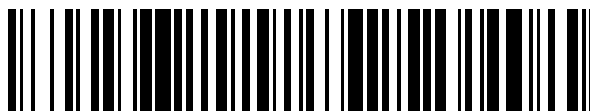


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 364**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 31/34 (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01)

A61K 31/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2001 E 01988317 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1331855**

54 Título: **Dieta para animales de compañía de edad avanzada**

30 Prioridad:

31.10.2000 US 244510 P

28.11.2000 US 253447 P

06.08.2001 US 922632

16.10.2001 US 978127

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

01.10.2013

73 Titular/es:

HILL'S PET NUTRITION, INC. (100.0%)

400 Southwest 8th Avenue

Topeka, KS 66603, US

72 Inventor/es:

ZICKER, STEVEN CURTIS y

WEDEKIND, KAREN J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 424 364 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

Dieta para animales de compañía de edad avanzada

5 Los animales de compañía tales como perros y gatos parecen sufrir problemas de envejecimiento. Algunos de estos se expresan en refranes comunes. Uno de estos es "perro viejo no aprende trucos nuevos". Este refrán surge de la observación de que cuando el perro envejece parece disminuir su capacidad mental así como sus capacidades físicas. Parece que disminuyen las actividades mentales asociadas con el pensamiento, aprendizaje y memoria (Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW Cotman CW 1996: The canine as an animal model of human aging and dementia; *Neurobiology of aging* 17:259-268). Además, el cambio de comportamiento se puede poner de manifiesto en los animales que envejecen asociado con los cambios en la capacidad mental. Se han atribuido 10 muchas causas a esta disminución de la capacidad mental.

El documento 00/44375 describe composiciones antioxidantes para animales de compañía para prevenir o tratar un trastorno de estrés oxidativo.

15 Ahora se ha demostrado que la presencia de niveles significativos de al menos un antioxidante en la dieta de un animal de compañía de edad avanzada inhibe el deterioro de la capacidad mental de un animal de compañía que envejece.

Resumen de la invención

20 De acuerdo con la invención hay una dieta para animales de compañía que cumple los requisitos nutricionales habituales de una mascota de edad avanzada y que además comprende una cantidad suficiente de un antioxidante o mezclas de los mismos, para usar en la inhibición del deterioro de la capacidad mental de un animal de compañía de edad avanzada.

También está de acuerdo con la invención una dieta para animales de compañía de edad avanzada que cumple los requisitos nutricionales habituales de la mascota de edad avanzada y que además comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en vitamina E, vitamina C, ácido alfa-lipoico, l-carnitina y cualquiera de sus mezclas en cantidades suficientes para inhibir el deterioro de la capacidad mental del animal de compañía de edad 25 avanzada.

Otro aspecto más de la invención es una dieta para animales de compañía para usar para aumentar la capacidad mental de un animal de compañía de edad avanzada, que comprende una cantidad de un antioxidante o mezclas de los mismos, suficiente para aumentar la capacidad mental.

Descripción detallada de la invención

30 La dieta que se proporciona al animal de compañía de edad avanzada, por ejemplo perros y gatos, es la dieta normal estándar que se proporciona a un animal de esa edad. A continuación se da una dieta típica para un perro de al menos 7 años de edad.

Tabla 1

Componente	Objetivo
Proteínas (% de materia seca)	19,5
Grasa (% de materia seca)	10
Fósforo (% de materia seca)	0,5
Sodio (% de materia seca)	0,2

35 La adición de cantidades significativas de un antioxidante y mezclas de los mismos a la dieta de animales de compañía puede producir cambios significativos y demostrativos en el comportamiento, en particular en la capacidad mental, como se muestra específicamente por la capacidad de resolver problemas, en una mascota de edad avanzada. La expresión edad avanzada se pretende que signifique, en general, un perro de al menos 7 años y un gato de al menos 7 años.

40 La pérdida de la capacidad mental de perros y gatos se ha observado durante una serie de años. Esta pérdida de la capacidad mental se pone de manifiesto de numerosas formas. Para un perro, por ejemplo, se puede poner de manifiesto como desorientación, ensuciamiento de la casa, patrones de sueño-vigilia alterados, menor interacción con los miembros de la familia y las mascotas, e incapacidad para aprender o concentrarse. Estos trastornos también se pueden poner de manifiesto en gatos. El Alzheimer, como se presenta en el hombre, no se ha encontrado en perros y gatos.

