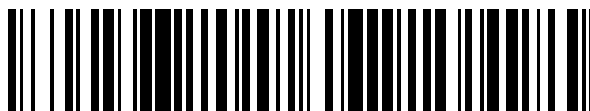


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 648**

51 Int. Cl.:

A61K 31/075 (2006.01)

A61K 36/45 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008** **E 08799127 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2200597**

54 Título: **Método para mejorar el estrés oxidativo y la memoria de trabajo mediante la administración de pterostilbeno**

30 Prioridad:

07.09.2007 US 970591 P

10.06.2008 US 136341

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

14.01.2015

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
AGRICULTURE (100.0%)
1400 INDEPENDENCE AVENUE SW
WASHINGTON, DC 20250-0302, US**

72 Inventor/es:

**JOSEPH, JAMES A.;
RIMANDO, AGNES M. y
SHUKITT-HALE, BARBARA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 526 648 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

Método para mejorar el estrés oxidativo y la memoria de trabajo mediante la administración de pterostilbeno

5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a un método de uso de pterostilbeno administrado a un sujeto en cantidad efectiva para prevenir, evitar y revertir los efectos del envejecimiento neuronal y conductual y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. El pterostilbeno, análogo del resveratrol, es particularmente efectivo para revertir los déficits
10 motores y mejorar la memoria de trabajo de los sujetos.

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

Los suplementos dietéticos con frutas y hortalizas son eficaces para prevenir y revertir los defectos relacionados con el envejecimiento de un sujeto. Los regímenes nutricionales que incluyen suplementos dietéticos con bayas (p.ej. las del género *Vaccinium*, como los arándanos dulces y agrios) revierten y/o previenen los cambios motores y cognitivos relacionados con el envejecimiento. Así por ejemplo, el suplemento con bayas previene los déficits conductuales cognitivos en ratones que tienen una mayor producción de péptido β -amiloide con mutaciones en APP/PS-1 (Joseph JA. y otros, 2003. Nutr. Neurosci., 6: 153-162). Los efectos beneficiosos de las bayas implican acciones directas e indirectas contra los agentes estresantes. Por ello es necesario identificar aquellos compuestos contenidos en las bayas que son efectivos para arreglar los cambios de función motora y cognitiva por intermediación oxidativa.

El *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno (designado en lo sucesivo como resveratrol) se ha identificado como un compuesto poseedor de múltiples propiedades antienvjecimiento debidas a su fuerte actividad antioxidante. En ensayos in vitro se ha demostrado que el resveratrol es un captador eficaz de radicales libres e inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Brito P. y otros, 2002. Free Radic Res. 36(6):621-631). Otros estilbenoides como pinoestilbeno, desoxirrapontigenina, pteroestilbeno, resveratrol trimetiléter y piceatanol tienen un grado variable de actividad y efectividad biológica para rebajar los niveles de lípidos mediante la activación de un receptor nuclear, la isoforma alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas.

Se ha demostrado que el *trans*-3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno (designado en lo sucesivo como pteroestilbeno), un éter metílico natural análogo del resveratrol, tiene una actividad antioxidante similar a la del resveratrol (Rimando y otros, 2002. J. Agric. Food Chem. 50:3453-3457; Stivala y otros, 2001. J. Biol. Chem. 276 (25):22586-22594). El pteroestilbeno se halla en algunos frutos, tales como las uvas (Adrian y otros, 2000. J. Argic. Food Chem. 48:6103-6105) y las bayas del género *Vaccinium* (*Vaccinium ashei* Reade y *Vaccinium stamineum* L.) (Rimando y otros, 2004. J. Argic. Food Chem. 52:4713-4719), así como en plantas leñosas (Maurya y otros, 1977. J. Nat. Prod. 47: 179-181; Amone y otros, 1977. J. Chem. Soc. Perkins Trans. 19:2116-2118). Además hay una serie de plantas que contienen pteroestilbeno, incluyendo las especies *Anogeissus acuminata*, *Dracaena cochinchinensis*, *Dracaena loureiri*, *Guibourtia tessmannii*, *Pterocarpus macrocarpus*, *Pterocarpus marsupium*, *Pterocarpus santalinus*, *Vaccinium ashei*, *Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium deliciosum*, *Vaccinium membranaceum*, *Vaccinium ovatum*, *Vaccinium ovalifolium*, *Vaccinium parviflorum*, *Vaccinium stamineum*, *Vaccinium uliginosum* y *Vitis vinífera*. El pteroestilbeno también se encuentra en fuentes no botánicas como el própolis.

El nivel de pteroestilbeno puede variar entre las especies de bayas del género *Vaccinium*. Tal como reseñaron Rimando y otros, 2004. J. Argic. Food Chem. 52:4713-4719, por medio de cultivos de bayas del género *Vaccinium* se hallaron concentraciones de pteroestilbeno de 99 ng/g hasta 520 ng/g de muestra seca. Como también reseñaron Rimando y otros, Acta Hort. (ISHS). 680:137-143, en bayas liofilizadas procedentes de nueve cultivos de especies de *Vaccinium* se hallaron 0,12 μ g a 2,74 μ g de pteroestilbeno por gramo de baya. Análogamente la concentración de pteroestilbeno varía en las diversas especies de arándanos. Se ha reportado que a partir de un gramo de arándanos liofilizados se puede obtener pteroestilbeno en un intervalo de concentración de 99 ng hasta 475 ng.

Se han estudiado los efectos de los antioxidantes en los procesos dañinos del envejecimiento cerebral y conductual. La combinación de antioxidantes/antiinflamatorios polifenólicos que se encuentra en frutos y hortalizas en forma de "compuestos químicos secundarios", y que generalmente no interviene en el metabolismo primario de las plantas, ha resultado eficaz para prevenir dichos efectos dañinos. Por ello es asimismo necesario identificar frutos y plantas, y de modo específico los compuestos capaces de proteger contra los desarreglos del envejecimiento y las deficiencias cognitivas.

El compuesto pteroestilbeno ha manifestado una inhibición moderada de la ciclooxigenasa-1 y una inhibición débil de la ciclooxigenasa-2, lo cual sugiere que tiene actividad antiinflamatoria (Rimando y otros, 2002. J. Agric. Food Chem. 50:3453-3457). Además se ha visto que el pteroestilbeno activa la isoforma alfa activada por proliferadores de peroxisomas (PPAR α) de un receptor que ha sido propuesto como mediador en la reducción de los niveles de lípidos y de glucosa. En Rimando y otros, 2005. J. Agric. Food Chem. 53:3403-3407 y en US2006/005723A1, ambos incorporados aquí como referencia, se revelan detalles del efecto agonista del pteroestilbeno en el PPAR α .

El pteroestilbeno ha sido identificado como un compuesto que inhibe la carcinogénesis del colon. En particular el pteroestilbeno ha suprimido el crecimiento inducido por azoximetano de focos de cripta aberrantes en el colon de ratas F344 macho destetadas. Además el pteroestilbeno inhibe la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en las líneas celulares de adenocarcinoma humano HT-29 (Suh y otros, 2007. Clin Cancer Res. 13(1) 350-355.)

Para mejorar las alteraciones cognitivas en sujetos senescentes hay necesidad en el estado técnico de determinar si con un suplemento de pteroestilbeno a sujetos senescentes se pueden revertir las deficiencias cognitivas y motoras en comparación con sujetos no suplementados.

Los receptores colinérgicos muscarínicos son mediadores de las acciones del neurotransmisor acetilcolina en los sistemas nerviosos central y periférico, en el sistema gastrointestinal, en el corazón, en las glándulas endocrinas, en los pulmones y en otros tejidos. Se han identificado cinco subtipos distintos de receptores muscarínicos, m1-m5. El subtipo m1 es el que se encuentra predominantemente en el córtex cerebral y se cree que interviene en el control de las funciones cognitivas.

