

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 637**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05742801 .3**

96 Fecha de presentación: **15.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1755406**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Composiciones para reducir el estrés oxidativo en un animal**

30 Prioridad:
16.04.2004 US 562815 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
**NESTEC S.A. (100.0%)
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:
**REYNOLDS, ARLEIGH J.;
JACKSON, JANET R. y
WALDRON, MARK K.**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 391 637 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).

DESCRIPCION

Composiciones para reducir el estrés oxidativo en un animal

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere generalmente a composiciones que son efectivas para la reducción y/o la prevención del estrés oxidativo en un animal mediante la astaxantina y un suplemento de vitamina E.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células obtienen la energía de la oxidación de una gran variedad de moléculas orgánicas, y el oxígeno es el oxidante primordial en las reacciones bioquímicas que efectúan esta función. El estrés oxidativo, que resulta de las reacciones metabólicas que emplean oxígeno, puede ser considerado un trastorno del estatus de equilibrio de los sistemas pro-oxidante/anti-oxidante en células intactas. Las células tienen unos sistemas intactos pro-oxidante/anti-oxidantes que continuamente generan y desintoxican oxidantes durante el metabolismo aeróbico normal. Cuando tienen lugar episodios oxidativos adicionales, los sistemas pro-oxidantes superan a los sistemas anti-oxidantes, lo cual puede dar por resultado un daño oxidativo a los componentes celulares incluyendo los lípidos, las proteínas, los hidratos de carbono, y los ácidos nucleicos. Un estrés oxidativo suave, crónico, puede alterar los sistemas anti-oxidantes induciendo o reprimiendo las proteínas que participan en estos sistemas, y por el agotamiento de los almacenes celulares de materiales anti-oxidantes como por ejemplo el glutation y la vitamina E. Un estrés oxidativo severo puede conducir finalmente a la muerte celular.

Puede producirse un desequilibrio en los sistemas pro-oxidantes/anti-oxidantes a consecuencia de un número de diferentes desafíos oxidativos, entre los cuales pueden citarse: la radiación, el metabolismo de contaminantes del medio ambiente y de fármacos administrados, así como también la respuesta del sistema inmunológico a la enfermedad o a la infección. La respuesta inmunológica es de una particular importancia dado que muchos materiales oxidativos tóxicos están generados con el fin de atacar los organismos invasores. Una variedad de productos químicos llamados radicales tienen un papel en estos procesos. Una especie radical, es cualquier átomo que contiene uno o más electrones orbitales con estados desapareados del spin. Un radical puede ser una pequeña molécula de gas como por ejemplo el oxígeno o el óxido nítrico, o puede ser una parte de una gran biomolécula como por ejemplo una proteína, un hidrato de carbono, un lípido, o un ácido nucleico. Algunas especies de radicales son muy reactivas con otras biomoléculas y otras, como por ejemplo el estado normal de triplete del oxígeno molecular, son relativamente inertes.

De interés con respecto al estrés oxidativo, son las reacciones de productos de oxígeno parcialmente reducidos y especies radicales y no radicales derivadas de los mismos. Una variedad de las especies de nitrógeno reactivo derivadas de las reacciones del óxido nítrico juegan también un papel importante en el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo ha sido implicado en la enfermedad humana y animal. Las células tienen, sin embargo, múltiples mecanismos de protección contra el estrés oxidativo que actúa en la prevención de daños celulares. Muchos constituyentes dietéticos son fuentes importantes de agentes protectores, incluyendo las vitaminas antioxidantes y los minerales, así como también aditivos alimenticios que podrían potenciar la acción de los antioxidantes naturales. La eficacia de un antioxidante en un estrés oxidativo puede depender de las moléculas específicas que causan el estrés, y la localización celular o extracelular de la fuente de estas moléculas.

Un ejercicio intenso puede contribuir de manera importante al estrés oxidativo de múltiples maneras. La mayor parte de individuos han experimentado al mismo tiempo en sus vidas, inflamación y fatiga después de un esfuerzo físico. Para los animales que efectúan intensos y frecuentes esfuerzos, los efectos del estrés oxidativo pueden tener efectos negativos sobre el rendimiento.

Un ejercicio intenso da como resultado un número de cambios fisiológicos en el cuerpo. En primer lugar, la respiración aeróbica aumenta espectacularmente, incrementando con ello la generación del anión superóxido tanto como 10 veces o más (Halliwell, B. (1994) "Free radicals and antioxidants: a personal view" ("Radicales libres y antioxidantes; una visión personal"), Nutr. Rev. 52: 253-265), además de aumentar la exposición a los ataques oxidativos del medio ambiente, como por ejemplo la polución del aire. En segundo lugar, las inflamaciones de los músculos y de las articulaciones, son consecuencia a menudo de un intenso ejercicio, lo cual provoca a menudo la infiltración de neutrófilos en los tejidos y la subsiguiente liberación de especies de oxígeno reactivo durante la "explosión oxidativa" característica de los neutrófilos activados mediados por la respuesta inmunológica.

Se ha detectado que la ingesta potenciada de antioxidantes en los humanos disminuye el riesgo de desarrollar formas específicas de cáncer, y potencia la función inmunológica. Los efectos de la ingesta dietética antioxidante sobre los procesos patológicos y fisiológicos, como por ejemplo, el proceso de envejecimiento y los ensayos en perros han sido informados en la literatura científica. Han sido también informados los efectos de las ingestas potenciadas de vitaminas E y C sobre la función inmunológica, la formación de radicales libres y los depuradores de radicales libres

Pueden desarrollarse cataratas debido a los trastornos metabólicos como la diabetes, y a la exposición a la luz, seguida por la subsiguiente oxidación de las lentes oculares. El estrés oxidativo, por consiguiente contribuye directamente a la formación de cataratas. Los productos primordiales (dienos conjugados, cetodienos) de la peroxidación de los lípidos (LPO) se acumulan durante durante las etapas iniciales de la formación de cataratas, mientras los productos finales fluorescentes de la LPO son dominantes en las últimas etapas (Babizhayev et al., (2004) Drugs ("Fármacos") R.D. 5 (3):125-139). La opacidad de las lentes oculares correlaciona con la acumulación del producto final fluorescente de la LPO en el tejido y la disminución de glutatión reducido conduce a la oxidación del grupo sulfidrilo de las proteínas de las lentes oculares (Babizhayev et al., (2004) Drugs ("Fármacos") R.D. 5 (3):125-139). Se ha demostrado que la inyección directa de los productos de la LPO en el vítreo induce la formación de la catarata (Babizhayev et al., (2004) Drugs ("Fármacos") R.D. 5 (3):125-139). Así, el daño producido por los peróxidos en las membranas de fibra de las lentes oculares parece iniciar el desarrollo de las cataratas (Babizhayev et al., (2004) Drugs ("Fármacos") R.D. 5 (3):125-139).

La osteoartritis (OA) está también relacionada con el estrés oxidativo. Los radicales libres, incluyendo el óxido nítrico, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno conducen a la regulación al alza de las enzimas responsables del daño causado a los cartílagos celulares. Estas enzimas (MMPs) son específicas para el colágeno, la elastina y la gelatina.

