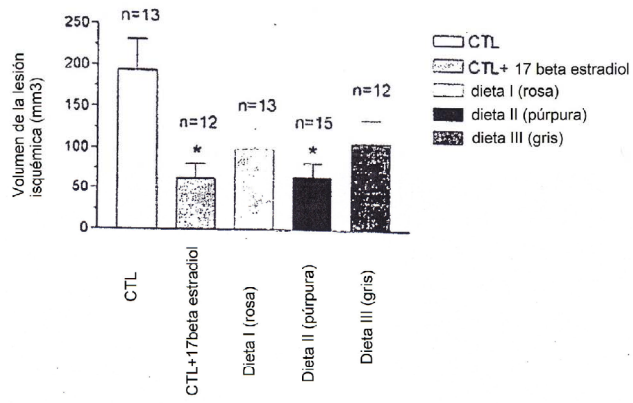


FIGURA 1

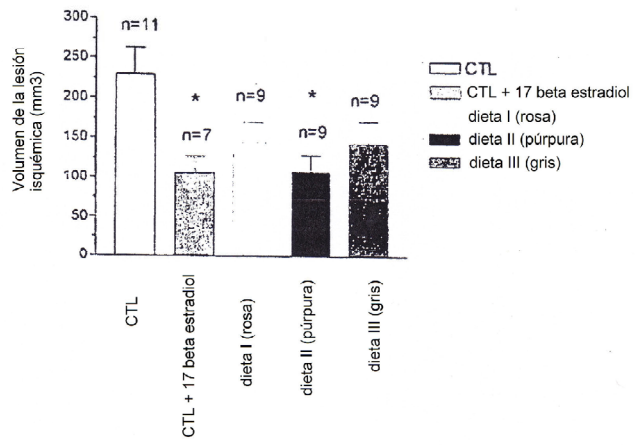


FIGURA 2

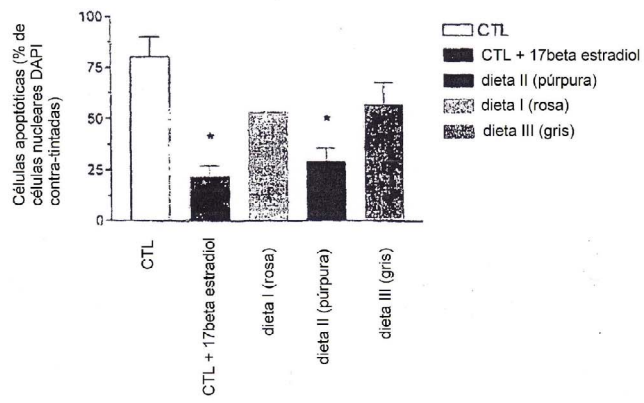


FIGURA 3

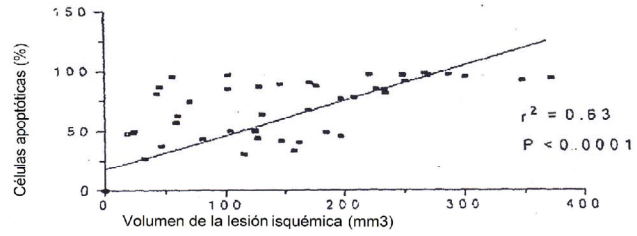


FIGURA 4