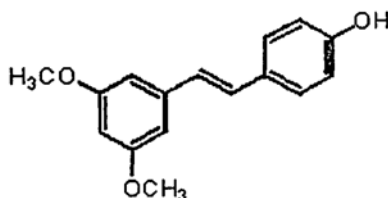
Los estados asociados a la disfunción cognitiva, como la enfermedad de Alzheimer, van acompañados por pérdida de acetilcolina en el cerebro, lo cual se cree que es el resultado de la degeneración de neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal que inervan áreas del córtex de asociación y el hipocampo, que está involucrado en procesos cognitivos superiores.

Por consiguiente es necesario identificar los compuestos que incrementan el efecto señalizador de la acetilcolina en el cerebro. En concreto es necesario identificar compuestos que actúen como agonistas muscarínicos en varios subtipos de receptores del sistema nervioso central y periférico.

BREVE RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

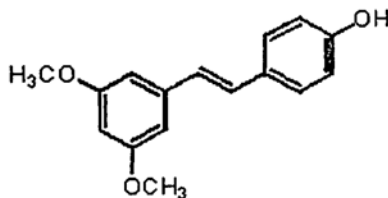
Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para tratar los efectos del envejecimiento neuronal y conductual y evitar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas causadas por el estrés oxidativo.

Se revela una composición farmacéutica para tratar el estrés oxidativo, que comprende una cantidad terapéutica efectiva de un compuesto sustancialmente puro de la fórmula:



y un vehículo fisiológicamente aceptable para la administración del pteroestilbeno en una cantidad comprendida aproximadamente entre 2,5 mg y 10 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto. Según otra forma de ejecución de la presente invención la cantidad terapéutica efectiva de pteroestilbeno se administra mediante una dieta de bayas del género *Vaccinium*. En otra forma de ejecución las bayas del género *Vaccinium* son arándanos.

Se revela un método para tratar el estrés oxidativo, que consiste en administrar una cantidad terapéutica efectiva de un compuesto sustancialmente puro de la fórmula:



que reduce el estrés oxidativo del sujeto. En una forma de ejecución de la presente invención el pteroestilbeno se administra en una cantidad comprendida aproximadamente entre 2,5 mg y 10 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto. En otra forma de ejecución el compuesto aumenta la actividad receptora de acetilcolina en el sujeto. Según otra forma más de ejecución, la cantidad de compuesto administrado protege contra la inhibición de la liberación de dopamina cuando el sujeto se ve sometido a un estresante oxidativo. En otra forma de ejecución el pteroestilbeno se administra mediante una dieta de bayas del género *Vaccinium*. En otra forma de ejecución las bayas del género *Vaccinium* son arándanos. En otra forma de ejecución el pteroestilbeno incrementa la capacidad tamponadora de calcio de subtipos de receptores muscarínicos como el m-1. Además se revela un método para aumentar la memoria de trabajo de un sujeto, que consiste en administrar una cantidad efectiva de un pteroestilbeno esencialmente puro,

mejorando dicha memoria. En una forma de ejecución la cantidad terapéutica efectiva de pterostilbeno es de unos 10 mg de compuesto por kilogramo de peso corporal del sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente invención, junto con el objeto antedicho y otros objetivos y beneficios, puede entenderse mejor mediante la siguiente descripción detallada de su forma de ejecución, ilustrada en las siguientes figuras:

FIG. 1: presenta las estructuras químicas de varios derivados de estilbeno.

FIG. 2: es un gráfico de recuperación media de Ca^{2+} en células de control transfectadas con M1 en células COS-7 y en células pretratadas con arándano, resveratrol, pinoestilbeno, desoxirrapontigenina, pterostilbeno, pterostilbeno glucósido, resveratrol trimetiléter o piceatanol después de un tratamiento sin dopamina (-dopamina) o con dopamina 1 mM (+dopamina). El asterisco indica una diferencia de recuperación entre las células no tratadas con dopamina y las células tratadas con dopamina para cada tratamiento (* = $p < 0,001$).

FIG. 3: es un gráfico de medición en segundos del tiempo de latencia hasta llegar a la plataforma para sujetos tratados con un bajo suplemento de pterostilbeno (0,004% p/p), un alto suplemento de pterostilbeno (0,016% p/p) o sin pterostilbeno (control) en su dieta. El asterisco indica una diferencia de comportamiento entre el ensayo 1 y el ensayo 2 para cada grupo dietético (* = $p < 0,05$).

FIG. 4: es un gráfico de medición en metros de la distancia hasta la plataforma para sujetos tratados con un bajo suplemento de pterostilbeno (0,004% p/p), un alto suplemento de pterostilbeno (0,016% p/p) o sin pterostilbeno (control) en su dieta. El asterisco indica una diferencia de comportamiento entre el ensayo 1 y el ensayo 2 para cada grupo dietético (* = $p < 0,05$).

FIG. 5: es un gráfico de la liberación de dopamina intensificada por oxotremorina en unos cortes de cuerpo estriado (cambio en pmoles/mg de proteína) preparados a partir de sujetos mantenidos en las dietas de control, dosis baja de pterostilbeno (0,004%) y dosis alta de pterostilbeno (0,016%), bajo condiciones basales ($-\text{H}_2\text{O}_2$) y condiciones de tratamiento estresante oxidativo ($+\text{H}_2\text{O}_2$, 50 μM). El asterisco indica una diferencia de liberación de dopamina entre los cortes de cuerpo estriado no tratados y tratados con H_2O_2 para cada grupo dietético (* = $p < 0,01$).

FIG. 6A: es un gráfico que representa la cantidad de pterostilbeno (ng) en el hipocampo de sujetos como función del tiempo de latencia (segundos) en encontrar una plataforma en un ensayo Morris Water Maze. El pterostilbeno se midió en el hipocampo de los sujetos y se relacionó con su comportamiento en los días 3 y 4 del ensayo 2. La **FIG. 6B** es un gráfico que representa la cantidad de pterostilbeno (ng) en el hipocampo de sujetos como función de la distancia (metros) recorrida por un sujeto hasta alcanzar una plataforma en un ensayo Morris Water Maze. El pterostilbeno se midió en el hipocampo de los sujetos y se relacionó con su comportamiento en los días 3 y 4 del ensayo 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

Se administró a sujetos senescentes una serie de dosis de pterostilbeno como suplemento de su dieta. Los sujetos suplementados con pterostilbeno tuvieron mejor comportamiento psicomotor y cognitivo en comparación con los que no recibieron suplemento de pterostilbeno. En otra forma de ejecución se administró a los sujetos una dosis baja de 2,5 mg de pterostilbeno por kilogramo de peso del sujeto. En otra forma de ejecución se administró a los sujetos una dosis elevada de 10 mg de pterostilbeno por kilogramo de peso del sujeto y mostraron la mayor mejoría del comportamiento cognitivo en las pruebas de valoración de la memoria de trabajo. En otra forma de ejecución el tratamiento previo con pterostilbeno antagonizó el efecto negativo del tratamiento con dopamina en la eliminación de calcio tras la despolarización inducida por oxotremorina en una línea celular COS-7 transfectada con M1. En otra forma más de ejecución de la presente invención se administró una cantidad terapéutica de pterostilbeno, que en dichas líneas celulares transfectadas con receptores muscarínicos de acetilcolina sensibles al estrés oxidativo protegió contra las reducciones del tiempo de recuperación inducidas por la dopamina. Además el pterostilbeno administrado en la dieta de un sujeto aumenta la sensibilidad de sus receptores muscarínicos en cortes de cuerpo estriado post mortem, donde la liberación de dopamina no disminuye cuando se someten a un estresante oxidativo.