Los radicales de oxígeno con electrones desapareados se originan como una parte normal del metabolismo del oxígeno. Estas moléculas reactivas pueden causar daños a por ejemplo, las proteínas, los ácidos nucleicos (es decir, el ADN) y/o las membranas, lo cual puede dar como resultado una seria lesión celular y una enfermedad general de todo el animal. Este proceso ha sido asociado con el proceso de envejecimiento, enfermedades degenerativas, y el cáncer.

Los animales que pueden ser particularmente vulnerables al daño o al estrés oxidativo incluyen aquellos que son muy activos. Por ejemplo, los atletas caninos con buenas condiciones físicas son animales sanos que en virtud de sus tremendos consumos de oxígeno generan más radicales libres diariamente que sus compañeros más sedentarios. Los cambios en la función inmunológica, los intermediarios metabólicos, las reservas tisulares de antioxidantes y las enzimas antioxidantes inducidas por la producción de radicales libres es mayor en los atletas caninos que en los animales sedentarios.

Estudios previos en los cuales se estudió a perros que efectuaban un trabajo duro revelaron que el ejercicio iba asociado con un aumento significativo de las concentraciones de isoprostanos en plasma, un producto secundario estable de la peroxidación de los lípidos. Estos mismos estudios demostraron también una disminución en las concentraciones de vitamina E en plasma durante el ejercicio. Posteriores estudios examinaron el efecto de un suplemento de vitamina E sobre estos parámetros. El suplemento de vitamina E ayudó a disminuir o aliviar el ejercicio asociado a la disminución de la concentración en plasma de la vitamina E, pero no disminuyó los aumentos de isoprostanos en plasma.

La patente WO 03/013268 (Mars UK Limited) describe componentes nutritivos para emplear en la reducción del daño causado al ácido nucleico, en un animal de compañía, los cuales componentes comprenden la Vitamina E, la vitamina C y un carotenoide.

La astaxantina es un carotenoides mixto el cual puede encontrarse en un buen número de fuentes; así por ejemplo, está presente en altos niveles, en las algas. Este pigmento protege al organismo de las algas del daño que puede causarle la exposición a la radiación ultravioleta. Varios estudios han demostrado propiedades inmunoestimuladoras de la astaxantina en células cultivadas así como también en animales completos (ratones). Se emplea también en lociones para filtros solares ya que se ha demostrado que disminuye el enrojecimiento de la piel después de una exposición al sol. El suplemento de astaxantina ha sido asociado también con una mayor resistencia en individuos humanos no entrenados.

RESUMEN DE LA INVENCION

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una composición que comprende la astaxantina y la vitamina E para emplear en el tratamiento, la reducción o la prevención del estrés oxidativo en un perro o un gato, siendo efectiva la composición para la reducción o la prevención del estrés oxidativo en un animal.

En un aspecto, la invención se refiere al empleo de una composición que comprende la astaxantina y la vitamina E en la elaboración de un medicamento para emplear en el tratamiento, la reducción o la prevención del estrés oxidativo en un perro o un gato.

En otro aspecto, la invención proporciona un método in vitro para la evaluación del efecto de una sustancia sobre el estrés oxidativo en un perro o un gato, el cual método comprende los pasos de (a) medición de uno o más índices del estrés oxidativo en una muestra previamente obtenida de un perro o un gato antes y después del adiestramiento de acuerdo con un régimen de ejercicios, el cual comprende el adiestramiento del perro o del gato sobre una rueda de ejercicio, una noria y/o una piscina, en donde el perro o el gato han sido previamente tratados con la sustancia en cuestión, (b) comparación de las diferencias en los índices del estrés oxidativo antes y después del

adiestramiento para obtener por lo menos un resultado, (c) comparación del resultado con un resultado obtenido de un perro o un gato de control a los cuales no se ha administrado la sustancia, en donde la sustancia se considera que tiene un efecto sobre el estrés oxidativo si los resultados difieren entre los resultados del perro o del gato tratados con la sustancia y los resultados del perro o del gato de control.

Otras características y ventajas de la presente invención se comprenderán con referencia a la descripción detallada y los ejemplos que siguen.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS VERSIONES ILUSTRATIVAS

Antes de describir la invención en detalle, debe comprenderse que esta invención no está limitada a los sistemas ejemplificados o a los parámetros del proceso como se ha descrito en la especificación de estos parámetros, y puede por supuesto, variar. Debe comprenderse además, que la terminología empleada en los mismos es para el propósito de describir solamente versiones particulares de la invención, y no se pretende de ninguna manera limitar el ámbito de la invención.

Como se emplean más arriba y durante la descripción, se comprenderá que los siguientes términos, si no se indica otra cosa, tienen los siguientes significados:

"Cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto, material, composición, y/o forma de dosificación, como se describe en la presente, que puede ser efectiva para lograr un particular resultado biológico. Dichos resultados pueden incluir, pero no están limitados a, la reducción y/o prevención del estrés oxidativo. Dicha actividad efectiva puede lograrse por ejemplo, con la ingestión de composiciones de acuerdo con los aspectos de la presente invención.

"Mamífero" se refiere a cualquier clase de vertebrados superiores de sangre caliente que alimentan a sus pequeños con leche segregada por las glándulas mamarias y tienen la piel habitualmente más o menos cubierta de pelo, y no incluye exclusivamente a los gatos y a los perros.

"Estrés oxidativo" se refiere a la condición caracterizada por un exceso de oxidantes y/o una disminución de los niveles antioxidantes. Los oxidantes celulares pueden incluir, pero no están limitados a: uno o más radicales de oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo, y/o radicales peróxido); especies reactivas de oxígeno no radical, como por ejemplo, peróxido de hidrógeno y oxígeno singulete, radicales de carbono, radicales de nitrógeno; y radicales de azufre. La condición de estrés oxidativo puede dar como resultado, por ejemplo, daños celulares, rendimiento problemático de las células y/o muerte celular.

Debe tomarse nota de que, en la forma en que se emplean en esta especificación y las reivindicaciones del apéndice, en las formas singulares de "un (una)" y "el (ella)", están incluidos los correspondientes plurales, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

Además, el término "aproximadamente", se emplea en la presente para indicar un margen de valores entre un 10% mayor y un 10% menor que el valor indicado. Así aproximadamente, un valor del 5% se pretende que abarque un margen de valores entre un 4,5% y un 5,5%.

A no ser que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que habitualmente utiliza una persona ordinariamente experta en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque un número de métodos y materiales o equivalentes a los descritos en la presente pueden emplearse en la práctica de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en la presente.

Todos los márgenes numéricos descritos en la presente incluyen todas las combinaciones y subcombinaciones de los márgenes y los números enteros específicos comprendidos en los mismos.

Como está comprendido en la presente, el ejercicio se utilizó como un modelo para aumentar la producción de radicales en un animal.

De la manera como se emplea en la presente, "vitamina E" se refiere a cualquiera de un grupo de compuestos relacionados con similar actividad biológica antioxidante, incluyendo el alfa-tocoferol pero incluyendo también otros isómeros de tocoferol y el compuesto relacionado, el tocotrienol. La molécula es lipofílica y puede residir en las membranas celulares. De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, el alfa-tocoferol puede ser una forma preferida.