45 Se han desarrollado muchas teorías para esta pérdida de la capacidad mental. Hasta la fecha, los autores de la

invención desconocen cualquier línea de acción dietética que inhiba esta pérdida de capacidad mental o que pueda producir realmente un cambio positivo en la capacidad mental, medida por un parámetro objetivo.

Los autores de la invención han logrado esto. Mediante el uso de la dieta de su invención, se ha demostrado que la capacidad mental que se deteriora en los perros que envejecen se puede inhibir, y, medida por la capacidad de resolver problemas, se puede potenciar. Esencialmente, se puede invertir el deterioro de la capacidad mental. La capacidad mental de una mascota de edad avanzada que necesita dicho tratamiento se puede aumentar. Se puede mejorar la resolución de problemas, demostrado por la memoria y capacidad de aprendizaje. Se puede potenciar el estado de alerta mental general. Se puede ralentizar el deterioro cognitivo relacionado con la edad. Con respecto al síndrome de disfunción cognitiva, su avance se puede ralentizar en los perros de edad avanzada y se pueden controlar los signos clínicos asociados con este síndrome. La profilaxis cuando sea adecuada y las mascotas que necesitan este o estos componentes son el grupo objetivo.

El componente en la dieta que logra esto es un antioxidante o mezclas de los mismos. Un antioxidante es un material que inactiva un radical libre. Los ejemplos de dichos materiales incluyen alimentos tales como Ginkgo Biloba, pulpa cítrica, pulpa de uva, pulpa de tomate, zanahoria y espinaca, todos preferiblemente deseados, así como varios otros materiales tales como beta-caroteno, selenio, coenzima Q10 (ubiquinona), luteína, tocotrienoles, isoflavonas de soja, S-adenosilmetionina, glutatión, taurina, N-acetilcisteína, vitamina E, vitamina C, ácido alfa-lipoico, l-carnitina y similares. La vitamina E se puede administrar como un tocoferol o una mezcla de tocoferoles y diferentes derivados de los mismos tales como ésteres, como acetato, succinato, palmitato de vitamina E y similares. La forma alfa es preferida, pero se pueden incluir formas beta, gamma y delta. La forma d es preferible pero son aceptables las mezclas racémicas. Las formas y derivados funcionarán con una actividad de tipo vitamina E después de ser ingeridas por la mascota. La vitamina C se puede administrar en esta dieta como ácido ascórbico y sus diferentes derivados tales como sales de fosfato de calcio, sal de colesterilo, 2-monofosfato y similares, que funcionarán con una actividad de tipo vitamina C después de ser ingeridos por la mascota. Pueden estar en cualquier forma, tal como forma líquida, semisólida, sólida, y estable al calor. El ácido alfa-lipoico se puede administrar en la dieta como ácido alfa-lipoico o como un derivado lipoato, como en la patente de EE.UU. 5.621.117, mezclas racémicas, sales, ésteres o amidas del mismo. La L-carnitina se puede administrar en la dieta y se pueden usar diferentes derivados de carnitina tales como las sales tales como el hidrocloreuro, fumarato y succinatos, así como carnitina acetilada, y similares.

