

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 521**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/201** (2006.01)

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61K 31/7068** (2006.01)

**A61K 31/7072** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/14** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2006 PCT/US2006/019766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06127620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2006 E 06770862 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 1888081**

54 Título: **Composiciones que contienen PUFA y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**23.05.2005 US 683352 P**

**13.09.2005 US 716077 P**

**03.01.2006 US 755058 P**

**25.01.2006 US 761753 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.06.2017**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)**

**Technology Licensing Office, 255 Main Street,  
Building NE18-501  
Cambridge, MA 02142-1601, US**

72 Inventor/es:

**WURTMAN, RICHARD J. y  
RICHARDSON, INGRID**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 615 521 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen PUFA y métodos de uso de las mismas

**Campo de la invención**

5 La presente invención provee composiciones para usar en el tratamiento de un sujeto con un trastorno de la memoria, un trastorno neurológico o una enfermedad o un trastorno cerebral.

**Antecedentes de la invención**

10 La demencia es un trastorno cerebral que afecta seriamente la capacidad de una persona de realizar sus actividades cotidianas. La forma de demencia más común entre las personas de edad avanzada es la enfermedad de Alzheimer (AD, de sus siglas en inglés), que inicialmente afecta aquellas partes del cerebro que controlan el pensamiento, la memoria y el lenguaje. Muchas autoridades consideran que un deterioro en la memoria y en la función cognitiva (el pensamiento) es una consecuencia normal del envejecimiento. Las personas con ARCD sufren un deterioro en la memoria y en el aprendizaje, en la atención y en la concentración, en el pensamiento, en el uso del lenguaje y en otras funciones mentales. En esta área se necesita con urgencia hallar métodos de tratamiento para estos trastornos y enfermedades.

15 El documento de patente de los EE.UU. con el número US6509178 describe que se sabe que el ácido docosahexanoico mejora el aprendizaje de la memoria y se considera de utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, entre otras cosas. El documento de patente con el número WO00/06174 reivindica a la uridina para el tratamiento del deterioro de la memoria y de enfermedades relacionadas, tales como la enfermedad de Pick.

**Compendio de la invención**

20 La presente invención provee composiciones que aumentan u optimizan la síntesis y los niveles de los fosfolípidos, la sinapsis, las proteínas sinápticas y las membranas sinápticas mediante una célula neuronal o célula cerebral, según se define en las reivindicaciones adjuntas. El tema principal no cubierto por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada.

25 De este modo, la presente invención provee una composición que comprende: (1) ácido docosahexanoico; (2) uridina o uridin-5'-monofosfato y (3) colina o una sal de colina, para usar en el tratamiento de un sujeto humano con un trastorno seleccionado entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad Huntington y deterioro cognitivo leve (MCI, de sus siglas en inglés). La enfermedad de Alzheimer puede estar en estadio incipiente o leve o puede encontrarse en un estadio moderado o severo. El sujeto puede ser un adulto de edad avanzada.

30 La presente invención provee, asimismo, una composición que consiste en: (1) ácido docosahexanoico; (2) uridina o uridin-5'-monofosfato (UMP, *uridine-5'-monophosphate*) y (3) colina o una sal de colina, para usar como un medicamento, por ejemplo un medicamento para un ser humano.

35 La sal de colina puede ser cloruro de colina, bitartrato de colina, tartrato de colina o citrato de colina. La composición puede comprender uridin-5'-monofosfato (UMP), una sal de colina y ácido docosahexanoico. La uridina o uridin-5'-monofosfato puede administrarse para proveer un intervalo de 10 a 500 mg de uridina por día. La colina o sal de colina puede administrarse en un intervalo de 100 mg a 10 g de colina por día. El ácido docosahexanoico típicamente está presente en una cantidad que aumenta la síntesis de los fosfolípidos - tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina o esfingomielina - en una célula cerebral de dicho sujeto. La composición puede formularse como una composición farmacéutica o como un suplemento nutricional; alternativamente, la composición puede estar presente dentro de un alimento enriquecido, tal como una bebida.

**Breve descripción de las figuras**

45 Figura 1: el DHA aumenta la síntesis de los fosfolípidos en las células PC12. Las células PC12 se incubaron durante toda una noche con ácidos grasos, luego se incubaron en medios que contenían colina marcada con  $^{14}\text{C}$ . El gráfico ilustra la incorporación de la etiqueta  $^{14}\text{C}$  en la fosfatidilcolina en desintegraciones por minuto (dpm) por microgramo (mg) de ADN. DHA: ácido docosahexanoico. OA: ácido oleico. PA: ácido palmítico. \* -p < 0,05.

Figura 2: el aumento de la síntesis de los fosfolípidos por el DHA depende de la dosis. \* -p < 0,05. \*\* -p < 0,001.

50 Figura 3. A. El ácido araquidónico aumenta la síntesis de los fosfolípidos en las células SHSY-5Y. DHA: ácido docosahexanoico. AA: ácido araquidónico. PA: ácido palmítico. \*: p<0,05. \*\*: p<0,001. B. El aumento de la síntesis de los fosfolípidos por el AA depende de la dosis.

Figura 4. El DHA y el UMP se sinergizan para incrementar los niveles de fosfolípidos en el cerebro en un estudio en animales enteros. \*\*\*: significativamente mayor que el grupo de control por ANOVA unilateral. A. pmol fosfolípido por miligramo (mg) de proteína. La combinación de UMP + DHA fue significativamente mayor que el control (p < 0,05)

(ANOVA unilateral [ $F(3,28) = 4,12$ ;  $p = 0,015$ ]). El ANOVA bilateral reveló un efecto estadísticamente significativo del DHA también, con relación al grupo de control [ $F(1,28) = 8,78$ ;  $p = 0,006$ ]. B. pmol de fosfolípido por mg de ADN. La combinación de UMP + DHA fue significativamente mayor que el control ( $p = 0,020$ ) (ANOVA unilateral [ $F(3,28) = 3,215$ ;  $p = 0,038$ ]).