De la manera como se emplea en la presente, "astaxantina" se refiere a un carotenoide mixto que se encuentra en la naturaleza en una amplia variedad de organismos vivos; puede obtenerse también sintéticamente. Las fuentes de astaxantina incluyen pero no están limitadas a los crustáceos, incluyendo los camarones, los langostinos, los cangrejos y las langostas; los peces, incluyendo la levadura de color rosa *Xanthophyllomyces*; y la microalga

Haematococcus pluvialis. En ciertas versiones preferidas de la invención, la fuente de astaxantina es la NatuRose®, que puede adquirirse en Cyanotech (Kailua-Kona, HI).

De la manera como se emplea en la presente, un "producto alimenticio" se refiere a cualquier sustancia que puede emplearse o prepararse como comida. Como se emplea en la presente, un "alimento" es un material que consta esencialmente de proteínas, hidratos de carbono y /o grasa, el cual se emplea en el cuerpo de un organismo para mantener el crecimiento, en procesos de reparación y procesos vitales y para suministrar energía. Los alimentos pueden contener también sustancias suplementarias como por ejemplo minerales, vitaminas y condimentos. El término comida incluye una bebida adaptada para el consumo humano o animal. Como se emplea en la presente, un "producto farmacéutico" es un fármaco medicinal. Un producto farmacéutico puede también referirse a un medicamento. Como se emplea en la presente, un "suplemento dietético" es un producto ideado para suplementar la dieta; puede llevar o contener una cualquiera o cualquier combinación de los siguientes ingredientes dietéticos: una vitamina, un mineral, una hierba u otros productos botánicos, un aminoácido, una sustancia dietética para emplear como suplemento para la dieta aumentando la ingesta diaria total (incluyendo pero sin limitar, enzimas o tejidos de órganos o glándulas), un concentrado, un metabolito, un constituyente o un extracto.

De acuerdo con un ejemplo, la astaxantina y la vitamina E pueden administrarse al animal en una dieta, un alimento, una sustancia alimenticia, un suplemento de la dieta o una composición farmacéutica como por ejemplo la que se describe en la presente.

De acuerdo con un ejemplo preferido, el método es efectivo para facilitar la recuperación del estrés oxidativo en los animales. De acuerdo con un ejemplo particularmente preferido, el método es efectivo para facilitar la recuperación del estrés oxidativo debido al ejercicio.

Los métodos y composiciones descritos pueden poseer efectos antienvjecimiento en los animales y por lo tanto pueden ser beneficiosos en promover la longevidad del animal. Las composiciones y los métodos descritos son también de utilidad para revertir, prevenir o reducir las condiciones detrimenales asociadas con el estrés oxidativo, pero no limitadas a una inflamación, osteoartritis, formación de cataratas, sistemas inmunológicos débiles, traumas, infección y envejecimiento prematuro. Las composiciones y métodos son además de utilidad en la potenciación de la función normal del sistema inmunológico.

Sin limitarnos a cualquier teoría o cualquier modo particular de acción de la invención, se cree que los dos antioxidantes, la astaxantina y la vitamina E pueden tener diferentes eficacias contra los diferentes tipos de estrés oxidativo. La vitamina E puede ser más efectiva contra la oxidación de los lípidos de la membrana asociados con las elevaciones inducidas con el ejercicio del metabolismo del oxígeno. La astaxantina puede ser más efectiva contra el estrés oxidativo causado por la mayor actividad inmunológica de las células en las 24 horas siguientes al ejercicio. Estas observaciones sugieren un potencial para obtener por lo menos, efectos aditivos y posiblemente un efecto sinérgico si los dos antioxidantes están combinados.

Para ilustrar ciertos aspectos de la invención, perros de trineo de Alaska corrieron 30 millas durante tres días consecutivos, y se midieron los biomarcadores como por ejemplo los isoprostanos F-2, antes y después de las 24 horas y 48 horas después del ejercicio. Debido a que la proporción de generación de radicales libres en estos animales de ejercicio es mayor que en el promedio de animales domésticos, el efecto de años de exposición a los radicales libres fue simulado en un corto período de tiempo: días a semanas. Los análisis de sangre de estos perros de ejercicio demostraron importantes descensos de vitamina E en plasma y de ceruloplasmina en plasma, juntamente con significativos aumentos en isoprostanos, creatina quinasa (CK) y ácido úrico (UA). Cuando las prostaglandinas se expusieron a los radicales libres, se convirtieron en isoprostanos, los cuales son estables durante varias horas y se miden fácilmente mediante un kit Elisa comercialmente adquirible. Además, se ha demostrado que la actividad inmunológica de las células aumenta la concentración de los marcadores de la oxidación lipídica después del ejercicio.

Tres grupos de doce perros (perros de trineo de Alaska, de raza mezclada (cruce con husky pointer)) se alimentaron con la comida para perros de fórmula pollo y arroz ProPlant® Performance, comercialmente adquirible, y cada grupo se alimentó o bien con placebo que consistía en aproximadamente 0,5 g de maltodextrina, aproximadamente 2 mg de astaxantina, o aproximadamente 400 mg de vitamina E (alfa-tocoferol). La comida para perros Pro Plant® es adquirible en Nestlé Purina Pet Care Company en St. Louis, Missouri. Los perros fueron adiestrados tres veces por semana en una rueda de ejercicios durante un período de seis semanas. A la sexta semana los perros descansaron durante cuatro días y a continuación se ejercitaron tres días en una fila de perros. Se recogieron muestras de sangre antes del ejercicio el día uno, inmediatamente después del ejercicio el día tres, y 24 horas y 48 horas después del ejercicio. Se analizó el plasma a partir de las muestras de sangre para determinar las concentraciones de malondialdehído, de isoprostanos F-2, de Vitamina E, de actividad creatina quinasa así como también la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).

Se determinaron los efectos de suplementar la vitamina E, astaxantina, o un placebo sobre varios índices de la oxidación de los lípidos, y se examinó la función inmunológica. Se escogió la vitamina E debido a que es un antioxidante común y proporciona un punto de referencia sobre el cual poder comparar los otros antioxidantes. La astaxantina es un carotenoides mixto que puede obtenerse a partir de un gran número de fuentes, incluyendo, sin

limitación, las microalgas a partir de las cuales, se cosecha. Es soluble tanto en los compartimento lípidos de la célula como en los compartimentos acuosos, y por lo tanto tiene una distribución más amplia que la vitamina E (soluble solamente en lípidos) o que la vitamina C (soluble solamente en agua). La astaxantina tiene 4 veces la capacidad de absorción del radical oxígeno *in vivo* de la vitamina E. Se ha informado también de que es más potente que la vitamina E ó que la vitamina C en prevenir la peroxidación de los lípidos y el secuestro de los radicales libres.

Como se describe en la presente, se identifican los patrones de antioxidantes de la ingesta dietética como por ejemplo la vitamina E y la astaxantina. Estos antioxidantes proporcionan la protección óptima de los cambios inducidos en los radicales libres en perros de ejercicio. Midiendo cada antioxidante individualmente y a continuación midiéndolo en combinación con otros cualesquiera, pueden observarse efectos aditivos o sinérgicos y pueden desarrollarse sistemas antioxidantes que pueden proteger tanto la membrana celular como el citosol.