Definiciones

Tal como se usan en la descripción y en las reivindicaciones las formas del singular “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias al plural, a no ser que el contexto exprese claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células y también mezclas de ellas.

El término estilbeno se usa para describir una clase química de compuestos que tienen la fórmula general *trans*-1,2-difeniletileno y la fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CHC}_6\text{H}_5$. Los estilbenos tienen la estructura general 1,2-difeniletileno con dos grupos fenilo como ramificaciones laterales. Un derivado químico de la clase química de los estilbenos es el resveratrol, *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, que se representa en la fig. 1. Otro derivado químico de la clase química de los estilbenos es el pterostilbeno, que se puede describir como *trans*-3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno y está representado en la fig. 1. Otros ejemplos de estilbenos son el pinoestilbeno (*trans*-3,4'-dihidroxi-5-metoxiestilbeno), la desoxirrapontigenina (*trans*-3,5-dihidroxi-4'-metoxiestilbeno), el pterostilbeno glucósido, el resveratrol trimetiléter (*trans*-3,5,4'-trimetiléterestilbeno) y el piceatanol (*trans*-3,4,3',5'-tetrahidroxiestilbeno).

El término estresante oxidativo se refiere a especies oxigenadas que reaccionan con varias sustancias en el cuerpo causando trastornos. En general el radical hidroxilo reacciona sin distinción con múltiples substratos orgánicos. Como ejemplos de estresantes oxidativos cabe mencionar el peróxido de hidrógeno y el ozono.

Tal como se usa aquí, el término "memoria de trabajo" se refiere al proceso rápido de memoria de almacenamiento y recuperación, incluyendo los procesos necesarios para retener la información que entra en la memoria a corto plazo antes de convertirse en memoria duradera y los procesos que respaldan la recuperación de recuerdos (episódicos) arraigados en la memoria a largo plazo. El término también se refiere a memoria a corto plazo, memoria primaria, memoria inmediata, memoria operativa y memoria provisional.

Una cantidad terapéuticamente efectiva se define como aquella cantidad de un compuesto que administrada a un sujeto es suficiente tratar un estado patológico. La "cantidad terapéuticamente efectiva" puede variar en función del compuesto y de la enfermedad tratada, de la edad y la salud relativa del sujeto, de la vía y forma de administración, del juicio del especialista experimentado y de otros factores.

En cada medición del comportamiento se emplearon modelos de análisis de varianza (ANOVA) entre sujetos para comparar los tres grupos y se utilizó el programa Systat (SPSS, Inc., Chicago, IL) para comprobar la significancia estadística al nivel $p < 0,05$. Los días o ensayos, según lo apropiado, se incluyeron como variable entre sujetos. Para determinar las diferencias entre los grupos dietéticos se efectuaron comparaciones post-hoc mediante el análisis post-hoc LSD de Fisher.

Para un ensayo de recuperación de calcio en una línea celular transfectada con M1 después de la administración de dopamina se usaron varios análogos de estilbeno, que están representados en la figura 1. El resveratrol se compró de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y el piceatanol de Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA).

El pteroestilbeno (*trans*-3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno) se sintetizó (según la modificación de Pettit y otros, 1988, J. Nat. Prod. 51:517-527) por condensación de 3,5-dimetoxibenzaldehído y ácido 4-hidroxifenilacético en anhídrido acético y trietilamina. La mezcla reactiva se calentó (150°C) bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó continuamente. A las 20 horas se paró la reacción, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió ácido clorhídrico concentrado (5 ml). El precipitado formado se disolvió en 50 ml de cloroformo y se extrajo con solución acuosa de hidróxido sódico al 10%. El extracto acuoso se acidificó a pH 1 con ácido clorhídrico concentrado y se agitó durante al menos 6 horas, con lo cual precipitó el producto intermedio ácido α -[(3,5-dimetoxifenil)metilen]-4-hidroxi-(α Z)-bencenoacético. Este producto intermedio se calentó luego con 1,0 de cobre en 10 ml de quinolina (200°C, 6 horas, bajo atmósfera de nitrógeno). La mezcla reactiva se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se añadió al filtrado ácido clorhídrico 5 N (25 ml), se agitó durante 1 hora y se extrajo con cloroformo. El extracto de cloroformo, que contenía el pteroestilbeno impuro, se purificó por cromatografía flash en un sistema HPFC Horizon (Biotage, Inc., Charlottesville, VA) con una columna de gel de sílice y un sistema disolvente de acetato de etilo : hexano (gradiente lineal de 15:85 hasta 100% de acetato de etilo. Las fracciones que contenían pteroestilbeno puro se reunieron y se concentraron al vacío. El pteroestilbeno se recrystalizó en hexano y su estructura fue confirmada mediante sus datos espectroscópicos (UV, espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

El pteroestilbeno glucósido se sintetizó mezclando pteroestilbeno (20 mg) con 40 mg de acetobromo- α ,D-glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e hidróxido potásico (5 mg) en 1 ml de etanol y agitando dos días a temperatura ambiente. El pteroestilbeno glucósido se purificó por cromatografía de capa fina preparativa, con etanol : cloroformo (20:80) como disolvente revelador. La estructura del pteroestilbeno glucósido se determinó por espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^1H .

Una solución de resveratrol (150 mg en 3,0 ml de metanol) se trató con diazometano gota a gota y la reacción de metilación se controló por cromatografía de capa fina. La desoxirrapontigenina, el pinoestilbeno y el resveratrol trimetiléter se purificaron por cromatografía de capa fina preparativa, empleando hexano : acetato de etilo (8:2) como disolvente revelador. Los valores del factor de retención (R_f) de la desoxirrapontigenina, del pinoestilbeno y del resveratrol trimetiléter fueron 0,2, 0,25 y 0,8 respectivamente. Las estructuras de estos compuestos se confirmaron por espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Preparación de los sujetos y de la dieta

Se obtuvieron cuarenta y dos ratas Fischer 344 macho, de 19 meses de edad, de la colonia NIA (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN). Las ratas se alojaron individualmente en jaulas colgadas de malla de acero inoxidable, se les proporcionó comida y agua a voluntad, y se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Se les dejó una semana de tiempo de adaptación a su nuevo entorno; después se igualaron de peso y se les asignó aleatoriamente una de las tres dietas durante 12-13 semanas en total ($n = 14$ /grupo): control, dosis baja de pteroestilbeno (0,004%, equivalente a 2,5 mg/kg de peso corporal) o dosis alta de pteroestilbeno (0,016%, equivalente a 10 mg/kg de peso corporal). Todos los animales fueron observados diariamente por si mostraban signos clínicos de enfermedad.

Las dietas de pteroestilbeno se prepararon en Harlan Teklad (Madison, WI), añadiendo pteroestilbeno cristalino a la dieta de control: 40 mg/kg de dieta, 0,004% p/p para la dosis baja; 160 mg/kg de dieta, 0,016% p/p para la dosis alta.

Véase la composición en la tabla 1. En la dieta de control se ajustó la cantidad de maíz para compensar el volumen añadido de pteroesstilbeno. Las ratas se mantuvieron en la dieta de control o en la dieta de pteroesstilbeno durante ocho semanas antes de la prueba de motilidad y durante nueve semanas antes del ensayo cognitivo.