5 Figura 5. Efectos del DHA sobre los niveles de CDP-colina (A) y sobre los niveles de CDP-etanolamina (B) en el cerebro. Unos grupos de 8 gerbilinos recibieron una dieta de control o bien, una dieta que contenía UMP, y, por sonda, DHA (en un vehículo que consistía en solución de goma arábica al 5 %) o solución de goma arábica al 5 % sola durante 28 días. El día 29 los cerebros se recogieron y se sometieron a pruebas para determinar los niveles de CDP-colina. Los datos se presentan como las medias  $\pm$  SEM. Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando ANOVA unilateral o bilateral con la prueba de Tukey. a:  $P < 0,05$  en comparación con los valores para la dieta de control más el grupo con el vehículo; b:  $P < 0,05$  en comparación con los valores para la dieta con UMP más el grupo con el vehículo.

15 Figura 6. Efectos de la dieta con UMP y DHA en los niveles de NF-70 (A) y NF-M (B) en el cerebro. Los gerbilinos recibieron las dietas descritas en la leyenda de la figura 5 durante 21 días (paneles de la izquierda) o 28 días (paneles de la derecha). Los días 22 y 29, se recogieron los cerebros y se los sometió a prueba para determinar los valores de NF-70. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico usando ANOVA unilateral y la prueba de Tukey. A. \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$  en comparación con los valores para la dieta de control + grupo con el vehículo. B). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . No se observaron diferencias significativas en los niveles de la proteína citoesquelética beta-tubulina entre los grupos.

20 Figura 7. Efectos de la dieta con UMP y DHA en los niveles de PSD-95 y sinapsina-1 del cerebro. A) Los gerbilinos recibieron una dieta de control más goma arábica al 5 % por sonda, o bien, una dieta que contenía UMP (0,5 %) más DHA (300 mg/kg) disuelto en el vehículo, por sonda, durante 7 días (paneles de la izquierda) o 21 días (paneles de la derecha). Al día siguiente, los cerebros se recogieron y sometieron a prueba para determinar PSD-95 (A) o Sinapsina-1 (B). A. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando ANOVA unilateral seguido por la prueba de Tukey. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  en comparación con los valores para la dieta de control más el grupo con el vehículo. B). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Figura 8. Aumento en la densidad de la columna dendrítica en el hipocampo de los gerbilinos adultos.

Figura 9. Efecto de la uridina y/o DHA en el aprendizaje.

30 Figura 10. Efecto del DHA en la síntesis de los fosfolípidos en las neuronas cultivadas del hipocampo. Eje vertical: muestra de  $^{14}\text{C}$  DPM/ 50 ml.

### Descripción detallada de la invención

35 La presente solicitud describe composiciones que aumentan o potencian la síntesis y los niveles de los fosfolípidos, la sinapsis, las proteínas sinápticas y las membranas sinápticas en una célula neuronal o célula cerebral, y que se pueden usar para el tratamiento de un sujeto con un trastorno de la memoria, un deterioro de la memoria, un trastorno neurológico o enfermedad o trastorno cerebral.

De esta manera, la presente invención provee una composición que consiste en: (1) ácido docosahexaenoico (DHA), (2) uridina o uridin-5'-monofosfato y (3) colina o una sal de colina, para usar como un medicamento, tales como un medicamento para un ser humano.

40 La invención también provee una composición que comprende: (1) ácido docosahexaenoico (DHA), (2) uridina o uridin-5'-monofosfato y (3) colina o una sal de colina, para usar en el tratamiento de un sujeto humano con un trastorno seleccionado entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy enfermedad Huntington y deterioro cognitivo leve (MCI).

En una realización de las composiciones de la presente invención, se proveen el ácido graso omega-3, ácido docosahexaenoico (DHA), la uridina y la colina o una sal de colina, en una composición farmacéutica.

45 Tal como se provee en la presente, los resultados presentados en los ejemplos 1 y 5 demuestran que la administración de ácido docosahexaenoico (DHA) - un ácido graso omega-3 - a las células neuronales y cerebrales aumenta su síntesis de los fosfolípidos, según se evidencia por una mayor incorporación de colina marcada. La administración de DHA aumentó la síntesis de los fosfolípidos totales, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (ejemplo 2), lo que demuestra que el efecto no se limita a los fosfolípidos particulares. Las células PC12 presentan funciones diferenciadas de las células neuronales y se emplean comúnmente en la técnica como un modelo de una línea celular de las células neuronales. Los resultados presentados en el ejemplo 11 demuestran que el DHA aumenta la síntesis de los fosfolípidos en las neuronas en un cultivo a corto plazo.

55 Las composiciones descritas en la presente son capaces aumentar la síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o una célula cerebral de un sujeto. El fosfolípido que aumenta por las composiciones de la presente invención puede ser un ácido fosfatídico. La frase "ácido fosfatídico", en otra realización, es sinónimo del término

“fosfátido”. En otras realizaciones, el fosfolípido puede ser una fosfatidilcolina (“PC”, ejemplo 1), una fosfatidiletanolamina (“PE”, ejemplo 2), una fosfatidilserina (“PS”, un fosfatidilinositol (“PI”, una esfingomielina, un fosfoglicérido o cualquier otro fosfolípido conocido en la técnica.

5 En otra realización, el PI, aumenta en gran medida por las composiciones de la presente invención, actúa como un depósito de 1 o más segundas moléculas mensajeras. En otra realización, la segunda molécula mensajera es inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>). En otra realización, la segunda molécula mensajera es diacilglicerol (DAG). En otra realización, la señalización de la proteína cinasa C (PKC) aumenta por las composiciones de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización corriente debajo de IP<sub>3</sub> se activa por las composiciones de la presente invención. En otra realización, los niveles de calcio intracelulares aumentan por las composiciones de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización corriente abajo del DAG se activa por las composiciones de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización corriente abajo de la PKC se activa por las composiciones de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización corriente abajo del calcio intracelular se activa por composiciones de la presente invención.