De acuerdo con una versión de la invención, se proporciona un método *in vitro* de evaluación del efecto de una sustancia sobre el estrés oxidativo en un perro o un gato, el cual método comprende los pasos de : a) medición de uno o más índices del estrés oxidativo en una muestra obtenida previamente a partir de un perro o de un gato antes de y después del adiestramiento, de acuerdo con un régimen de ejercicio, el cual comprende el adiestramiento del perro o del gato en una rueda de ejercicios, una noria y/o una piscina, en donde el perro o el gato han sido previamente tratados administrándoles la sustancia, b) comparación de las diferencias de los índices del estrés oxidativo antes y después del adiestramiento para obtener por lo menos un resultado, c) comparación del resultado con el resultado obtenido de un perro o gato de control a los cuales no se ha administrado la sustancia; en donde la sustancia se considera que tiene un efecto sobre el estrés oxidativo si los resultados difieren entre los del perro o del gato tratados con la sustancia y los del perro o gato de control. El empleo de una rueda de ejercicios permite al investigador estandarizar el esfuerzo del animal empleando uno o más ajustes que corresponden a una velocidad y distancia fijadas. Una noria puede también permitir dicho control y estandarización permitiendo al investigador ajustar parámetros como por ejemplo una velocidad y una inclinación. Un régimen de natación puede también estandarizarse. De preferencia, los índices de esfuerzo oxidativo pueden seleccionarse entre uno o más de los siguientes: la concentración en plasma del malondialdehído, la concentración en plasma de los isoprostanos F-2, la concentración en plasma de la vitamina E, la actividad de creatina quinasa, o la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).

De acuerdo con una versión de la presente invención, se proporciona una composición que comprende astaxantina y vitamina E para emplear en el tratamiento, reducción o prevención del estrés oxidativo en un perro o un gato.

De acuerdo con una versión preferida de la invención, la composición es efectiva para facilitar la recuperación del estrés oxidativo en los animales. De acuerdo con una versión particularmente preferida, la composición es efectiva para facilitar la recuperación del estrés oxidativo debido al ejercicio. La composición es efectiva para el tratamiento, demora o prevención de las condiciones psicológicas indeseables asociadas con el estrés oxidativo. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a, la osteoartritis, formación de cataratas, respuestas inmunológicas reducidas o comprometidas, y aumentando la solidez de las respuestas inmunológicas normales.

La composición descrita puede ser empleada por ejemplo, como una dieta, un alimento, una sustancia alimenticia o un producto terapéutico veterinario. Las composiciones pueden contener opcionalmente un soporte, un diluyente, o un excipiente, escogidos para ser adecuados para el uso que se pretende.

Las composiciones pueden ser administradas por vía entérica, como por ejemplo, por vía oral, intragástricamente o transpilóricamente. Los expertos en la técnica deben tener en cuenta que muchos factores pueden modificar la acción de la composición, por ejemplo, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, la velocidad de excreción, la condición del sujeto, la sensibilidad de reacción y la gravedad. La administración puede efectuarse continua o periódicamente, como por ejemplo, una vez al día o una vez cada comida.

Ciertos aspectos de la invención se emplean de preferencia en combinación con una completa y equilibrada comida (por ejemplo, como está descrito en el National Research Council ("Consejo de Investigación Nacional"), 1985, Nutritional Requirements for Dogs ("Requisitos nutritivos para perros"), National Academy Press ("Prensa de la Academia Nacional"), Washington D.C., ó Association of American Feed Control Officials ("Asociación de funcionarios estadounidenses de Control de Alimentación"), Official Publication ("Publicación Oficial"), 1996). Esto es, las composiciones que comprenden la astaxantina y la vitamina E de acuerdo con ciertos aspectos de esta invención, se emplean de preferencia con un alimento de alta calidad comercial. Como se emplea en la presente, la expresión "alimento de alta calidad comercial" se refiere a una dieta fabricada para producir la digestibilidad de los nutrientes clave en un 80% ó más, como se establece por ejemplo, en las recomendaciones del National Research Council ("Consejo Nacional de Investigación") de más arriba, para perros. Similares estándares de altos nutrientes se emplean para otros animales.

Las dosificaciones más adecuadas de la(s) sustancia(s) empleada(s) en varios aspectos de la presente invención, variarán con la forma de administración, la(s) sustancia(s) particular(es) escogida(s) y las características

fisiológicas del animal particular que recibe la dosis. Los márgenes de dosificación diaria preferidos para la vitamina E pueden ser desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 500 mg por animal y por día, con mayor preferencia desde aproximadamente 150 hasta aproximadamente 450 mg por animal y día, con más preferencia aproximadamente 400 mg por animal y por día. De preferencia, los márgenes de dosificación diaria para la astaxantina pueden ser desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 40 mg por animal y por día. Como ejemplo, la cantidad es desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 10 mg por animal y por día. Como otros ejemplos, la cantidad es desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 40 mg por animal y por día. Todavía en otros ejemplos, la cantidad es desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mg por animal y por día. En algunos ejemplos preferidos, la cantidad es desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 8 mg por animal y por día, y con mayor preferencia aproximadamente 2 mg por animal y por día.

Las composiciones descritas pueden estar en forma de un suplemento dietético. El suplemento dietético puede estar en cualquier forma conveniente, incluyendo, sin limitación, la forma líquida, sólida o en polvo. Las formas sólidas del suplemento incluyen, pero no están limitadas a una píldora, una galleta o un obsequio.

De acuerdo con ciertos ejemplos, un suplemento dietético puede estar formado por una sustancia alimenticia con altos niveles de astaxantina y/o de vitamina E, la cual requiere una "dilución" antes de alimentar a un animal. El suplemento puede ser de cualquier forma, incluyendo sin limitación, un sólido (p. ej. un polvo), un semisólido (p. ej. un gel de consistencia similar a un alimento) o un líquido. El suplemento puede ser administrado al animal de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la forma líquida puede mezclarse convenientemente con un alimento o un pienso directamente al animal, como por ejemplo, con una cuchara o con un dispositivo como un tubo. En ciertos ejemplos, el suplemento puede ser alto en ambos componentes de astaxantina y vitamina E ó puede ser un pack combinado de dos o más componentes, teniendo las concentraciones requeridas de astaxantina y vitamina E separadamente o en cualquier combinación adecuada.

EJEMPLOS

La invención se demuestra además en los siguientes ejemplos 1 y 2. Los ejemplos 3 – 6 tienen por finalidad, servir como referencia. El ejemplo 1 es un ejemplo real y los ejemplo 2-6 son ejemplos proféticos. Los ejemplos son para propósitos de ilustración y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Todos los perros fueron mantenidos con la misma dieta básica (fórmula Purina Pro Plan®Performance de pollo y arroz), durante un mes antes del comienzo y durante todo el experimento. Cada perro fue alimentado individualmente para mantener un índice de la condición corporal óptima de 4/10. Un índice de la condición corporal de 4/10 indica que los perros fueron flacos pero no demacrados (1 es muy delgado, 10 es muy obeso).