5

TABLA 1

Mezcla básica	<u>g/kg</u>
Trigo duro molido	362,75
Maíz amarillo molido	193,80
Tercerillas de trigo	102,00
Avena molida	102,00
Harina de pescado lacha, 60%	91,80
Harina de soja, 48%	51,00
Harina de alfalfa deshidratada, 17%	20,40
Harina de gluten de maíz, 60%	20,40
Fosfato dicálcico, 18,5%, uso alimentario	15,30
Aceite de soja	15,30
Levadura de cerveza seca, uso alimentario	10,20
Sal, NaCl yodado	5,10
Carbonato cálcico, 38%, uso alimentario	4,85
mezcla vitamínica NIH-31 (TD 87391)	3,57
mezcla mineral NIH-31 (TD 76121)	1,53
Dieta de control: 98% de mezcla básica + 2% de maíz	
Dieta con dosis baja de pteroesstilbeno: 98% de mezcla	
básica + 1,996% de maíz (1,96 g/kg) + 0,004% (0,040 g/kg)	
de pteroesstilbeno cristalino	
Dieta con dosis alta de pteroesstilbeno: 98% de mezcla	
básica + 1,984% de maíz (1,84 g/kg) + 0,016% (0,160 g/kg)	
de pteroesstilbeno cristalino	

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar adicionalmente varias formas de ejecución de la presente invención.

10 Ejemplo 1: tratamientos celulares contra el estrés oxidativo

Se cultivaron células COS-7 - una línea celular procedente de riñón de mono verde africano - en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) con un suplemento del 10% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina. Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se recolectaron con tripsina, se contaron y se cultivaron en placas de 100 mm² para cultivo de tejidos a razón de 5 x 10⁶ células/placa. Las células se transfectaron temporalmente con ADN de receptor muscarínico subtipo 1 de rata mediante el método de DEAE-dextrano. Después de la transfección, las células se incubaron durante 2,5 horas en un medio de cultivo que contenía cloroquina 80 µM para minimizar la degradación del ADN. Las células transfectadas se mantuvieron luego en el medio de cultivo durante 48 horas, se recolectaron con tripsina, se pasaron a cubreobjetos en placas de 35 mm para el escaneo del calcio y se incubaron durante la noche.

Tratamientos celulares

Los tratamientos con extracto de arándanos (BB) (2 mg/ml), estilbenos [resveratrol (50 µg/ml), pinoestilbeno (50 µg/ml), desoxirrapontigenina (25 µg/ml), pteroesstilbeno (10 µg/ml), pteroesstilbeno glucósido (10 µg/ml), resveratrol trimetiléter (10 µg/ml), piceatanol (10 µg/ml)] y dopamina (1 mM) se efectuaron del modo anteriormente descrito en Joseph J. y otros, 2004. J. Alz. Dis. 6:403-411, e incorporado aquí como referencia. El extracto BB y los estilbenos se disolvieron en medio de cultivo y luego las células se incubaron durante 45 minutos a 37°C con el medio de cultivo tratado, seguido de la administración de dopamina durante 4 horas. Después de estas incubaciones las células se lavaron tres veces medio de cultivo exento de extracto antes de proceder al ensayo.

El escaneo del calcio se efectuó mediante un microincubador de perfusión abierta de Medical Systems Corp. (37°C) con control de temperatura, montado sobre la platina de un microscopio Nikon Eclipse TE200U e iluminado con una fuente de luz fluorescente. Las células transfectadas se cargaron con Fura-2/acetoximetil éster (2 µM) en medio de carga (99% de DMEM, 1% de SBF) durante 40 minutos a 37°C con 5% de CO₂.

Los análisis en tiempo real del flujo de calcio antes y después de la despolarización inducida mediante oxotremorina 750 µM se realizaron utilizando el programa Simple PCI software (Compix, Inc. Mars, PA). Luego se determinó la respuesta y la recuperación para cada muestra. La respuesta se determinó examinando si una célula presentaba incrementos de [Ca²⁺]_i por oxotremorina > 30% por encima de la línea base. Para el siguiente análisis solo se tuvieron en cuenta las células que mostraron esta magnitud de respuesta. La recuperación se determinó evaluando el tiempo (dentro de un intervalo de 300 seg) necesario para que los niveles de Ca²⁺ volvieran al 20% del incremento

subsiguiente a la despolarización en las células que habían respondido. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis y pruebas U de Mann-Whitney.

La administración de dopamina reduce significativamente la recuperación [respecto a un 80% de la línea base] en células transfectadas con M1 (células de control frente a células tratadas con dopamina, $p < 0,001$) (figura 2). El pteroestilbino, el pteroestilbino glucósido, el resveratrol trimetiléter y el piceatanol protegieron contra las mermas de recuperación ($p > 0,05$), mientras que el resveratrol, el pinoestilbino y la desoxirrapontigenina no proporcionaron ninguna protección ($p < 0,001$) (figura 2).

Ejemplo 2: laberinto de agua de Morris

El método del laberinto de agua de Morris (LAM) es una prueba del aprendizaje y memoria espacial de los sujetos. Desarrollado por Richard Morris, el LAM es un modelo de aprendizaje sensible a la edad y a la dieta que requiere que un sujeto localice una plataforma escondida (de 10 cm de diámetro), situada bajo la superficie (a 2 cm) de una pileta circular de agua (de 134 cm de diámetro x 50 cm de altura, mantenida a 23°C), partiendo de una señal distal y recuerde su ubicación desde la prueba anterior. La natación exacta es recompensada con la salida del agua sobre la plataforma, para lo cual el sujeto se vale de señales distales tales como carteles, el experimentador, un ordenador, estantes de jaulas, a fin de localizarla efectivamente. La versión de memoria de trabajo en el LAM (Brandeis y otros, 1989. *Int J Neurosci.* 48:29-69; Morris R., 1984. *J Neurosci Methods.* 11: 47-60) se realizó diariamente cuatro días seguidos en la novena semana de tratamiento, con una sesión de mañana y otra de tarde, a razón de dos pruebas por sesión separadas mediante un intervalo de 10 minutos. Las ratas se sometieron a la prueba aleatoriamente, con la única restricción de examinar uno tras otro un sujeto de cada grupo. Al comienzo de cada prueba el sujeto se sumergió suavemente en el agua en una de las cuatro posiciones de partida dispuestas al azar. Se dieron a cada sujeto 120 segundos para escapar hacia la plataforma; si no logró escapar durante este tiempo, el sujeto fue guiado hasta la plataforma. Una vez alcanzada la plataforma, el sujeto permaneció allí durante 15 segundos (prueba 1, memoria de referencia o prueba de aprendizaje). El sujeto se devolvió a su jaula de alojamiento entre cada prueba (10 min). En la prueba 2 (memoria de trabajo o prueba de recuperación) se usó la misma colocación de la plataforma y la misma posición de partida que en la prueba 1. Los ensayos se grabaron en video y se analizaron mediante el programa de rastreo de imágenes (HVS Image, UK), que permite medir la latencia (en segundos) (el tiempo hasta encontrar la plataforma), la longitud del recorrido (en cm) y la velocidad de natación cm/s; longitud del recorrido / latencia). En Shukitt-Hale y otros, 1998. *Experimental Gerontology*, 33:615-624, incorporado aquí como referencia, se expone una descripción del laberinto y del modelo empleado.