Las cantidades administradas en la dieta, todas en % en peso (basado en materia seca) de la dieta, se calculan como el material activo, per se, que se mide como material libre. Las cantidades máximas usadas no deben producir toxicidad. Se puede usar al menos aproximadamente 100 ppm o al menos aproximadamente 150 ppm de vitamina E. Se puede usar un intervalo preferido de aproximadamente 500 ppm a 1000 ppm. Aunque no es necesario, normalmente no se supera un máximo de aproximadamente 2000 ppm o aproximadamente 1500 ppm. Con respecto a la vitamina C, se usan al menos aproximadamente 50 ppm, de forma conveniente al menos aproximadamente 75 ppm y de forma más conveniente al menos aproximadamente 100 ppm. Se puede usar un máximo no tóxico. La cantidad de ácido alfa-lipoico puede variar desde al menos aproximadamente 25 ppm, de forma conveniente al menos aproximadamente 50 ppm, de forma más conveniente aproximadamente 100 ppm. Las cantidades máximas pueden variar de aproximadamente 100 ppm a 600 ppm o a una cantidad que sigue siendo no tóxica para la mascota. Un intervalo preferido es de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 200 ppm. Para la l-carnitina un mínimo útil es aproximadamente 50 ppm, de forma conveniente aproximadamente 200 ppm, de forma más conveniente aproximadamente 300 ppm para perros. Para gatos se pueden usar mínimos ligeramente mayores de l-carnitina, tal como aproximadamente 100 ppm, 200 ppm y 500 ppm. Se puede usar una cantidad máxima no tóxica, por ejemplo menos de aproximadamente 5000 ppm. Para perros, se pueden usar cantidades menores, por ejemplo, menos de aproximadamente 5000 ppm. Para perros un intervalo preferido es de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 400 ppm. Para gatos, un intervalo preferido es de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 600 ppm.

Se puede usar aproximadamente 1-15 ppm de beta-caroteno.

Se puede usar de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 ppm de selenio.

Se puede usar al menos aproximadamente 5 ppm de luteína.

Se puede usar al menos aproximadamente 25 ppm de tocotrienoles.

Se puede usar al menos aproximadamente 25 ppm de coenzima Q10.

Al menos aproximadamente 50 ppm de S-adenosilmetionina.

Se puede usar al menos aproximadamente 1000 ppm de taurina.

Se puede usar al menos aproximadamente 25 ppm de isoflavonas de soja.

Se puede usar al menos aproximadamente 50 ppm de N-acetilcisteína.

Se puede usar al menos aproximadamente 50 ppm de glutatión.

Se puede usar al menos 50 ppm de extracto o 1% de la dieta, de Ginko Biloba.

5 A continuación se dan ingredientes en bruto que tienen un alto contenido de CARO (capacidad de absorción de radicales oxígeno). Cuando se añadían a la dieta en inclusiones de 1% (para una sustitución total de 5% de un ingrediente de CARO baja tal como el maíz), aumentaban el contenido de CARO de la dieta total y aumentaban el contenido de CARO del plasma de los animales que ingerían la dieta que contenía estos componentes. Preferiblemente, se podría usar cualquier ingrediente con un contenido de CARO >25 μmol de equivalentes de Trolox por gramo de materia seca si se añade en una combinación de 1% con otros cuatro ingredientes al 1% para un total de 5% de adición a la dieta.

10 Pulpa de espinaca
Pulpa de tomate
Pulpa cítrica
Pulpa de uva
Gránulos de zanahoria

15 Brócoli
Té verde
Ginko Biloba
Harina de gluten de maíz

Ejemplo 1

20 Todos los perros eran beagle de 7 años o mayores. Los componentes nutricionales de la dieta de control y de ensayo eran aproximadamente los mismos que los de la dieta típica descrita antes en la tabla 1. Sin embargo, la dieta de control contenía 59 ppm de vitamina E y <32 ppm de vitamina C. La dieta de ensayo tenía 900 ppm de vitamina E y 121 ppm de vitamina C, 260 ppm de l-carnitina y 135 ppm de ácido alfa-lipoico.

25 A doce perros beagles de edad avanzada se les dio una batería de tareas de resolución de problemas iniciales antes de ponerlos en un grupo de control o de dieta de ensayo enriquecida. Los animales de edad avanzada se emparejaron de forma correspondiente con respecto al aprendizaje (discriminación inversa) y memoria (retraso no correspondiente a posición [DNMP] y retraso no correspondiente a la muestra [DNMS]). Se usó un ensayo T para comparar los dos grupos de perros en el valor inicial del aprendizaje de las tareas de aprendizaje de discriminación inversa, DNMP y DNMS. Los resultados no eran significativos. Por lo tanto, los perros se emparejaron de forma correspondiente basándose en la cognición antes de la intervención de la dieta. Aproximadamente 1 mes después de empezar la dieta, la primera tarea de resolución de problema dada a los perros era una tarea de aprendizaje de discriminación de puntos de referencia, que es una prueba de atención espacial (Milgram et al., 1999 Milgram, N.W., Adams, B., Callahan, H., Head, E., Mackay, B., Thirlwell, C., & Cotman (1999), C.W. Landmark Discrimination Learning in the Dog. *Learning & Memory*, 6:54-61).