36 perros de trineo fueron alojados en las instalaciones Nestlé Purina en Salcha, Alaska. Los perros se dividieron en tres grupos de 12 perros cada uno de manera que cada grupo fue igual en edad, sexo y distribución de la capacidad. Se asignó un tratamiento al azar para cada grupo extrayéndolo de un sombrero. Al grupo "A" se le asignó aproximadamente 400 mg de vitamina E/ día, al grupo "B" se le asignó aproximadamente 2 mg de astaxantina/día y al grupo "C" se le asignó aproximadamente 500 mg de maltodextrina como un placebo. Las personas responsables de la alimentación, el cuidado y el adiestramiento de los perros fueron anónimos así como la identidad de los tratamientos, hasta la terminación del estudio. Los perros fueron tratados durante seis semanas antes del comienzo del ensayo. Fueron también entrenados ligeramente durante dos sesiones por semana durante este periodo de tiempo. Las sesiones de adiestramiento consistieron en caminar durante 14 kilómetros por hora durante dos horas en un circuito en forma de un círculo de 40 pies de diámetro, sujeto a una rueda de caminar para perros.

El ensayo tuvo lugar durante un período de seis días. El día uno se extrajeron muestras de sangre antes del ejercicio, de todos los perros. El día dos, los perros corrieron doce kilómetros mientras tiraban de un vehículo todo terreno (ATV) que pesaba 500 libras. El día tres, los perros caminaron 16 millas sujetos a la rueda de caminar. El día cuatro, los perros tiraron de nuevo del ATV durante una distancia de 12 km. Inmediatamente después del ejercicio del día cuatro se extrajeron muestras de sangre. Se extrajeron muestras adicionales de sangre de nuevo a las 24 horas y a las 48 horas después del ejercicio. Este programa de muestras fue designado para estudiar los cambios en los parámetros medidos durante el ejercicio y durante la recuperación. Las muestras se obtuvieron por punción de la vena yugular y se recogieron en tubos de cristal vacíos de aire que contenían EDTA sódica como anticoagulante. Una vez recogidas se guardaron en hielo durante no más de 10 minutos antes de ser centrifugadas a 10.000 revoluciones por minuto (rpm) a 4 °C durante un periodo de 10 minutos. El plasma se transfirió a viales congelados en los que el espacio muerto se reemplazó con nitrógeno gas para disminuir la posterior oxidación durante el almacenamiento. Los viales se taparon a continuación e inmediatamente se enfriaron en nitrógeno líquido. Los viales fueron recubiertos por nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C hasta que se analizaron. Cada muestra de plasma se analizó para determinar la concentración de malondialdehído empleando un HPLC estándar, la concentración de isoprostano-F2 utilizando un espectrómetro de masas y un ELISA estándar, la concentración de vitamina E utilizando un HPLC estándar, y la Oxidative Radical Absorbance Capacity ("capacidad de absorción de los radicales oxidativos") (kit de ensayo ORAC, Oxford Co).

El isoprostano F2 y los datos CK fueron evaluados empleando un método ANOVA de dos vías para mediciones repetidas. Se efectuaron comparaciones "post hoc" empleando un ensayo "student's" corregido para mediciones repetidas mediante el "método de Bonneferroni". La significancia estadística se ajustó a $p < 0,05$. Los otros datos se evaluaron también empleando el método ANOVA. La abreviación "se" se empleó con respecto a los datos de las tablas de más adelante y se refiere al "error estándar".

Resultados

Vitamina E en plasma. La tabla 1 muestra los valores en plasma de la vitamina E. Las concentraciones de vitamina E en plasma fueron las máximas para el grupo tratado con la vitamina E en todos los periodos de tiempo. No se encontró ninguna diferencia significativa entre las concentraciones de vitamina E en el plasma de los perros tratados con placebo y los perros tratados con Astaxantina (ATX) para cualquier período de tiempo. Las concentraciones de vitamina E en plasma de todos los grupos de tratamiento tendieron a aumentar a través del tiempo. Todas las concentraciones de vitamina E se mantuvieron bien por encima del mínimo del margen normal para los perros establecidos por el laboratorio que dirigía los análisis.

Tabla 1. Vitamina E en plasma (media +/- se)

Tiempo	Pre-ejercicio	Post-ejercicio	Después de 24 horas	Después de 48 horas
Placebo	2170 (+/- 404)	1850 (+/- 404)	2380 (+/- 404)	2280 (+/- 404)
ATX	1635 (+/- 358)	1680 (+/- 358)	2000 (+/- 358)	1990 (+/- 358)
Vitamina E	3370 (+/- 390) ^a	3540 (+/- 390) , a	4720 (+/- 390) , a	4520 (+/- 390) , a

* = significativamente diferente del período de tiempo pre-ejercicio dentro del grupo
a = significativamente diferente de los otros grupos de tratamiento dentro del período de tiempo

Malondialdehído en plasma (MDA). La tabla 2 muestra los valores para el malondialdehído en plasma. La única diferencia entre los tres grupos de tratamiento se observó a las 24 horas después del ejercicio, en donde el valor de la astaxantina fue inferior tanto al valor del placebo como al valor de la vitamina E.

Tabla 2. MDA en plasma (media +/- se)

Tiempo	Pre-ejercicio	Post-ejercicio	Después de 24 horas	Después de 48 horas
Placebo	1,13 (+/- 0,19)	1,46 (+/- 0,19)	1,4 (+/- 0,21)	1,41 (+/- 0,18)
ATX	1,45 (+/- 0,24)	1,58 (+/- 0,41)	0,95 (+/- 0,19) [*]	1,44 (+/- 0,19)
Vitamina E	1,51 (+/- 0,17)	1,17 (+/- 0,26)	1,44 (+/- 0,40)	1,44 (+/- 0,10)

* = significativamente diferente de los valores del pre-ejercicio y post-ejercicio dentro del grupo de tratamiento
a = significativamente diferente del grupo placebo dentro del período de tiempo

La tabla 3 muestra el cambio en los valores de MDA de la línea base para cada período de tiempo. Con relación al valor del pre-ejercicio, todas las muestras de post-ejercicio dieron un valor elevado en el grupo del placebo. No se encontró ninguna diferencia entre los valores del MDA del pre-ejercicio y los del post-ejercicio, en el grupo de la astaxantina, pero el valor del post-ejercicio a las 24 horas fue significativamente menor que el valor del pre-ejercicio. 48 horas después del ejercicio, el cambio en el valor del MDA retornó a la línea base en este grupo. En el grupo de la vitamina E el cambio en los valores del MDA disminuyeron desde el pre-ejercicio al post-ejercicio y retornaron a la línea base en las muestras del post-ejercicio a las 24 y a las 48 horas.