15 En otra realización, la esfingomielina, incrementada por las composiciones de la presente invención, actúa como una fuente de ceramida.

En otra realización, el DHA y/o el UMP en composiciones de la presente invención actúan como precursores volumétricos de fosfolípidos celulares. En otra realización, el UMP actúa activando los receptores de P2Y para el UMP formado a partir de la uridina. En otra realización, el DHA actúa activando la sintaxina-3. En otra realización, se emplea una combinación de estos mecanismos.

20 En otra realización, según se demuestra por los datos aquí presentados, la administración de DHA y UMP es eficaz para usar en el tratamiento de un trastorno caracterizado por un deterioro en la formación de la sinapsis o mielinación.

Según se proporciona en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina a los gerbilinos, cuyo metabolismo de la pirimidina se parece al de los seres humanos, aumenta los niveles de las proteínas neurofibrilares de las neuritas NF-70 y NF-M, de la proteína de densidad postsináptica PSD-95 y de la proteína vesicular Sinapsina-1 (ejemplo 7). De esta manera, la administración de DAH aumenta los niveles de las membranas sinápticas en el cerebro y células neuronales. En otra realización, en las condiciones utilizadas en la presente, las composiciones de la presente invención también son útiles para aumentar la señalización neuronal. En otra realización, en las condiciones que se utilizan en la presente, las composiciones de la presente invención también son de utilidad para mejorar la función neuronal. En otra realización, en las condiciones que se utilizan en la presente, las composiciones de la presente invención también son de utilidad para aumentar el sobrecrecimiento neurítico.

30 El ácido graso omega-3 utilizado en las composiciones de la presente invención es el DHA, un ácido graso poliinsaturado omega-3 (PUFA) (véanse los ejemplos 1-2). El DHA es un ácido graso poliinsaturado omega-3, de 22 carbonos, también denominado ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico.

35 Tal como se provee en la presente, el DHA, el EPA y el AA - todos ellos - incrementan los niveles de los fosfolípidos en el cerebro (ejemplo 8). Así, los efectos aquí descritos no son específicos del DHA, sino que más bien, en las condiciones que se utilizan en la presente, son generalizables a los PUFA omega-3 y omega-6 como una familia.

40 Tal como se provee aquí, los resultados presentados en el ejemplo comparativo 3 demuestran que la administración del ácido araquidónico, un ácido graso omega-6, a las células neuronales y cerebrales aumenta su síntesis de los fosfolípidos, tal como se evidencia por una mayor incorporación de colina marcada más adelante. Las células SHSY-5Y derivan de un neuroblastoma humano y se usan como sistema modelo para las funciones neuronales. El aumento de la síntesis de los fosfolípidos da como resultado un incremento en sus niveles.

Tal como se provee en la presente, el ácido graso omega-3 DHA actúa de manera sinérgica con la uridina (por ejemplo, UMP) para incrementar la síntesis de los fosfolípidos y los niveles de fosfolípido.

45 Las composiciones aquí descritas son capaces de aumentar el nivel de un fosfolípido de una célula cerebral de un sujeto.

Las composiciones aquí descritas también son capaces de aumentar un nivel de un fosfolípido de una célula neuronal de un sujeto.

50 Las composiciones aquí descritas son capaces de aumentar o potenciar la síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o célula cerebral de un sujeto.

Las composiciones aquí descritas son capaces de aumentar una cantidad de una membrana sináptica de una célula neuronal o célula cerebral de un sujeto.

Los métodos para medir la cantidad de membrana sináptica en el cerebro de un sujeto son ampliamente conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Oertner TG et al (Facilitation at single synapses probed with optical

quantal analysis. Nat Neurosci. 2002 Jul; 5(7):657-64); Bloodgood BL et al (Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. Science. 2005 Nov 4; 310 (5749):866-9); El Fakhri G et al (Generalized five-dimensional dynamic and spectral factor analysis. Med Phys. 2006 Apr;33 (4):1016-24); y Pautler RG. Biological applications of manganese-enhanced magnetic resonance imaging. Methods Mol Med. 2006;124:365-86). Cada método representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de un sujeto con enfermedad de Alzheimer, por la que el ácido graso omega-3 DHA aumenta la síntesis de un fosfolípido mediante las células neuronales o las células cerebrales, y así, el tratamiento de un sujeto con enfermedad de Alzheimer.

Conforme se provee en la presente, las composiciones que comprenden ácidos grasos omega-3, ácidos grasos omega-6 y/o uridina aumentan la cantidad de membranas sinápticas en las células neuronales. De esta manera, las composiciones de la presente invención tienen utilidad en el tratamiento enfermedad de Alzheimer.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de la estimulación de la síntesis de los fosfolípidos, lo cual aumenta los niveles de fosfolípidos en las células cerebrales o neuronales diana. Los niveles de fosfolípidos suficientes son importantes en muchos aspectos de la función neuronal, por ejemplo, la señalización sináptica, la función neurotransmisora, la ramificación y el sobrecrecimiento neurítico etc. y también son importantes en la función cerebral adecuada.

En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en un estadio incipiente. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en un estadio leve. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en un estadio moderado. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en uno de los últimos estadios. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en un estadio grave. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en un estadio indeterminado. En otra realización, la enfermedad de Alzheimer está en cualquier estadio de la enfermedad conocido en la técnica.