Las ratas sometidas al ensayo que habían recibido la dieta con pteroestilbino arriba detallada mostraron un mejor rendimiento de memoria espacial en comparación con el grupo alimentado con la dieta de control (figuras 3 y 4). Entre los grupos dietéticos no hubo ninguna diferencia de latencia o de distancia para encontrar la plataforma en la prueba 1 o en la prueba 2. No obstante se hicieron pruebas t separadas entre las dos latencias o distancias de cada grupo durante los días 3 y 4 (los días en que cuenta más la memoria que el aprendizaje) a fin de determinar si los grupos dietéticos distintos mejoraban significativamente su rendimiento de la prueba 1 a la prueba 2, como indicio de memoria de trabajo mejorada. El grupo de dosis alta de pteroestilbino mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$) del tiempo de latencia para encontrar la plataforma entre las pruebas 1 y 2, es decir, los tiempos de latencia de la prueba 2 fueron bastante menores que en la prueba 1, lo cual demuestra que estas ratas aprendieron con un solo ensayo, incluso con el intervalo de retención de 10 minutos (figura 3). Este aprendizaje en un solo ensayo no se vio en el grupo de control, mientras que el grupo de dosis baja de pteroestilbino tendió a mejorar de la prueba 1 a la prueba 2 ($p = 0,09$). Asimismo, los grupos de dosis baja y alta de pteroestilbino mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la distancia recorrida para encontrar la plataforma entre las pruebas 1 y 2, es decir, las distancias en la prueba 2 fueron bastante menores que en la prueba 1 (figura 4). El grupo de control no mostró esta mejora entre las pruebas 1 y 2 ($p > 0,05$). Por consiguiente el pteroestilbino revirtió los efectos perjudiciales del envejecimiento en el rendimiento cognitivo, en particular en la memoria de trabajo, según la dosis.

Pteroestilbino en el tejido del hipocampo del sujeto

Se extrajo tejido cerebral del hipocampo de sujetos sacrificados a las 2-3 semanas del ensayo del laberinto de agua de Morris. Las muestras de los tejidos se conservaron a -80°C y se descongelaron en hielo antes de la extracción. Los tejidos se homogenizaron en 500 μl de tampón de fosfato (pH 7,4) y luego se centrifugaron (7000 g, 4°C , 15 min). Se recogió el sobrenadante y se repitió la homogenización. El sobrenadante combinado se extrajo con acetato de etilo (500 μl x 2). El extracto de acetato de etilo se secó bajo una corriente de nitrógeno.

El extracto seco se trató con 30 μl de N,O-bis[trimetilsilil]trifluoroacetamida : dimetilformamida (BSTFA:DMF, 1:1; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) y se calentó a 70°C durante 40 min. La muestra tratada se usó para analizar el pteroestilbino por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). La GC-MS se llevó a cabo en un aparato JEOL GCMate II (JEOL USA Inc., Peabody, MA) con una columna capilar J&W DB-5 (0,25 mm de diámetro interno, 0,25 μm de espesor de film, 30 m de longitud; Agilent Technologies, Foster City, CA). La GC se efectuó con el siguiente programa de temperatura: inicial 190°C , aumentado hasta 239°C a razón de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y mantenido a esta temperatura durante 3 min, aumentado hasta 242°C a razón de $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, luego incrementado finalmente hasta 300°C a razón de $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y mantenido a esta temperatura durante 1,5 min. El gas portador era helio de pureza

ultra alta, a un caudal de 1 ml/min. El puerto de inyección, la interfaz GC-MS y la cámara de ionización estuvieron a 250, 230 y 230°C respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µl, sin división. El espectro de masas se obtuvo en modo de impacto electrónico positivo (70 eV) y baja resolución. El pteroestilbeno se determinó y se cuantificó a partir de un cromatograma iónico reconstruido, tomando m/z 328, 313, 297 y 147. La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración de una muestra patrón de pteroestilbeno (tiempo de retención 12,5 min). Los análisis de GC-MS se hicieron por duplicado. Solo pudo detectarse pteroestilbeno en el hipocampo del grupo con la dosis alta de pteroestilbeno; el valor hallado fue de $1,352 \pm 0,465$ ng/muestra de tejido.

Para examinar si había una correspondencia entre el comportamiento de las ratas con dosis alta de pteroestilbeno en el LAM y los niveles cerebrales de pteroestilbeno, los niveles de pteroestilbeno en el hipocampo se relacionaron con los resultados de latencia y distancia obtenidos en las pruebas 1 y 2, tal como se detalla en las figuras 6A y 6B. El hipocampo es conocido por su papel en el aprendizaje y la memoria espaciales. Sobre todo en la prueba 2, para la memoria de trabajo se halló una correlación significativamente negativa entre los niveles de pteroestilbeno en el hipocampo y los resultados de latencia ($r = -0,764$, $p = 0,010$) y distancia ($r = -0,734$, $p = 0,016$) en los días 3 y 4; es decir, a medida que aumentaban los niveles de pteroestilbeno disminuía el tiempo de latencia y la distancia recorrida para encontrar la plataforma.

Ejemplo 3: liberación de dopamina

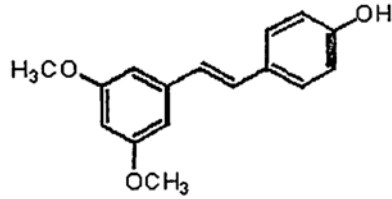
La liberación de dopamina provocada por el aumento muscarínico de K^+ (K^+ -ERDA) en cortes de cuerpo estriado superfundidos es un indicador de la sensibilidad del receptor y de la función del cuerpo estriado, y es sensible al envejecimiento y al estrés oxidativo, tal como se describe en las publicaciones de Joseph y otros, 1988. *Brain Res.*, 454:140-8; Joseph y otros, 1988. *Brain Res.*, 454:149-55; Joseph J., y otros, 1990. *Brain Res.*, 537:40-48; Joseph y otros, 1996. *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 821-30, incorporadas aquí por referencia. El incremento muscarínico de la liberación de dopamina también es sensible a la suplementación dietética, tal como se revela en las publicaciones de Joseph y otros, 1998. *J. Neurosci.*, 18: 8047-8055; Joseph y otros, 1999. *J. Neurosci.*, 19: 8114-8121; Youdim y otros, 2000. *Nutr Neurosci.*, 3: 383-97; Shukitt-Hale y otros, 2005. *Age.*, 27: 49-57; Shukitt-Hale y otros, 2006. *Nutrition*, 22: 295-302, incorporadas aquí por referencia. La capacidad protectora del tejido estriado obtenido del grupo de control y de los grupos suplementados se evaluó examinando las diferencias de aumento de la K^+ -ERDA en el cuerpo estriado debido a la oxotremorina. La liberación de dopamina se realizó a las 2-3 semanas del ensayo conductual, empleando cortes transversales (300 µm, micrótopo Mcllwain) de cuerpo estriado recién diseccionado de cerebros de sujetos que habían sido alimentados con las dietas de dosis alta, dosis baja y control. Los cortes se introdujeron en pequeños viales de vidrio que contenían medio Krebs-Ringer de liberación basal modificado (BRM), el cual había sido burbujeado durante 30 minutos con 95% de O_2 /5% de CO_2 y contenía $NaHCO_3$ 21 mM, glucosa 3,4 mM, NaH_2PO_4 1,3 mM, EGTA 1 mM, $MgCl_2$ 0,93 mM, NaCl 127 mM y KCl 2,5 mM (bajo en KCl) (pH 7,4). La mitad del tejido se trató con H_2O_2 50 µM para valorar el efecto de la dieta bajo condiciones de estrés oxidativo. Los cortes se colocaron en cámaras de perfusión, se mantuvieron a 37°C y se perfundieron con el BRM durante 30 minutos. Tras este periodo de equilibración el medio se cambió por otro que contenía (en mM) KCl 30 (alto en KCl), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,26 (en vez de EGTA), NaCl 57 y 0 o 500 µM de oxotremorina y luego se evaluó el incremento de la K^+ -ERDA. La liberación de dopamina se cuantificó por HPLC acoplada a detección electroquímica y se expresó en pmoles/mg de proteína según el procedimiento de determinación de Lowry.