Tabla 3. Cambios en el MDA en plasma en el tiempo

Cambio de línea base	Pre-ejercicio a post-ejercicio	Pre-ejercicio a las 24 horas del post-ejercicio	Pre-ejercicio a las 48 horas del post-ejercicio
Placebo	+ 0,326 [*]	+ 0,268 [*]	+ 0,282 [*]
ATX	0,135	- 0,485 [*]	- 0,004
Vitamina E	- 0,336 [*]	- 0,071	-0,069

* = significativamente diferente del valor de la línea base dentro del grupo de tratamiento

Isoprostano-F2 en plasma (F2I). La tabla 4 muestra los valores para el F2I. No se encontraron ningunos aumentos significativos en la concentración de este isoprostano-F2 en plasma entre las muestras del pre-ejercicio y las muestras del post-ejercicio dentro de cualquiera de los grupos de tratamiento. El grupo placebo mostró un aumento en F2I a las 24 horas después del ejercicio; a las 48 horas después del ejercicio, el valor había retornado al valor de la línea base. Los valores de F2I en el grupo de la astaxantina disminuyeron por debajo del valor de la línea base para las mediciones inmediatamente después del ejercicio, a las 24 horas después del ejercicio, y a las 48 horas después del ejercicio. En la vitamina E, los valores del grupo F2I antes del ejercicio, después del ejercicio y 24 horas después del ejercicio no fueron significativamente diferentes entre sí. El valor para las 48 horas después del ejercicio fue significativamente inferior que los otros períodos de tiempo para el grupo de tratamiento con vitamina E.

Entre los tres grupos hubieron varias diferencias significativas. Comparado con el grupo placebo, el grupo de la astaxantina tuvo valores inferiores de F2I inmediatamente después del ejercicio y a las 24 horas después del

período del ejercicio. El valor de F2I en el grupo de la vitamina E no fue diferente del valor del placebo, excepto a las 24 horas después del período de tiempo del ejercicio en donde fue inferior. La única diferencia significativa entre los valores de F2I en el grupo de la astaxantina y los valores de F2I en el grupo de la vitamina E tuvo lugar inmediatamente después del ejercicio. El valor en el grupo de la astaxantina fue inferior al valor en el grupo de la vitamina E para este periodo de tiempo.

Tabla 4. Concentración en plasma del isoprostano F2 (media +/- se)

Tiempo	Pre-ejercicio	Post-ejercicio	Después de 24 horas	Después de 48 horas
Placebo	220 (+/- 73)	138(+/- 70)	356(+/- 144)	186(+/- 110)
ATX	167(+/- 111)	52(+/- 13)*, a, b	90(+/- 52)*, a	66(+/- 21)*
Vitamina E	144(+/- 56)	223(+/- 109)	130(+/- 48)	78(+/- 20)*

* = significativamente diferente al valor de la línea base dentro del grupo de tratamiento

a = significativamente diferente del placebo dentro del mismo período de tiempo

b = significativamente diferente del grupo de tratamiento con vitamina E dentro del mismo período de tiempo

Capacidad total de absorción del radical oxidativo (ORAC). La tabla 5 muestra los valores en plasma para la ORAC total. En el grupo placebo, los valores de ORAC aumentaron desde el pre-ejercicio hasta el post-ejercicio y permanecieron elevados durante las 24 horas del post-ejercicio. Los valores de ORAC del placebo retornaron a los valores de la línea base a las 48 horas después del ejercicio. No se encontró ningún cambio en la ORAC entre el ejercicio antes y el ejercicio después en el grupo de la astaxantina. Los valores de ORAC disminuyeron por debajo del valor de la línea de base en las muestras de 24 horas y de 48 horas en el grupo de la astaxantina. En el grupo de la vitamina E, los valores de ORAC disminuyeron desde el ejercicio antes al ejercicio después, y a continuación retornaron al valor de la línea base a las 24 horas después del ejercicio y a continuación disminuyeron por debajo de la línea base de nuevo a las 48 horas después del ejercicio. Los cambios en los valores en plasma del ORAC total dentro de los tratamientos a lo largo del tiempo son similares a los obtenidos para el MDA.

Tabla 5. ORAC total en plasma (media +/- se)

Tiempo	Antes del ejercicio	Después del ejercicio	24 horas después	48 horas después
Placebo	5430 (+/- 408) a	7330(+/- 408) *	7790(+/- 408) *	4950(+/- 408)
ATX	7980(+/- 361)	7460(+/- 361)	5700(+/- 361) *, a	4800(+/- 361)
Vitamina E	7480(+/- 390)	5850(+/- 390) *, a	7590(+/- 390)	4840(+/- 390)

* = significativamente diferentes de la línea base

a = significativamente diferentes de los otros tratamientos para este mismo período de tiempo

Creatina quinasa en plasma (CK). La tabla 6 muestra los valores en plasma de CK. En todos los tres grupos los valores en plasma de CK aumentaron desde antes del ejercicio hasta después del ejercicio y permanecieron elevados durante todos los periodos de tiempo de permanencia. El grupo de la astaxantina tuvo también valores de CK inferiores a los del grupo de la vitamina E para todos los periodos de tiempo pero en el ejercicio después de 24 horas no hubo ninguna significativa diferencia entre los dos grupos. Ninguno de los valores de este experimento excedió el margen normal de CK.

Tabla 6. Creatina quinasa en plasma (media +/- se)

tiempo	Antes del ejercicio	Después del ejercicio	Después de 24 horas	Después de 48 horas
Placebo	134 (+/- 12)	176(+/- 21) *	220(+/- 50) *	186(+/- 40) *
ATS	109(+/- 11) a	152 (+/- 18) *, a	171(+/- 24) *	158(+/- 30) * a
Vitamina E	139(+/- 16) a	208(+/- 16)*	184 (+/- 24) *	204(+/- 25)*

* = significativamente diferente de la línea base dentro del grupo de tratamiento

a = significativamente diferente del grupo de tratamiento con la vitamina E

El grupo tratado con vitamina E mantuvo la mayor concentración de vitamina E para las muestras de cada período de tiempo. Todos los grupos mostraron un aumento de la vitamina E en plasma durante el transcurso del tiempo. Esto puede ser atribuido a una mayor movilización de la grasa durante el ejercicio con la incorporación concomitante de la vitamina E almacenada dentro de las lipoproteínas en circulación. Se ha demostrado previamente que el aumento de ácidos grasos y triglicéridos en plasma de perros durante un bajo nivel de ejercicio prolongado fueron concomitantes con los aumentos de vitamina E en plasma (Reynolds, AJ, et al., J Nutr. 124 (suplem.12): páginas 2754 - 2759 (1994). Mientras los grupos del placebo y de la astaxantina mantuvieron las concentraciones en vitamina E por encima de los bajos límites normales establecidos para los perros (por debajo de 60 se consideran generalmente algo bajos), la disminución en el MDA observada durante el ejercicio en el grupo tratado con la vitamina E sugiere que puede ser beneficioso el suplemento con vitamina E por encima de los niveles de la línea base encontrados en la dieta.

Los cambios en los valores de MDA sugieren que el suplemento con vitamina E puede ayudar a la protección contra el daño oxidativo durante el ejercicio mientras que el suplemento con astaxantina puede proteger contra dicho daño durante las primeras 24 horas de recuperación del ejercicio. Estos hallazgos sugieren que estos dos antioxidantes pueden tener diferentes eficacias contra diferentes tipos de estrés oxidativo. La vitamina E puede ser la más efectiva contra la oxidación de los lípidos de la membrana asociada con las elevaciones del metabolismo del oxígeno inducidas por el ejercicio. La astaxantina puede ser más efectiva contra el estrés oxidativo causado por la mayor actividad de las células inmunológicas en las 24 horas siguientes al ejercicio. Estas observaciones sugieren un potencial sinergismo si los dos anti-oxidantes se combinan.