En otra realización, el estadio de la enfermedad de Alzheimer se evalúa usando la escala de Evaluación Funcional (FAST). La escala FAST fue desarrollada por el Dr. Reisberg y colaboradores. Divide el avance de la enfermedad de Alzheimer en 16 etapas sucesivas, bajo 7 categorías principales de capacidades y pérdidas funcionales. Estas categorías funcionales son las siguientes: el estadio 1 se define como un adulto normal, sin deterioro en la función o en la memoria. El estadio 2 se define como un adulto de edad avanzada normal, que tiene cierta conciencia personal del deterioro funcional, que típicamente se queja de un déficit en la memoria y de que olvida los nombres de personas y lugares que le son familiares. El estadio 3 (inicio de la enfermedad de Alzheimer) se manifiesta en situaciones laborales demandantes. Los signos incluyen una o más de las siguientes situaciones: desorientación cuando viaja a un lugar desconocido; quejas de sus colegas por un menoscabo en el desempeño; déficits para encontrar los nombres y las palabras; una menor capacidad de recordar información de un párrafo en un libro o de recordar el nombre de una persona que le acaban de presentar; extraviar o traspapelar objetos de valor; menor concentración. En el estadio 4 (enfermedad de Alzheimer leve), el paciente puede requerir asistencia en tareas complicadas, tales como planificar una fiesta o hacerse cargo de las finanzas, presenta problemas para recordar los eventos de la vida y tiene dificultades para concentrarse y viajar. En el estadio 5 (enfermedad de Alzheimer moderada, el paciente requiere asistencia para llevar a cabo las tareas cotidianas, tales como elegir la ropa adecuada. Desorientación en el tiempo e incapacidad de recordar información importante de sus vidas actuales, aunque el paciente de todos modos aún puede recordar información importante sobre sí, su familia y otras personas. En el estadio 6 (enfermedad de Alzheimer moderadamente grave), el paciente empieza a olvidar cantidades significativas de información sobre sí mismos y su entorno y requiere asistencia para vestirse, bañarse e ir al baño. Se presentan incontinencia urinaria y alteraciones en los patrones del sueño. Los cambios de personalidad y emocionales se tornan bastante evidentes. Como los pacientes no pueden recordar la información durante el tiempo suficiente para actuar en consecuencia con sus pensamientos, pierden la fuerza de voluntad (abulia cognitiva). En el estadio 7 (enfermedad de Alzheimer grave), la capacidad del habla se limita solo a seis o siete palabras y el vocabulario inteligible puede limitarse a una sola palabra. El paciente pierde la capacidad de caminar, sentarse, sonreír y eventualmente, no puede mantener erguida la cabeza. Cada estadio de la enfermedad de Alzheimer representa una realización separada de la presente invención.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de elevar el nivel de PC en el cerebro en un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto, e incrementando de esta manera el nivel de PC en el cerebro de un sujeto.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de elevar el nivel de SM en el cerebro en un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar el nivel de PI en el cerebro en un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

Las composiciones descritas en este documento también son capaces de aumentar el nivel de PE en el cerebro en un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

Las composiciones descritas en este documento también son capaces de aumentar el nivel de PS en el cerebro en

un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

Las composiciones descritas en este documento actúan para mejorar la función cognitiva en un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

5 Tal como se provee en la presente, el DHA y el UMP mejoraron el desempeño de los animales en una prueba de la memoria (ejemplo 10). De este modo, las composiciones de la presente invención son eficaces para mejorar y optimizar la memoria y otras funciones cognitivas.

10 Según se proporciona en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina aumenta los niveles y la síntesis de los fosfolípidos en el cerebro, los niveles de proteínas neurofibrilares de las neuritas y la cantidad de membranas sinápticas. De esta manera, las composiciones de la presente invención aumentan y optimizan la función cognitiva, la función neurológica, la inteligencia, la transmisión sináptica y los niveles y la actividad de los neurotransmisores.

Las composiciones descritas en este documento actúan para mejorar una función neurológica en un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

15 En una realización, la función neurológica mejorada gracias a la composición de la presente puede ser la transmisión sináptica, tales como la transmisión sináptica adyacente a una neurona motriz, adyacente a una interneurona o adyacente a una neurona sensorial.

En otra realización, la función neurológica que se mejora u optimiza puede ser una función de un neurotransmisor. Mejorar u optimizar una función de un neurotransmisor puede tener lugar incrementando el nivel del neurotransmisor en la sinapsis, aumentando la liberación de los neurotransmisores en la sinapsis o sin cambiar el nivel o la liberación de los neurotransmisores en una sinapsis.

20 En otra realización, "mejorar" una función cognitiva o neurológica o la inteligencia se refiere a efectuar una mejora del 10 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 20 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 30 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 40 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 50 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 60 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 70 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 80 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 90 % en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 100 % en dicha función.

30 En otra realización, la mejora de una función cognitiva o neurológica o la inteligencia se evalúa con relación a la función antes de iniciar el tratamiento. En otra realización, la mejora se evalúa con relación a un sujeto no tratado. En otra realización, la mejora se evalúa según un criterio estandarizado, como por ejemplo, una prueba o similar.

35 En otra realización, la mejora de una función cognitiva o neurológica o la inteligencia se evalúa por la cantidad de conexiones entre las neuronas en el cerebro de un sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por la cantidad de capilares en el cerebro del sujeto o en una región específica del cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por la actividad neuronal. En otra realización, la mejora se evalúa por la función neuronal. En otra realización, la mejora se evalúa por la función lingüística. En otra realización, la mejora se evalúa por la capacidad de comunicarse. En otra realización, la mejora se evalúa por la medición de los niveles de acetilcolina u otros neurotransmisores o los químicos cerebrales correlacionados con la función cognitiva. En otra realización, la mejora se evalúa por una tomografía con emisión de positrones (PET) realizada en el cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por una resonancia magnética nuclear (MRI) realizada en el cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por Instrumento de evaluación de las capacidades cognitivas (CASI) (Peila R et al, Accidente cerebrovascular. 32: 2882-9, 2001). En otra realización, la mejora se evalúa por una prueba tal como, por ejemplo, las pruebas descritas en este documento (ejemplo 13). En otra realización, se usa la prueba mini mental (Mini-Mental test) (Tsai L et al, The Mini-Mental State Test and computerized tomography. Am J Psychiatry. 1979 Apr;136(4A):436-8). Otros métodos para evaluar la mejora de la función cognitiva son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Antonova E et al (Schizophr Res. 2004 Oct 1;70(2-3):117-45) y en Function Cognitive Analysis (Greenwood Pub Group, 1998).