La liberación de dopamina (K^+ -ERDA en el cuerpo estriado incrementada por oxotremorina) fue significativamente diferente entre los grupos, dependiendo de la dieta y del tratamiento con H_2O_2 [$F(5,58) = 2,34$, $p < 0,05$] (figura 5). En condiciones basales no hubo ninguna diferencia entre los grupos dietéticos ($p > 0,05$). Sin embargo la liberación de dopamina disminuyó significativamente en el grupo dietético de control tratado con H_2O_2 en comparación con el grupo dietético de control no tratado con H_2O_2 ($p < 0,05$); en cambio después del tratamiento con H_2O_2 no se vieron diferencias en los sujetos que habían recibido una dosis terapéutica, baja o alta, de pteroestilbeno.

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a los detalles de la forma de ejecución expuesta, éstos no pretenden limitar el alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. La forma de ejecución de la presente invención, de la cual se reivindica la propiedad o concesión exclusiva, se define como sigue:

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéutica efectiva de pteroestilbeno sustancialmente puro de fórmula:



y un vehículo fisiológicamente aceptable, para emplearla en el tratamiento de déficits motores y/o enfermedades neurodegenerativas, incrementando la actividad receptora de acetilcolina en el sujeto mediante la administración de una cantidad de pteroestilbeno comprendida aproximadamente entre 2,5 mg y 10 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

2. La composición para usar según la reivindicación 1, administrando el pteroestilbeno en una cantidad de unos 10 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

3. La composición para usar según la reivindicación 1, en que la cantidad terapéutica efectiva de pteroestilbeno procede de bayas del género *Vaccinium*.

4. La composición para usar según la reivindicación 1, en la cual el pteroestilbeno incrementa la capacidad tamponadora del calcio de los subtipos de receptor muscarínico.