La astaxantina se descubrió que protegía los perros de los radicales libres inmediatamente después del ejercicio y hasta las 24 horas después del ejercicio. La astaxantina ayudó a proteger contra el daño peroxidativo medido por el F21 durante el ejercicio y durante las primeras 24 horas de la recuperación. Los perros tratados con vitamina E mostraron también un aumento sobre los perros alimentados con placebo a las 24 horas después del ejercicio. El F21 mide la peroxidación de los lípidos a partir de fuentes distintas de las que son medidas mediante el MDA. Los datos del F21 recogidos aquí sugieren que la astaxantina puede proteger las células inmunológicas y los orgánulos subcelulares durante el ejercicio, mejor que la vitamina E. Puesto que los F21 son productos secundarios de las células inmunológicas, el tiempo de protección de la astaxantina sugiere que muchos de sus efectos están mediados a través de la modulación de la función celular inmunológica.

Tanto los grupos de astaxantina como los de vitamina E mostraron una disminución en el ORAC durante los períodos de tiempo cuando estos tratamientos fueron los más exitosos en la inhibición de la peroxidación de los lípidos. Una razón de que los valores ORAC de la vitamina E y de la astaxantina disminuyeran durante el ejercicio y a las 24 horas después del ejercicio, respectivamente, puede ser que los antioxidantes suplementados pueden haber sido consumidos para detener la peroxidación de los lípidos durante estos períodos de tiempo.

El hecho de que los valores de la CK fueron los más bajos en el grupo de la astaxantina durante casi todas las mediciones, sugiere que este suplemento protege las membranas celulares del músculo del daño producido durante el ejercicio, mejor que la vitamina E ó el placebo. El ejercicio en este estudio no indujo elevaciones de la CK en plasma, por encima del margen normal.

La comparación del tratamiento con el grupo placebo, tanto de la vitamina E como de la astaxantina, mostró una mayor protección contra el estrés oxidativo asociado al ejercicio. La vitamina E parece ser la más efectiva contra la producción de malondialdehído durante el ejercicio y la más efectiva contra la producción del isoprostano F-2 durante las primeras 24 horas después del ejercicio. El suplemento con astaxantina fue mejor en la disminución de la producción de MDA durante las primeras 24 horas después del ejercicio y mejor en la disminución de la producción de isoprostano durante el ejercicio y las primeras 24 horas de la recuperación. Estos hallazgos sugieren que la vitamina E y la astaxantina actúan en diferentes compartimientos celulares y o en diferentes vías de uno a otro. Indica también un potencial para, como mínimo, un efecto adicional y posiblemente un efecto sinérgico, si los dos se combinan.

El suplemento con vitamina E da como resultado una disminución en las concentraciones de malondialdehído durante el ejercicio cuando se compara con el grupo suplementado con placebo. El suplemento con astaxantina se asoció con una disminución en los malondialdehídos en las 24 horas después del ejercicio, cuando se comparó con los grupos de vitamina E y de placebo. La ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) ("capacidad de absorción de los radicales de oxígeno"), la cual es un índice del estatus antioxidante total) no aumentó ni en el suplemento con vitamina E ni en el suplemento con astaxantina durante cualquiera de los períodos de tiempo medidos. Las concentraciones de creatina quinasa (un índice del daño causado en la membrana celular del músculo) y de isoprostano F-2 (una medida de la oxidación de los lípidos a partir de las prostaglandinas), mostraron solamente diferencias significativas en las muestras del grupo tratado con astaxantina y solamente en el tiempo inmediatamente posterior al ejercicio y 24 horas después del ejercicio, en donde fueron inferiores a los valores medidos en los grupos tanto de la vitamina E como del placebo. Estos hallazgos indican que tanto la astaxantina como la vitamina E muestran algún efecto protector contra el daño oxidativo en los perros del ejercicio. La astaxantina mostró un margen más ancho de protección a lo largo de un período de tiempo mayor que la vitamina E. Los resultados descritos en la presente sugieren que una combinación de vitamina E y de astaxantina pueden tener un efecto que es por lo menos aditivo y puede ser sinérgico. Por lo tanto, se recomienda que la astaxantina se incluya en las dietas preparadas para los perros que pueden experimentar estreses oxidativos incluyendo, pero sin limitar, el ejercicio, la infección o un trauma.

Ejemplo 2

Los animales son tratados administrándoles una composición que comprende una combinación de astaxantina y vitamina E (alfa-tocoferol) para determinar el efecto sobre el estrés oxidativo debido al ejercicio.

Los perros se mantienen con la misma dieta basal (Purina Pro Plan® Performance, de fórmula pollo y arroz) durante un mes antes del comienzo y durante todo el tratamiento. Dos grupos de perros se alimentaron con la fórmula Pro Plan® Performance de pollo y arroz de comida para perros como dieta base, y cada grupo se alimentó o bien con un

placebo que consistía en aproximadamente 0,5 g de maltodextrina o bien una combinación de aproximadamente 2 mg de astaxantina y aproximadamente 400 mg de vitamina E (alfa-tocoferol). La comida Pro Plan® para perros puede adquirirse en Nestlé Purina Pet Care Company de St. Louis, Missouri. Los perros se adiestran tres veces por semana en una rueda de ejercicios durante un período de seis semanas. A la sexta semana, los perros descansaron durante cuatro días y a continuación se ejercitaron tres días en una fila. Se recogieron muestras de sangre antes del ejercicio el día uno, inmediatamente después del ejercicio el día tres y a las 24 horas y a las 48 horas después del ejercicio. El plasma de las muestras de sangre fueron analizados para determinar las concentraciones de malondialdehído, isoprostanos F-2, vitamina E, actividad de creatina quinasa así como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Las disminuciones en las medidas del estrés oxidativo y/o los aumentos en las medidas del estatus antioxidante es indicativo de efectos antioxidativos de un tratamiento dado.

Ejemplo 3

Puede efectuarse un experimento *in vitro* empleando células epiteliales de lentes oculares caninas suplementadas con astaxantina a niveles fisiológicos. Los estudios demostrarían que la astaxantina puede reducir significativamente la formación de radicales libres y los productos de peroxidación de los lípidos en el epitelio de las lentes oculares caninas cuando son estresadas con luz ultravioleta (UV). Adicionalmente, cuando las células epiteliales de las lentes oculares caninas suplementadas con astaxantina se estresan con luz UV, se producirían significativamente menos muertes de células. Los resultados indicarían que una disminución en la formación de radicales libres y de los productos de peroxidación de los lípidos, juntamente con una disminución de la muerte celular, demuestra que el suplemento con astaxantina reduce el riesgo o la gravedad de la formación de cataratas en los perros.