50 Las composiciones descritas en este documento son capaces de inhibir una declinación en los números de sinapsis en el cerebro de un sujeto aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar una cantidad o un nivel de un neurotransmisor en el cerebro o SNC de un sujeto aumentando la síntesis de los fosfolípidos en el cerebro o SNC.

55 En una realización, el neurotransmisor cuyos niveles o actividad, o liberación se efectúa por los métodos de la presente invención es la acetilcolina. En otra realización, el neurotransmisor es el glutamato. En otra realización, el neurotransmisor es la dopamina. En otra realización, el neurotransmisor es la serotonina. En otra realización, el neurotransmisor es 5-hidroxitriptamina (5-HT). En otra realización, el neurotransmisor es GABA En otra realización,

el neurotransmisor es cualquier otro neurotransmisor conocido en la técnica. Cada tipo de neurotransmisor representa una realización separada de la presente invención.

5 Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar u optimizar la capacidad de una célula cerebral de un sujeto de liberar reiteradamente una cantidad efectiva de un neurotransmisor en la sinapsis, aumentando la síntesis de los fosfolípidos por la célula cerebral.

Según se proporciona en la presente memoria, la densidad de espinas dendríticas aumentó en animales a los que se les había administrado DHA y/o uridina (ejemplo 9). Así, las composiciones de la presente invención aumentan la cantidad y el tamaño de la sinapsis en el cerebro y la capacidad de las células cerebrales de señalizar mediante los neurotransmisores.

10 Según se proporciona en la presente memoria, la administración del DHA y/o de uridina aumenta los niveles y la síntesis de los fosfolípidos en el cerebro, los niveles de proteínas neurofibrilares de las neuritas y la cantidad de membranas sinápticas. Así, las composiciones de la presente invención aumentan y optimizan la liberación y las cantidades de neurotransmisores.

15 Las composiciones descritas en este documento son capaces de mejorar u optimizar la inteligencia de un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar la cantidad de espinas dendríticas en el cerebro o en una región del mismo de un sujeto, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto.

20 La inteligencia que se mejora u optimiza mediante las composiciones de la presente invención puede ser la inteligencia lingüística, la inteligencia musical, la inteligencia espacial, la inteligencia corporal, la inteligencia interpersonal, la inteligencia intrapersonal o la inteligencia lógico-matemática.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de facilitar u optimizar la reparación del cerebro en un sujeto.

25 En otra realización, la reparación del cerebro puede facilitarse u optimizarse después de un accidente cerebrovascular, después de una lesión cerebral o después de cualquier otro evento, enfermedad o trastorno conocido en la técnica que requiera la reparación del cerebro.

30 En otra realización, el sujeto cuya función cognitiva, función neurológica, inteligencia, transmisión sináptica o niveles y actividad de los neurotransmisores se mejora u optimiza mediante la composición de la presente invención tiene un deterioro cognitivo o trastorno de la memoria. En otra realización, el sujeto es de edad avanzada. En otra realización, el sujeto no tiene deterioro cognitivo ni trastorno de la memoria.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar la sensibilidad de una neurona ante un estímulo.

35 Según se proporciona en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina aumenta los niveles y la síntesis de los fosfolípidos en el cerebro, los niveles de proteínas neurofibrilares de las neuritas y la cantidad de membranas sinápticas. De esta manera, las composiciones de la presente invención pueden actuar para aumentar y optimizar la sensibilidad de las neuronas a los estímulos y el tamaño y número de sinapsis en el cerebro y sistema nervioso central (SNC).

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar un tamaño promedio de la sinapsis en el cerebro de un sujeto.

40 Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar el número de sinapsis en el cerebro de un sujeto.

45 Los métodos para medir y estimar el tamaño promedio de la sinapsis, el número de sinapsis y el nivel de actividad sináptica y liberación de neurotransmisores en el cerebro y en el SNC de un sujeto son ampliamente conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Wheeler DW et al (Estimating use-dependent synaptic gain in autonomic ganglia by computational simulation and dynamic-clamp analysis. *J Neurophysiol.* 2004 Nov; 92(5):2659-71), Viele K et al (Estimating the number of release sites and probability of firing within the nerve terminal by statistical analysis of synaptic charge. *Sinapsis.* 2003 Jan; 47(1):15-25), y DeFelipe J et al (Estimation of the number of de synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. *Cereb Cortex.* 1999 Oct-Nov; 9 (7):722-32).

50 Las composiciones descritas en este documento son capaces de estimular u optimizar la producción de una membrana de una célula cerebral o una célula neuronal de un sujeto.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar los niveles de fosfolípido al tiempo que se preservan sustancialmente las relaciones de 2 o más fosfolípidos en las células cerebrales o neuronales diana. En otra realización, las composiciones de la presente invención aumentan los niveles de fosfolípido, al tiempo que

5 preservan sustancialmente las relaciones de 3 o más fosfolípidos en las células cerebrales o neuronales diana. En otra realización, las composiciones de la presente invención aumentan los niveles de fosfolípidos al tiempo que preservan sustancialmente las relaciones de 4 o más fosfolípidos en la célula cerebral o neuronal diana. En otra realización, los fosfolípidos se seleccionan entre PC, PE, PS y esfingomielina (SM). En otra realización, la preservación sustancial de estas relaciones es importante en los aspectos anteriores de la función neuronal y cerebral.

10 “Preservar sustancialmente” se refiere, en otra realización, a una desviación inferior al 10 % respecto de la relación previa. En otra realización, “preservar sustancialmente” se refiere a una desviación inferior al 15 %. En otra realización, la desviación es menor que el 20 %. En otra realización, es menor que el 25 %. En otra realización, es menor que el 30 %. En otra realización, es menor que el 35 %. En otra realización, es menor que el 40 %. En otra realización, es menor que el 45 %. En otra realización, es menor que el 50 %. En otra realización, es menor que el 55 %. En otra realización, es menor que el 60 %. En otra realización, es menor que el 65 %. En otra realización, es menor que el 70 %. En otra realización, es menor que el 75 %. En otra realización, es menor que el 80 %. En otra realización, es menor que el 85 %. En otra realización, es menor que el 90 %. En otra realización, es menor que el 95 %.