35 El aprendizaje de discriminación de puntos de referencia requiere que los sujetos seleccionen un objeto particular basándose en la proximidad a un objeto. Sin embargo, el aprendizaje inicial se basa en la capacidad del perro para aprender una tarea de discriminación de objetos. Los autores de la invención encontraron previamente que los efectos de la edad en el aprendizaje de discriminación dependían de la dificultad de la tarea, y tienen pruebas que indican que el aprendizaje de discriminación de puntos de referencia está notablemente deteriorado en perros de edad avanzada.

40 Cuando se compararon los animales de edad avanzada de la dieta de ensayo enriquecida y los de la dieta de control en las tareas de aprendizaje de discriminación de puntos de referencia, había una diferencia muy significativa entre los grupos ($p < 0,02$). Los animales de la dieta enriquecida conseguían la tarea con menos errores que los animales de la dieta de control. Mientras que los 6 animales de la dieta potenciada podían cumplir el criterio de aprendizaje en 40 sesiones, solo 3 de los 6 animales de la dieta de control eran capaces de cumplir el criterio de aprendizaje. Además, los 3 perros que eran capaces de resolver el problema cometían más errores que los perros que recibían la dieta enriquecida.

50 Los perros en el grupo de la dieta de control y la de ensayo enriquecida, después de completar el aprendizaje de discriminación de puntos de referencia, se sometieron a un ensayo en una tarea de rareza. Esta tarea implica presentar a los perros 3 objetos que cubren las 3 cajas de alimento. Dos de estos objetos son idénticos y uno es diferente. Para obtener una recompensa de alimento, los perros deben seleccionar el objeto extraño. Los perros de la dieta de ensayo enriquecida aprendían esta tarea con significativamente menos errores que los perros de la dieta de control ($p < 0,003$ para las 4 puntuaciones del ensayo de rareza combinados).

Ejemplo 2

55 Los perros beagles ($n=28$) se entrenaron previamente en una tarea de discriminación de tamaños y se clasificaron según los errores respecto a los criterios de aprendizaje de esta tarea. Después los perros se estratificaron por categorías en grupos de 3 y se asignaron aleatoriamente a una de tres dietas basándose en las puntuaciones de

cognición previas. Todos los perros reclutados en este estudio tenían más de 7 años de edad. Se dio a los perros uno de los tres alimentos secos que variaban en el contenido de vitamina E y se inició el protocolo de puntos de referencia

Tabla 2

Dieta N°	Vitamina E	Vitamina C	L-Carnitina	Ácido lipoico
1	799 ppm	114 ppm	294 ppm	135 ppm
2	172 ppm	< 32 ppm	42 ppm	no añadido
3	57 ppm	< 32 ppm	13 ppm	no añadido

5 El protocolo de discriminación de puntos de referencia consistía en tres fases de ensayo (puntos de referencia 0, 1, 2) que requerían que los perros alcanzaran un criterio de paso (8/10 correctos para 2 días en una fila seguido de 7/10 de media para los siguientes 3 días) antes de pasar a la siguiente fase del ensayo. Se dejó a cada perro 40 días con 10 ensayos por día para aprender cada fase. El análisis de MANOVA repetido puso de manifiesto un efecto general significativo de la dieta en los errores respecto a las puntuaciones de los criterios ($P < 0,05$). El análisis de regresión de la suma de los errores para los puntos de referencia 1+2 frente al contenido de vitamina E de la dieta, puso de manifiesto una pendiente de regresión significativa ($P < 0,05$) cometiendo los perros de la dieta de mayor contenido de vitamina E la menor cantidad de errores (media = 65) y los de la dieta de menor contenido de vitamina E la mayor cantidad de errores (media = 170).