Ejemplo 4

Podría también efectuarse un estudio *in vivo*, para demostrar los efectos beneficiosos de la astaxantina para combatir la formación de cataratas. En un estudio modelo podrían escogerse 40 perros y agruparlo al azar bien sea en el grupo de control o bien sea para un grupo de tratamiento, que recibió AAFCO a los niveles recomendados de antioxidantes. El grupo de tratamiento recibiría astaxantina y podría también recibir uno o más entre la vitamina E, luteína, zeaxantina y zinc. Al final del tiempo de tratamiento (por ejemplo, un estudio durante dos años), se demostraría que el grupo de control tiene una significativa mayor formación de cataratas, y la gravedad de la catarata sería significativamente mayor, como se dictaminó mediante un ensayo con una lámpara slit-lamp ("lámpara con hendidura").

Ejemplo 5

Se efectuaron experimentos *in vitro*, para demostrar que la astaxantina aumenta o potencia la función del sistema inmunológico. Los ensayos *in vitro* para dictaminar la función inmunológica son ya bien conocidos por los expertos en la técnica. Se conocen muchos protocolos que pueden emplearse para efectuar dichos dictámenes de la función inmunológica. Ejemplos de dichos protocolos pueden encontrarse en varios artículos de revista y textos (por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, John E. Coligan, AdA M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, editores John Wiley & Sons, NY 1999).

Para dictaminar el efecto del suplemento de astaxantina sobre la función inmunológica, se alimentaron perros con una dieta que contenía astaxantina y/o vitamina E durante 16 semanas. La cantidad de astaxantina empleada puede ser de 0, 1, 5, 10, 20, y 40 mg por animal y por día. Pueden realizarse varios ensayos para determinar la función inmunológica.

En un ensayo, por ejemplo, pueden ser estimuladas *in vitro*, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), con un antisuero policlonal o concanavalina A (Con A), fitohemaglutinina (PHA) ó con mitógenos de "pokeweed" ("Pytholacca"). La proliferación linfática se dictamina mediante un método ya conocido.

En otro ensayo *in vitro* de proliferación linfática, la astaxantina puede añadirse directamente al medio de cultivo de células PBMC durante la estimulación para demostrar que la astaxantina aumenta la proliferación de las células significativamente más que el aumento de la proliferación observada en ausencia de astaxantina.

En otro ensayo, se dictamina la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK), para las células NK aisladas de animales que están alimentados con una dieta que incluye un suplemento de astaxantina. El ensayo de las células NK demuestra que la citotoxicidad de las NK es significativamente mayor en los animales alimentados con una dieta que contiene astaxantina en contraste con los animales de control no alimentados con astaxantina.

La hipersensibilidad de tipo retrasada puede también ser dictaminada en animales que se alimentan con una dieta suplementada con astaxantina. En estos ensayos, los animales de control y los animales alimentados con una dieta conteniendo astaxantina, reciben inyecciones cutáneas de solución salina, un mitógeno, o una vacuna del virus del moquillo. Los animales se dictaminan a continuación midiendo las reacciones de la piel al mitógeno, virus y control. En los animales que se alimentan con una dieta conteniendo astaxantina, las reacciones de la piel son más robustas para el virus y el mitógeno que las encontradas en los animales de control.

5 Los animales de control y los animales alimentados con una dieta conteniendo astaxantina pueden también ser dictaminados para determinar la robustez de la respuesta inmunológica contra un antígeno. Por ejemplo, pueden medirse los títulos de un anticuerpo contra un antígeno para los animales de control y para los animales alimentados con una dieta conteniendo astaxantina. Los animales alimentados con una dieta conteniendo astaxantina tienen títulos del anticuerpo más altos que los animales de control.

Ejemplo 6

10 La osteoartritis (OA) está también asociada con el estrés oxidativo. La OA se caracteriza por los daños producido en el cartílago articular. Esta lesión está mediada por las enzimas (MMP) que son específicas para el colágeno, la elastina y la gelatina. La regulación al alza de estas enzimas se ha demostrado que es la causa de los radicales libres, incluyendo, pero sin limitar, el óxido nítrico, el anión superóxido, y el peróxido de hidrógeno.

15 Puede demostrarse que una dieta suplementada con astaxantina reduce la inflamación y el dolor asociado en la osteoartritis. Un estudio para demostrar los efectos beneficiosos de la astaxantina en la dieta podría realizarse asignando al azar un grupo de 24 perros, bien a un grupo de control o bien a un grupo alimentado con una dieta conteniendo astaxantina al 1, 5, 10, 20 ó 40 mg por animal y por día. A las 12 semanas del tratamiento, se toman muestras del plasma y del fluido sinovial de cada animal y se analizan para determinar la actividad antioxidante total, y los niveles de malonaldehído, prostaglandina, isoprostanos, MMPs y TIMPs. Adicionalmente, puede evaluarse el modo de andar de los perros empleando el análisis estándar de la placa de fuerza. Análisis bioquímicos muestran

20 que el suplemento de astaxantina da como resultado una disminución en isoprostano, en la actividad antioxidante total y en MMPs (tanto en el plasma como en el fluido sinovial). Los perros tratados muestran una mejora significativa en la manera de andar cuando se comparan con los perros de control. Los resultados demuestran que

25 la astaxantina aumenta o retrasa la progresión de la OA en los perros.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de una composición que comprende la astaxantina y la vitamina E en la elaboración de un medicamento para el tratamiento, la reducción o la prevención del estrés oxidativo en un perro o en un gato.
2. El empleo de la reivindicación 1, en donde el estrés oxidativo resulta por lo menos como consecuencia de un ejercicio, una infección, un trauma, o una exposición a la luz del sol.
- 10 3. El empleo de la reivindicación 2, en donde el estrés oxidativo resulta como consecuencia de un ejercicio.
4. Un método in vitro para la evaluación del efecto de una sustancia sobre un estrés oxidativo en un perro o en un gato, el cual método comprende los pasos de:
- 15 a) medición de uno o más índices de estrés oxidativo en una muestra previamente obtenida a partir de un perro o de un gato, antes de y después de, el adiestramiento de acuerdo con un régimen de ejercicios, los cuales comprenden el adiestramiento del perro o del gato en una rueda de ejercicios, una noria y/o una piscina, en donde al perro o al gato se les ha administrado previamente la sustancia,
- b) comparación de las diferencias de los índices de estrés oxidativo antes y después del adiestramiento para obtener por lo menos un resultado,
- 20 c) comparación del resultado con el resultado obtenido a partir de un perro o de un gato de control al cual no le ha sido administrada la sustancia;
- en donde se considera que la sustancia tiene un efecto sobre el estrés oxidativo si los resultados difieren entre los resultados del perro o del gato tratados con la sustancia y los resultados del perro o del gato de control.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en donde los índices del estrés oxidativo comprenden uno o más de los parámetros:
- 30 concentración en plasma del malondialdehído, concentración en plasma de los isoprostatos F-2, concentración en plasma de la vitamina E, la actividad de la creatinina quinasa, o la capacidad de absorción de radicales de oxígeno.
6. Una composición que comprende la astaxantina y la vitamina E para el empleo en el tratamiento, reducción o prevención del estrés oxidativo en un perro o en un gato.
- 35 7. La composición de la reivindicación 6, en donde el estrés oxidativo resulta como consecuencia por lo menos de una de las causas siguientes: el ejercicio, una infección, un trauma o la exposición a la luz del sol.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde el estrés oxidativo resulta como consecuencia del ejercicio.