20 La estimulación de síntesis de los fosfolípidos por las composiciones descritas en este documento optimiza la ramificación neurítica o el sobrecrecimiento neurítico, y aumenta el conjunto de grupos de fosfolípidos que se pueden liberar mediante la activación de las fosfolipasas. Algunos de los grupos de fosfolípidos son bioactivos, tales como el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), el diacilglicerol (DAG) y el factor liso activador de plaquetas (lyso-PAF), que al continuar el metabolismo, dan lugar al lípido bioactivo, PAF (1-0-alkuil-2-acetil-sn-3-glicerol-3-fosfocolina).

En otra realización, la estimulación de la síntesis de los fosfolípidos mediante las composiciones descritas en este documento protege las membranas sinápticas contra el estrés, tal como el estrés oxidante o cualquier otro tipo de estrés conocido en la técnica.

25 Cada uno de estos efectos de estimulación de síntesis de los fosfolípidos optimiza, en otra realización, la señalización mediada por los neurotransmisores, ralentizando de esta manera la memoria. En otra realización, la pérdida o el deterioro de la memoria se detiene debido a uno de los efectos anteriores. En otra realización, la pérdida de la memoria se revierte como consecuencia de uno de los efectos anteriores.

30 Las composiciones descritas en este documento son aptas para el tratamiento de un sujeto con un deterioro de la memoria o con pérdida de la memoria, aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante una célula neuronal o célula cerebral, tratando de esta manera al sujeto con un deterioro de la memoria o pérdida de la memoria.

35 En otra realización, el deterioro de la memoria está relacionado con la edad. En otra realización, el deterioro de la memoria es secundario a una enfermedad cerebrovascular. En otra realización, el deterioro de la memoria es secundario a un accidente cerebrovascular. El accidente cerebrovascular es, en otra realización, un accidente cerebrovascular clínico. En otra realización, el accidente cerebrovascular es un accidente cerebrovascular subclínico. En otra realización, el deterioro de la memoria es el resultado de múltiples accidentes cerebrovasculares subclínicos menores. En otra realización, el deterioro de la memoria es secundario a un cardiovascular cause. En otra realización, el deterioro de la memoria es secundario a una causa cardiovascular relacionada con la edad.

40 En otra realización, el deterioro de la memoria es secundario a una depresión, por ejemplo como resultado de la depresión. Tal como es conocido en la técnica, las personas deprimidas a menudo presentan alteraciones de la memoria, incluso hasta el grado en que las personas mayores con depresión reciben un diagnóstico equivocado, enfermedad de Alzheimer. Las composiciones de la presente invención aumentarán, en otra realización, la liberación de neurotransmisores que según se sabe, participan tanto en la depresión (por ejemplo, dopamina, norepinefrina y serotonina) y en el deterioro de la memoria (por ejemplo, acetilcolina).

En otra realización, el deterioro de la memoria es secundario al insomnio.

45 En otra realización, el deterioro de la memoria es el resultado de cualquier otra causa del deterioro de la memoria conocido en la técnica.

50 “Relacionado con la edad”, en otra realización, se refiere a una consecuencia de la edad avanzada. En otra realización, la edad supera los 65 años. En otra realización, la edad supera los 60 años. En otra realización, la edad supera los 55 años. En otra realización, la edad supera los 68 años. En otra realización, la edad supera los 70 años. En otra realización, la edad supera los 72 años. En otra realización, la edad supera los 75 años. En otra realización, la edad supera los 78 años. En otra realización, la edad supera los 80 años. En otra realización, la edad supera los 85 años. En otra realización, la edad supera los 90 años. En otra realización, “relacionado con la edad” se refiere a una consecuencia de cualquier edad asociada con un deterioro de la memoria, como resultado de cualquier enfermedad o trastorno que comprenda al deterioro de la memoria.

55 El sujeto de la presente invención es un ser humano. En otra realización, el sujeto es de sexo femenino. En otra realización, el sujeto es de sexo masculino. En otra realización, el sujeto es una mujer embarazada. En otra realización, el sujeto es una mujer en período de lactancia. En otra realización, el sujeto es un bebé. En otra

realización, el sujeto es un niño. En otra realización, el sujeto es un niño pequeño. En otra realización, el sujeto es un adulto. En otra realización, el sujeto es un adulto que está envejeciendo. En otra realización, "envejecer" se refiere a cualquiera de las realizaciones enumeradas con anterioridad.

5 "Bebé" se refiere, en otra realización, a un sujeto que tiene menos de 1 año. En otra realización, el término se refiere a un sujeto cuya edad es inferior a 18 meses. En otra realización, el término se refiere a un sujeto cuya edad es inferior a 6 meses, inferior a 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 13 meses, 14 meses o inferior a 16 meses. En otra realización, el término se refiere a un sujeto cuya edad es inferior a 20 meses o inferior a 2 años. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que todavía no ha sido destetado. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que ha sido destetado, pero que se encuentra incluido dentro de los intervalos etarios antes citados.

"Niño" se refiere, en otra realización, a un sujeto cuya edad es inferior a 18 años. En otra realización, el término se refiere a un sujeto cuya edad es inferior a 17 años, que tiene una edad inferior a 16 años, 15 años, 14 años, 13 años, 12 años, 11 años, 10 años, 9 años, 8 años, o que tiene una edad inferior a 7 años.

15 "Niño pequeño" se refiere, en otra realización, a un sujeto cuya edad es inferior a 7 años. En otra realización, el término se refiere a un sujeto cuya edad es inferior a 6 años, o que tiene una edad inferior a 5 años, que tiene una edad inferior a 4 años, que tiene una edad inferior a 3 años y medio, que tiene una edad inferior a 3 años o que tiene una edad inferior a 2 años y medio.

20 "Adulto" se refiere, en otras realizaciones, a un sujeto que supera una de las edades mencionadas anteriormente como el límite superior para un niño. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que supera una de las edades mencionadas anteriormente como el límite superior para un niño pequeño.