Ejemplo 3

15 En este estudio se usaron 30 perros adultos de procedencia aleatoria. Los perros tenían al menos 10 meses de edad, no estaban preñados, no eran lactantes y tenían un peso corporal razonable antes de iniciar el ensayo. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos para el tratamiento dietético, con 3 machos y 3 hembras en cada grupo.

20 Se dio a todos los perros un alimento de control (0 ppm de ácido dl-alfa-lipoico) que cumplía o superaba todas las recomendaciones de nutrientes propuestas por la Asociación americana de controladores de alimentos (American Association of Feed Control Officials, AAFCO 2000) durante un periodo de 2 semanas de prealimentación (tabla 1). Después del periodo de prealimentación, los perros se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento con una de las siguientes inclusiones objetivo de ácido dl-alfa-lipoico (basado en la materia seca): 0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 3000 ppm, 4500 ppm. En todas las dieta, de control y de ácido alfa-lipoico, se añadió vitamina E y estaba presente en un nivel de 600-1000 unidades internacionales y la vitamina C se añadió en niveles de 100-200 ppm.

30 Los alimentos de ensayo eran la única fuente de nutrientes salvo por el agua. Se proporcionó agua corriente a voluntad. Después de seleccionar los perros y recoger los pesos corporales iniciales, se calculó una dosis de alimento para cada perro basándose en la EM (energía metabolizable) esperada del alimento. Los cálculos de la dosis de alimento inicial se basaban en el requisito de energía de mantenimiento (REM) para el perro modificado por un factor para tener en cuenta la actividad normal, calculada por la siguiente fórmula:

$$\text{REM (kcal/día)} = 1,6 \times \text{RER (requisito de energía en reposo)}$$

donde: $\text{RER (kcal/día)} = 70 \times \text{peso corporal (kg)}^{0,75}$

35 Se pesó a los perros semanalmente y tenían dosis de alimento ajustadas según la necesidad con el fin de darles suficiente comida para mantener su peso corporal óptimo. Se determinó que el peso corporal óptimo era 3 en una escala de 5 puntos. Si el perro no mantenía el peso corporal dentro de -10% del peso corporal inicial, después de ajustar la dosis de alimento, se retiraba del estudio. Se registraron todas las medidas de peso corporal e ingestión de alimento.

40 Las muestras se trituraron y se extrajeron 0,100±0,001 g de muestra dos veces en 5,0 ml de tampón fosfato (Na_2HPO_4 10 mM, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 2 mM, NaCl al 0,9%, pH 7,4)⁴. Se pusieron 250 µl de extracto en un tubo de vidrio de centrífuga de 5 ml con un tapón revestido de teflón. Se añadieron 15 µl de disolución de EDTA (EDTA 100 mM, ajustado a pH 7,8 con NaOH ~1 M) y 50 µl de ditioeritrol (DTE) 5 mM recién preparado. Las disoluciones se mezclaron en mezclador de vórtice y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Después, se añadieron 10 µl de H_3PO_4 1 M y se añadieron 2,0 ml de éter dietílico. Los tubos se taparon, se mezclaron en mezclador de vórtice y se centrifugaron a 1500 x g durante 3 min a temperatura ambiente. La capa de éter se transfirió a un tubo de vidrio de centrífuga de 5 ml separado, mientras que la capa acuosa se extrajo dos veces más con 1,5 ml de éter. Se combinaron todas las extracciones de la misma muestra. Los extractos después se secaron en un evaporador de nitrógeno en un baño de agua a temperatura ambiente. En este punto, las muestras se taparon y se congelaron durante la noche.