5. La composición para usar según la reivindicación 1, de modo que el subtipo de receptor muscarínico es M1.

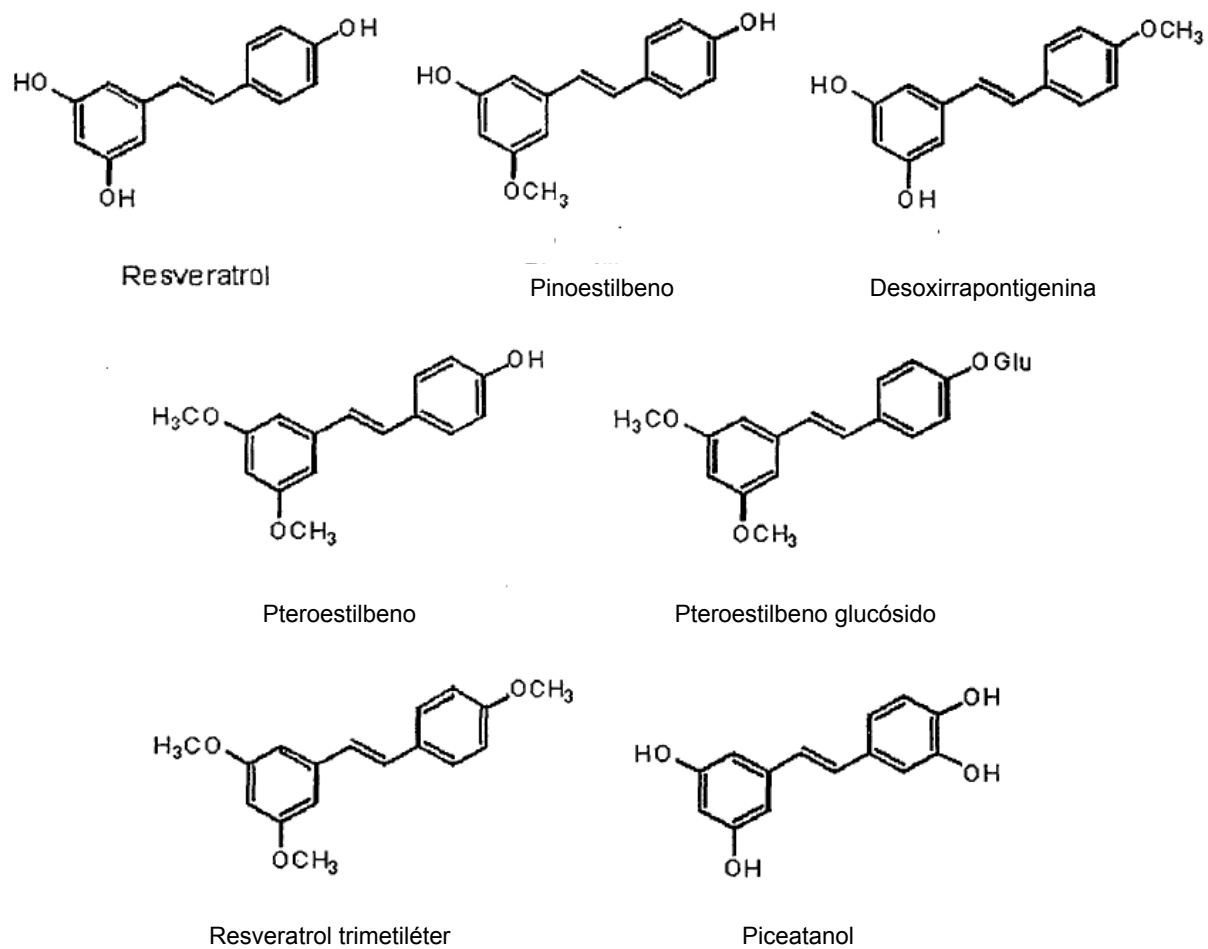


FIG. 1

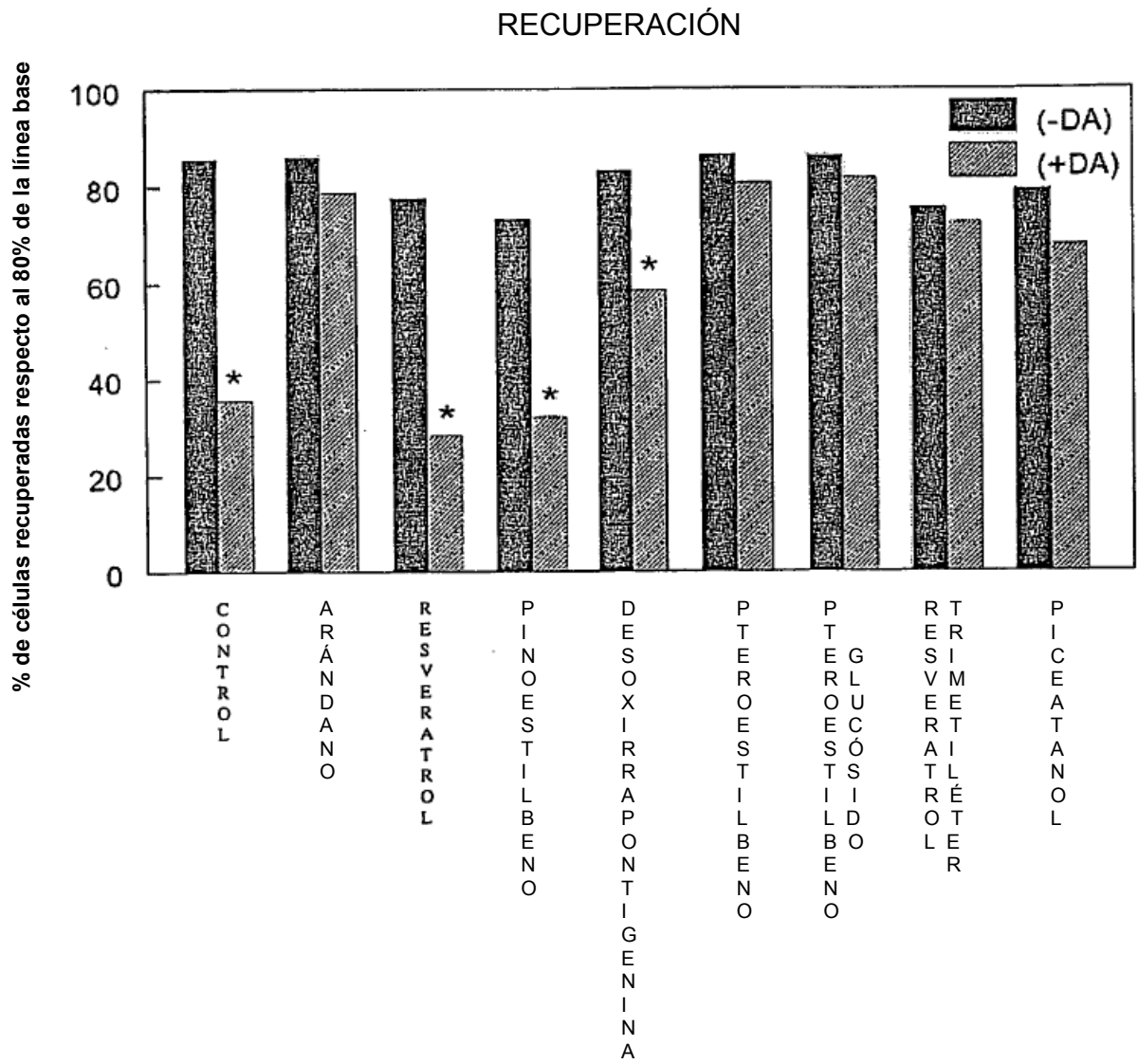


FIG. 2

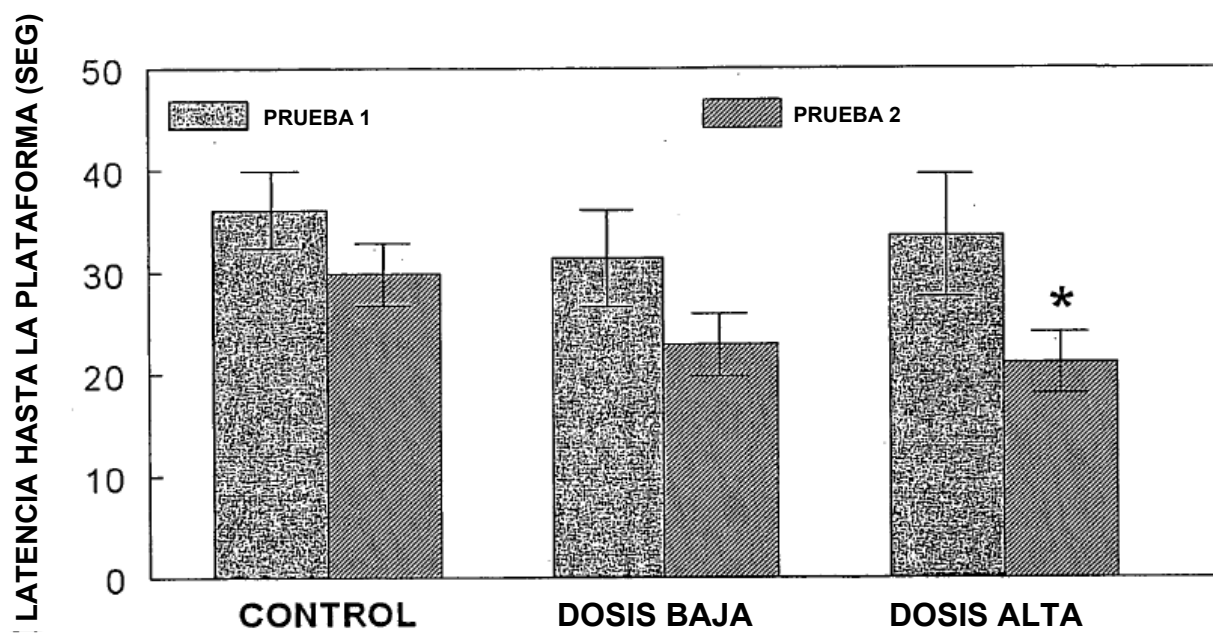


FIG. 3

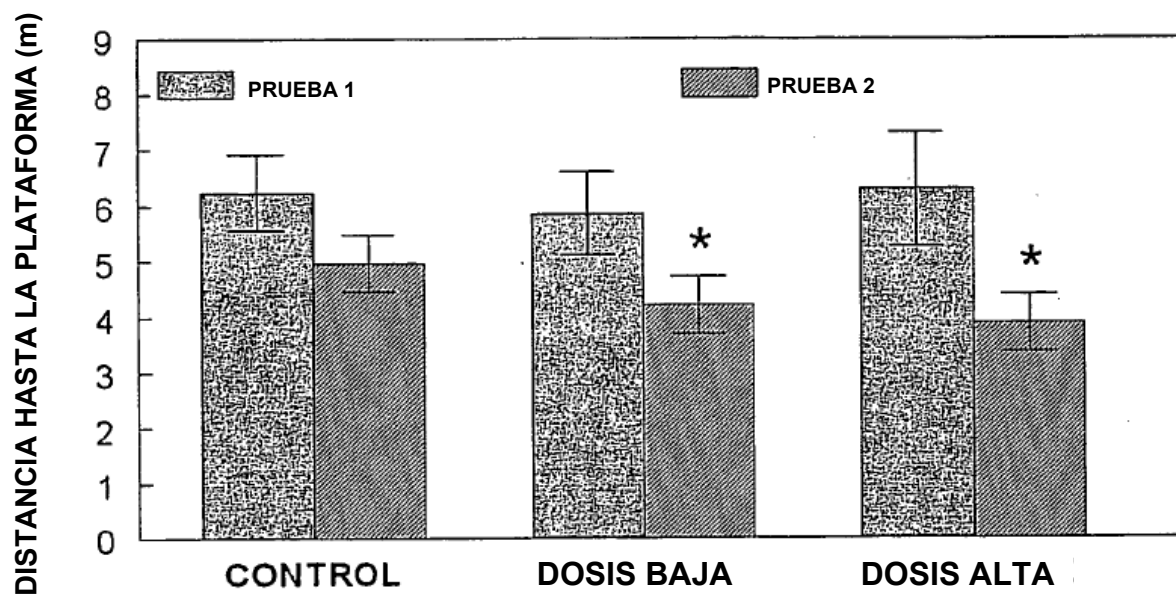
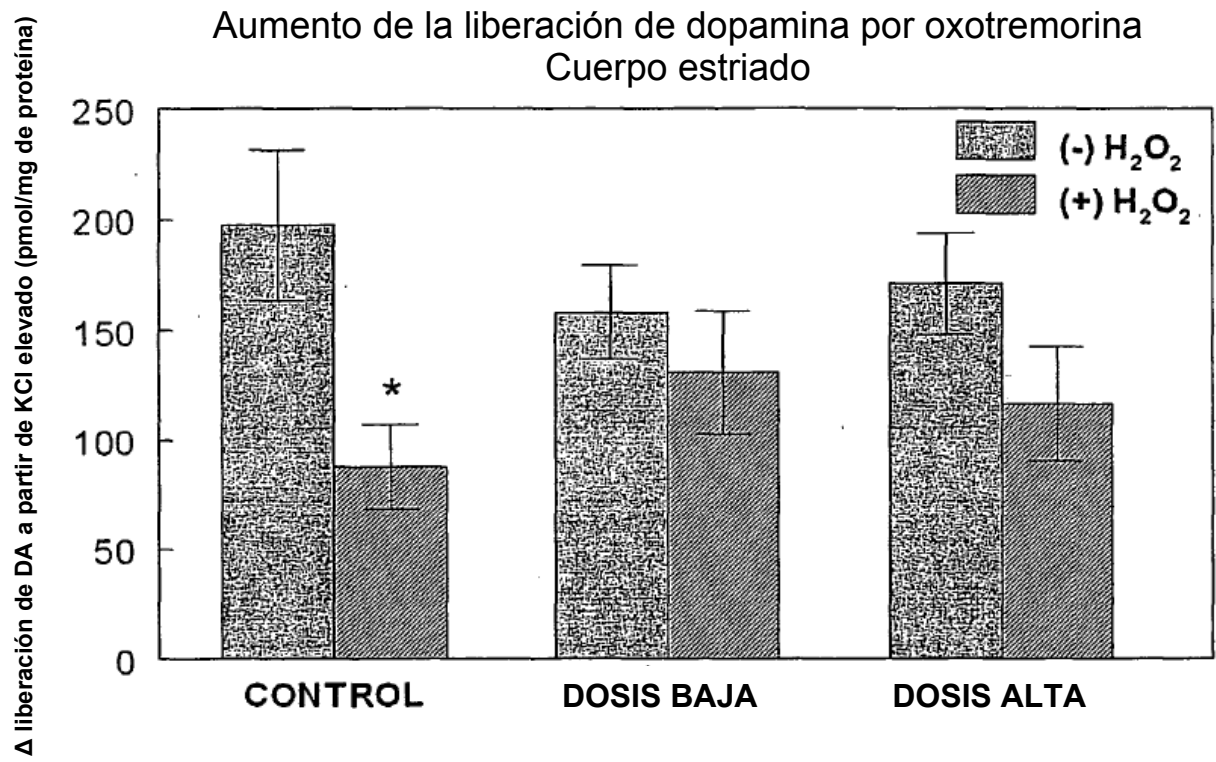