25 En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de un sujeto con enfermedad de Pick, que comprende: (a) uridina o uridin-5'-monofosfato y (b) el ácido graso omega-3 DHA y (c) colina o una sal de colina, por lo cual la composición aumenta un síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto, tratando así a un sujeto con enfermedad de Pick. En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de un sujeto con enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende: (a) uridina o uridin-5'-monofosfato, y (b) el ácido graso omega-3 DHA y (c) colina o una sal de colina, por lo cual, la composición aumenta un síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto, tratando así a un sujeto con enfermedad de cuerpos de Lewy. En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de un sujeto con enfermedad Huntington, que comprende: (a) uridina o uridin-5'-monofosfato, y (b) el ácido graso omega-3 DHA y (c) colina o una sal de colina, por lo cual, la composición aumenta un síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto, tratando así a un sujeto con enfermedad Huntington. En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de un sujeto con un MCI, que comprende: (a) uridina o uridin-5'-monofosfato, y (b) el ácido graso omega-3 DHA, y (c) colina o una sal de colina, por lo cual, la composición aumenta un síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto, tratando así a un sujeto con un MCI.

Las composiciones descritas en este documento son aptas para el tratamiento de un sujeto con demencia vascular, aumentando la síntesis de un fosfolípido mediante una célula neuronal o célula cerebral del sujeto, tratando así a un sujeto que padece demencia vascular.

40 Las composiciones descritas en este documento son aptas para el tratamiento de un sujeto con un trastorno neurológico relacionado con el envejecimiento aumentando la síntesis de un fosfolípido mediante la célula neuronal o célula cerebral, tratando así a un sujeto con un trastorno neurológico relacionado con el envejecimiento.

45 En otra realización de composiciones de la presente invención, el DHA o la composición de la presente invención ejerce uno de los efectos enumerados en este documento, aumentando la síntesis de los fosfolípidos. En otra realización, el efecto se manifiesta sin aumentar la síntesis del fosfolípido.

50 En una realización, las composiciones de la presente invención pueden comprender una fuente de uridina. El término "fuente" se refiere a un compuesto que aumenta la concentración del compuesto deseado (uridina, colina, etc.) en el torrente sanguíneo o en los tejidos. En otra realización, la "fuente" se refiere a un compuesto que se metaboliza mediante un tejido o enzima del sujeto al compuesto deseado. En otra realización, la "fuente" se refiere a un compuesto que se metaboliza mediante una célula diana al compuesto deseado. En otra realización, la fuente de uridina es citidina, que se convierte en uridina mediante el hígado humano.

55 En otra realización, la fuente de uridina es una citidin-5' monofosfato. En otra realización, la fuente de uridina es una citidin-5' difosfato. En otra realización, la fuente de uridina es una citidin-5' trifosfato. En otra realización, la fuente de uridina es cualquier otro fosfato de citidina conocido en la técnica. En otra realización, la fuente de uridina es una CDP-colina.

El uridin-fosfato utilizado en las composiciones de la presente invención es uridin-5'-monofosfato.

En otras realizaciones, los compuestos basados en uridina distintos de la uridina propiamente dicha, sirven como fuentes de uridina. Estos son, en otras realizaciones, alimentos ricos en uridina o productos dietarios como algas; sales de uridina como uridin-fosfatos o similares.

5 Las composiciones de la presente invención comprenden, asimismo, colina o una sal de colina. En otra realización, la administración de uno de los compuestos anteriores aumenta el efecto del DHA y la uridina en la síntesis de los fosfolípidos de la membrana. Según se proporciona en la presente memoria (ejemplos), la administración de colina y DHA exhibe un aumento imprevisto de los niveles de fosfolípidos, las proteínas sinápticas y las membranas sinápticas en las neuronas y el tejido cerebral y de las funciones de la memoria, de la inteligencia y cognitiva y neurológicas.

10 En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden el ácido graso omega-3 DHA, una uridina y una colina o una sal de colina.

En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden el ácido graso omega-3 DHA, una uridine y una colina o una sal de colina.

15 En otra realización, se incluyen 2 ácidos grasos omega-3 diferentes. 1 de los 2 ácidos grasos omega-3 es el DHA. En otra realización, los 2 ácidos grasos omega-3 son ácido eicosapentaenoico (EPA) y DHA.

20 En otra realización, la relación de los 2 ácidos grasos omega-3 es 0,05:1. En otra realización, la relación es 0,1:1. En otra realización, la relación es 0,15:1. En otra realización, la relación es 0,2:1. En otra realización, la relación es 0,3:1. En otra realización, la relación es 0,4:1. En otra realización, la relación es 0,5:1. En otra realización, la relación es 0,6:1. En otra realización, la relación es 0,7:1. En otra realización, la relación es 0,8:1. En otra realización, la relación es 0,9:1. En otra realización, la relación es 1:1. En otra realización, el DHA y el EPA se incluyen en una de las relaciones anteriores (DHA:EPA). En otra realización, el DHA y el EPA se incluyen en una de las relaciones anteriores (EPA:DHA).

25 En otra realización, la sal de colina es una sal sulfonato; por ejemplo, una sal sulfonato de cadena de alquilo larga. En otra realización, la sal de colina es cloruro de colina, bitartrato de colina, citrato de colina, tartrato de colina, un complejo de hierro-citrato de colina o cualquier otra sal de colina conocido en la técnica.

En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que consiste en cualquiera de las composiciones descritas en este documento de la presente invención.

30 En otra realización, la presente invención provee una composición para usar en el tratamiento de la enfermedad de Pick, de la enfermedad de cuerpos de Lewy o de la enfermedad Huntington, que consiste en cualquiera de las composiciones descritas en este documento de la presente invención.