- Los extractos secados después se descongelaron y se reconstituyeron con 70 μ l de disolución de SDS/EDTA (dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,11%, EDTA 15 mM, NaCl al 0,9%) y 5 μ l de DTE 1 mM recién preparado. Después se añadieron 50 μ l de NaBH₄ recién preparado a cada tubo. Los tubos se mezclaron en mezclador de vórtice y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después de 10 min, las muestras se congelaron a -70°C. Antes de descongelar las disoluciones se añadieron 20 μ l de HCl 2 M. Después de descongelar las disoluciones, se añadieron 800 μ l de NH₄HCO₃ 100 mM. Las disoluciones se mezclaron en mezclador de vórtice y se añadieron 5 μ l de monobromobimano (mBBR) en disolución de acetonitrilo. Después las disoluciones se incubaron en la oscuridad durante 90 min a temperatura ambiente.
- Se separó el exceso de mBBR y el derivado de DTE de las muestras después de incubación por extracción con 1,5 ml de diclorometano. La capa acuosa se puso en el HPLC. El ácido lipoico se separó usando una fase móvil que consistía en acetonitrilo al 30%, ácido acético al 1%, ajustado a pH 3,95 con NH₄OH ~2 M y se bombeó con un caudal de 1,0 ml/min con una elución isocrática durante 15 min por inyección. Esta preparación supone que la densidad del alimento extruido es igual a 1 g/ml.
- Se recogió sangre de forma aséptica para el hemograma completo y el análisis bioquímico de la sangre 2 semanas antes del inicio y otra vez los días 0, 28, 56, 84, 112, 140 y 168 del estudio. Además, se recogieron 15 ml de sangre entera para aislar los linfocitos los días 0, 28 y 84 del procedimiento dietético.
- La sangre entera heparinizada se puso en capas en un tubo de centrifuga cónico Accuspin de 50 ml (Sigma Chemical) y se añadió un volumen igual de disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Las muestras se centrifugaron a 700g durante 30 min sin frenado. Se recogió la capa de monocitos, se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml, se volvió a suspender en 1-3 ml de PB y se centrifugó como antes (primer lavado). Se llevó a cabo un segundo lavado como el primer lavado. Finalmente, se recogieron las células y se suspendieron en ácido perclórico (al 10% en p/v) y se congelaron a -70°C hasta el análisis.
- Las muestras se transfirieron del congelador a -70°C a un enfriador con hielo seco en el mismo. Los viales se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 min en una centrifuga refrigerada. Se transfirió una parte alícuota de líquido sobrenadante para el análisis de glutatión (GSH) a un tubo de ensayo cónico.
- La derivatización de los extractos solubles en ácido se hizo por el método de Reed y colaboradores (Fariss et al.) según la modificación de Jones (Jones et al.).
- Brevemente, se añadieron 150 μ l de extracto o de referencias externas a un tubo Eppendorf de 1,5 ml seguido de la adición de 20 μ l de referencia interna γ -glu-glu y 50 μ l de IAA seguido de mezcla. La disolución se ajustó a pH ~10 (color púrpura) usando disolución de trabajo de KOH-KHCO₃. Las disoluciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió reactivo de Sanger con el mismo volumen que el volumen total y la disolución se incubó durante la noche (20 h) en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Después de incubación, la disolución se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min con transferencia del líquido sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron 200 μ l de líquido sobrenadante a un Autovial ámbar que tenía una entrada de 300 μ l, con la parte superior fijada con una pinza de enganche para el análisis por HPLC.
- Los disolventes y las condiciones de separación eran como se han descrito (Fariss, Jones). Se cuantificaron los niveles de GSH y GSSG con respecto a las referencias auténticas. Se usó el gamma-glutamyl-glutamato como referencia interna para evaluar la eficacia de la derivatización.
- La comparación de los valores de la química clínica, hematología y pesos corporales frente a los valores iniciales se analizó mediante el ensayo t para datos pareados en SAS para Windows con nivel de significación fijado en P<0,05. Las medias de los valores en cada tiempo de medición medido se separaron por un ANOVA de un factor con nivel de significación fijado en P<0,05. Se analizó la diferencia en GSH:GSSG entre el día 84 y el valor inicial entre los grupos mediante SAS para Windows en un ANOVA de un factor con nivel de significación fijado en P<0,05.
- ### Resultados
- Las concentraciones de ácido lipoico (ppm) en el alimento determinadas a lo largo de 7 ensayos sucesivos (días 0, 28, 56, 84, 112, 140, 168) estaban dentro del intervalo de la sensibilidad esperada del ensayo y los parámetros de producción encontrados típicamente en las instalaciones de los autores de la invención (Tabla 1).
- Los datos de ingestión de alimento no eran destacables. La mayoría de los animales en todos los grupos ingirieron más alimento a los 6 meses, como media, que al principio del estudio. Los datos de peso corporal no eran destacables excepto que se produjo algo de pérdida de peso inicialmente en el grupo de inclusión de 4500 ppm pero este cambio parecía invertirse a los 6 meses de tiempo. Las puntuaciones del estado corporal no aparecían afectadas por esta pérdida pequeña de peso.
- Los exámenes físicos rutinarios no pusieron de manifiesto ninguna prueba de nutrición relacionada con anomalías o toxicidad del ácido dl-alfa-lipoico. Todos los animales en la población del estudio permanecieron normales durante todo el transcurso del estudio. Se observó el vómito ocasional en algunos animales durante el transcurso del