FIG. 4



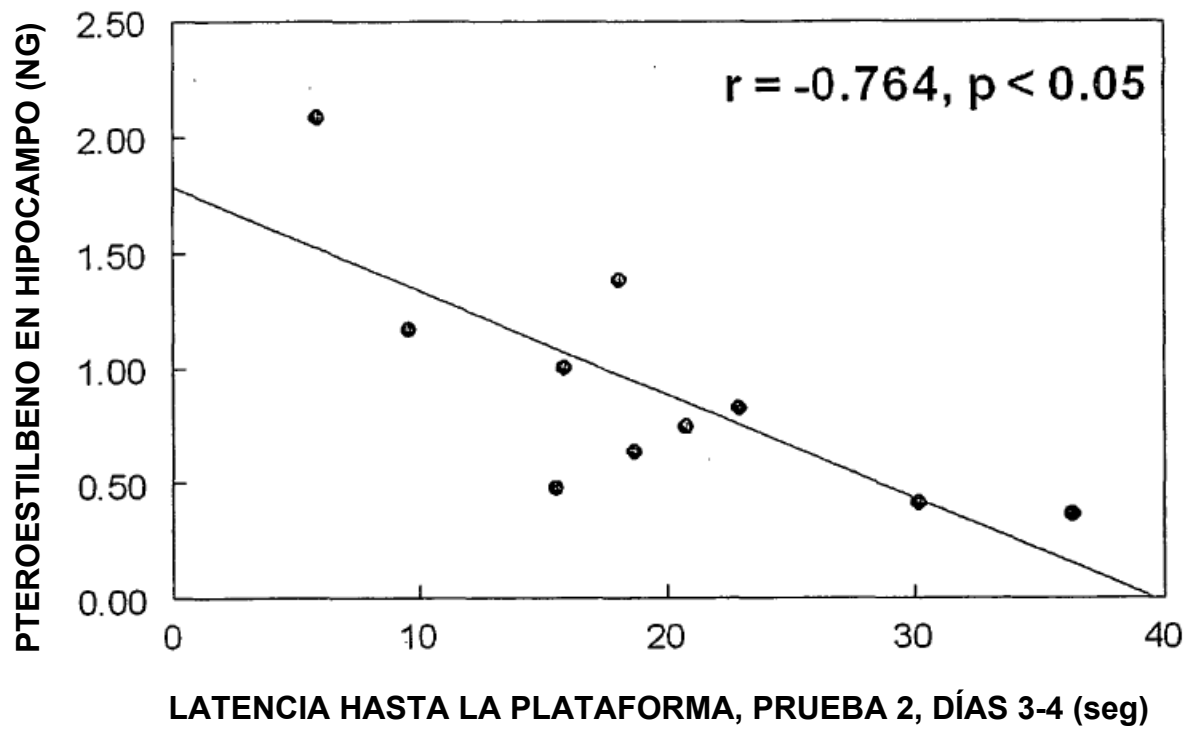


FIG. 6A

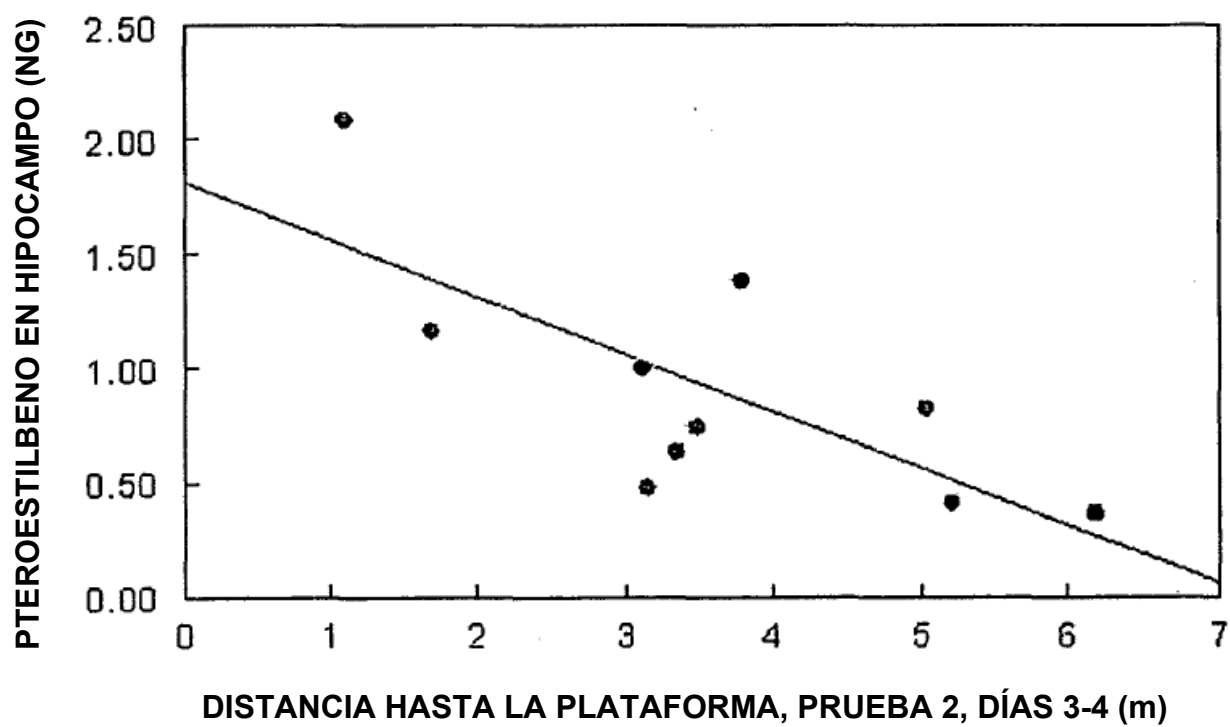


FIG. 6B