estudio; sin embargo, no se observó una tendencia que condujera a la conclusión de que el vómito se pudiera atribuir al ácido lipoico. Un animal en el grupo de inclusión más alto se retiró del estudio el día 21 por pérdida de peso y leucocitosis. La leucocitosis en este animal no se había resuelto al final del estudio y se sospecha que es atribuible a algún otro proceso patológico.

5 Cuando se compararon los valores bioquímicos del suero los días 28, 56, 84, 112, 140 y 168 con los valores iniciales para el mismo grupo de perros, se observaron varias diferencias estadísticas, sin embargo, ninguna de ellas se consideró biológicamente significativa porque estos valores estaban dentro o eran muy cercanos al intervalo de referencia del laboratorio y se observaron tendencias constantes a lo largo de los meses. Las comparaciones entre los controles y los otros grupos de tratamiento en cada periodo de tiempo también pusieron de manifiesto diferencias estadísticas, sin embargo, ninguna de estas se consideró biológicamente significativa porque estos valores estaban dentro o eran muy cercanos a los intervalos de referencia del laboratorio clínico y no había tendencias presentes.

10 Cuando se compararon los valores de hematología los días 28, 56, 84, 112, 140 y 168 con los valores iniciales para el mismo grupo de perros, se observaron varias diferencias estadísticas; sin embargo, ninguna de ellas se consideró biológicamente significativa porque estos valores estaban dentro o eran muy cercanos al intervalo de referencia del laboratorio y no había tendencias presentes. La comparación entre los grupos de control y los otros grupos de tratamiento en cada periodo de tiempo, puso de manifiesto varias diferencias estadísticas; sin embargo, ninguna de estas se consideró biológicamente significativa porque estos valores estaban dentro o eran muy cercanos a los intervalos de referencia del laboratorio clínico y no había tendencias presentes.

Relación GSH:GSSG

20 El cambio en la relación de GSH:GSSG a lo largo de 84 días de alimentación, presentaba un efecto global significativo de la dieta ($P=0,024$), teniendo todos los grupos de alimento enriquecido un aumento de la relación (Tabla 2). El ANOVA puso de manifiesto una diferencia significativa, comparado con el alimento base, para las inclusiones más baja y más alta, sin embargo, el mayor aumento numérico estaba en el nivel de inclusión más bajo. Es decir, los cambios en la relación de GSH:GSSG para la inclusión más alta y más baja eran significativamente diferentes del cambio observado a lo largo de este mismo periodo de tiempo en el alimento base. Las relaciones para 4 puntos no se pudieron determinar el día 84, ya que el GSSG no era detectable en ninguna de estas muestras (1 grupo de control, 3 de tratamiento). Como tal, los valores de los grupos de alimento enriquecido podrían haber presentado relaciones incluso mayores de GSH:GSSG si el ensayo hubiera sido suficientemente sensible para detectar los niveles bajos de GSSG el día 84.

30

Tabla 1

Tasa de inclusión (ppm)	Media	Desviación típica	Porcentaje objetivo
0	24	17	NA
150	151	13	101
1500	1471	113	98
3000	2869	250	96
4500	4176	642	93

Tabla 2

Cambio en la relación media de GSH:GSSG desde el día 0 al día 84 en perros que consumen ácido dl-alfa-lipoico en un alimento extruido.			
Inclusión	Diferencia en la relación GSH:GSSG de d 0 a d 84 comparado con el alimento inicial	N	valor P
0 ppm	-9,2 ± 26	5*	NA
150 ppm	70 ± 20	6	0,003
1500 ppm	24 ± 7	6	0,16
3000 ppm	10 ± 4	4*	0,46
4500 ppm	50 ± 36	4*	0,03

*1 perro en el grupo de control y en el de 4500 ppm no tenían GSSG detectable el día 84, mientras que 2 perros en el grupo de 3000 ppm no tenía GSSG detectable el día 84.

Son pertinentes otras observaciones con respecto al ácido alfa-lipoico. La alimentación crónica de ácido alfa-lipoico

5 en la dieta es segura y eficaz. Mejora la relación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). La
administración crónica de ácido alfa-lipoico puede ser durante periodos de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 meses como mínimo
hasta un periodo de 1, 2, 3, 4, 5 años o incluso más, incluyendo la vida entera del animal. El ácido alfa-lipoico
funciona sin ninguna protección especial en la dieta tal como la encapsulación y no es necesario que esté en la dieta
en una forma de dosificación unitaria tales como las usadas en productos farmacéuticos por ejemplo en comprimido,
píldora, cápsula y similares. El ácido lipoico se proporciona en la dieta en una cantidad mínima de aproximadamente
25, 50, 75 ó 100 ppm de la dieta. El intervalo superior está justo por debajo de su nivel tóxico, siempre por debajo de
aproximadamente 400, 300 ó 200 ppm de la dieta. En general, no se va más allá de aproximadamente 6 ó 7 mg/kg
de peso corporal del animal por día, más en general no por encima de aproximadamente 5. El ácido alfa-lipoico
10 mejora la capacidad de defensa antioxidante así como la capacidad del animal para resistir el daño oxidativo. Todo
esto se hace con las cantidades adecuadas de otros antioxidantes presentes tales como vitamina E y vitamina C.
Esto demuestra que la acción del ácido lipoico va más allá de la de la vitamina C y/o vitamina E.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una dieta para animales de compañía que cumple los requisitos nutricionales ordinarios para una mascota de edad avanzada, en la que la dieta además comprende una cantidad suficiente de un antioxidante o mezcla de los mismos, para usar para inhibir el deterioro de la capacidad mental de un animal de compañía de edad avanzada.
- 5 2.- Una dieta para animales de compañía que cumple los requisitos nutricionales ordinarios para una mascota de edad avanzada, en la que la dieta además comprende una cantidad suficiente de un antioxidante o mezcla de los mismos, para usar para aumentar la capacidad mental de un animal de compañía de edad avanzada.
- 3.- Una dieta para usar según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la mascota es un perro.
- 4.- Una dieta para usar según la reivindicación 3, en la que el perro tiene al menos siete años.
- 10 5.- Una dieta para usar según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la mascota es un gato.
- 6.- Una dieta para usar según la reivindicación 5, en la que el gato tiene al menos siete años.
- 7.- Una dieta según cualquier reivindicación precedente, en la que el antioxidante se selecciona del grupo que consiste en vitamina C, ácido alfa-lipoico, l-carnitina o mezclas de los mismos.
- 15 8.- Una dieta para usar según cualquier reivindicación precedente, en la que la vitamina E está presente en la dieta en al menos aproximadamente 100 ppm de la dieta.
- 9.- Una dieta para usar según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que hay al menos aproximadamente 50 ppm de vitamina C en la dieta.
- 10.- Una dieta para usar según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que hay al menos aproximadamente 25 ppm de ácido alfa-lipoico en la dieta.
- 20 11.- Una dieta para usar según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que están presentes al menos aproximadamente 50 ppm de l-carnitina en la dieta.
- 12.- Una dieta para usar según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en la que la dieta comprende al menos aproximadamente 100 ppm de vitamina E, al menos aproximadamente 50 ppm de vitamina C, al menos aproximadamente 25 ppm de ácido alfa-lipoico y al menos aproximadamente 50 ppm de l-carnitina en la dieta.
- 25 13.- Una dieta para usar según cualquier reivindicación precedente, en la que el uso comprende aumentar la capacidad de aprendizaje de un animal de compañía de edad avanzada.