35 En otra realización, las composiciones de la presente invención ejercen sus efectos incluso en los sujetos que no tienen una deficiencia en los ácidos grasos omega-3 o ácidos grasos omega-6. En otra realización, se utiliza una dosis farmacológica de DHA en las composiciones de la presente invención. En otra realización, se utiliza una dosis terapéutica. En otra realización, las dosis farmacológicas son mayores que las que se ingerirían normalmente en una dieta rica en PUFA. En otra realización, los niveles de la membrana de un sujeto que no tiene una deficiencia de PUFA aumentan gracias a la administración de las dosis farmacológicas de DHA y/o uridina. En otra realización, los resultados de la presente invención demuestran que el PUFA ejerce un efecto bioquímico en el cerebro, apoyando así el uso de las dosis farmacológicas de PUFA.

40 La dosificación del DHA incluido en las composiciones de la presente invención se ubica, en otra realización, en el intervalo de aproximadamente 400-2000 mg/día. En otra realización, la dosificación se ubica en el intervalo de aproximadamente 500-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 600-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 800-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1000-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1200-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1500-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 400-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación se ubica en el intervalo de aproximadamente 500-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 600-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 800-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1000-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1200-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1500-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 2000-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 400-4000 mg/día. En otra realización, la dosificación se ubica en el intervalo de aproximadamente 500-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 600-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 800-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1000-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1200-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 1500-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 2000-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 3000-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 400-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 500-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 600-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es de aproximadamente 800-100 mg/día.



mg/día. En otra realización, la dosis es de 50-500 mg/día. En otra realización, la dosis es de 100-500 mg/día. En otra realización, la dosis es de 150-500 mg/día. En otra realización, la dosis es de 200-500 mg/día. En otra realización, la dosis es de 300-500 mg/día. En otra realización, la dosis de uridina es de entre 10 y 400 mg/día. En otra realización, la dosis es de 20-400 mg/día. En otra realización, la dosis es de 30-400 mg/día. En otra realización, la dosis es de 50-400 mg/día. En otra realización, la dosis es de 100-400 mg/día. En otra realización, la dosis es de 150-400 mg/día. En otra realización, la dosis es de 200-400 mg/día. En otra realización, la dosis de uridina varía entre 10 y 300 mg/día. En otra realización, la dosis es de 20-300 mg/día. En otra realización, la dosis es de 30-300 mg/día. En otra realización, la dosis es de 50-300 mg/día. En otra realización, la dosis es de 100-300 mg/día. En otra realización, la dosis es de 150-300 mg/día. En otra realización, la dosis es de 200-300 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 50 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 70 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 100 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 150 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 200 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 300 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 400 mg/día. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 500 mg/día.

15 Cada dosis de uridina representa una realización separada de la presente invención.

La dosis de colina incluida en las composiciones de la presente invención, en otra realización, varía entre 100 mg y 10 g/día (inclusive). En otra realización, la dosis es de 1 g-3 g. En otra realización, la dosis es de 150 mg-8 g. En otra realización, la dosis es de 200 mg-6 g. En otra realización, la dosis es de 300 mg-5 g. En otra realización, la dosis es de 400 mg-4,5 g. En otra realización, la dosis es de 500 mg-4 g. En otra realización, la dosis es de 600 mg-4 g. En otra realización, la dosis es de 800 mg-3,5 g. En otra realización, la dosis es de 1,2 g-3 g. En otra realización, la dosis es de 1,5 g-2,5 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 0,5 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 0,7 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 1 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 1,2 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 1,5 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 2 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 2,5 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 3 g. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 4 g. Cada una de las dosis anteriores es la cantidad de equivalentes de colina; así, las dosis reales de un compuesto de colina (por ejemplo, cloruro de colina o tartrato de colina) serán correspondientemente mayores.

Cada dosis de colina representa una realización separada de la presente invención.

30 En otra realización, una composición de la presente invención debe administrarse crónicamente. "Crónicamente" se refiere, en otra realización, a la administración durante al menos 1 semana. En otra realización, el término se refiere a la administración durante al menos 2 semanas. En otra realización, el período es de al menos 10 días. En otra realización, el período es de al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 5 años, o el período es de al menos 10 años.

35 En otra realización, la composición de la presente invención se administra durante uno de los períodos anteriores

"Poner en contacto", en otra realización, se refiere a administrarle directamente al sujeto una composición de la presente invención. En otra realización, "poner en contacto" se refiere a administrarle indirectamente al sujeto una composición de la presente invención. De esta manera, en otra realización, el sujeto puede ponerse en contacto con un compuesto o una composición que se metaboliza en DHA en el líquido cefalorraquídeo, el torrente sanguíneo, etc., después de lo cual el DHA se pone en contacto con la célula cerebral por difusión o cualquier otro proceso de transporte activo o transporte pasivo conocido en la técnica, mediante el cual los compuestos circulan dentro del organismo. En otra realización, el compuesto se metaboliza por las células diana en DHA.

45 Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar ramificación neurítica de una célula neuronal de un sujeto aumentando la síntesis de los fosfolípidos por la célula neuronal, incrementando de esta manera la ramificación neurítica de los mismos.

Las composiciones descritas en este documento son capaces de aumentar el sobrecrecimiento neurítico de una célula neuronal de un sujeto aumentando la síntesis de los fosfolípidos mediante la célula neuronal, incrementando de esta manera el sobrecrecimiento neurítico de los mismos.

50 "Composición farmacéutica" se refiere, en otra realización, a un suplemento dietario. En otra realización, el término se refiere a un suplemento nutricional. En otra realización, el término se refiere a un producto alimenticio de cualquier clase que se haya enriquecido con el DHA, la uridina, la colina o la sal de colina.

"Producto alimenticio" se refiere, en otra realización, a un alimento sólido. En otra realización, el término se refiere a una bebida. En otra realización, el término se refiere a una mezcla en polvo para una bebida. En otra realización, el término se refiere a una preparación basada en un alimento, un alimento funcional, un suplemento dietario o nutracéutico.

En otra realización, un producto alimenticio puede presentarse de varias maneras, incluso en forma líquida, en suspensión, en polvo, en forma semisólida y sólida. Por forma semisólida debe entenderse los flanes, budines,

- 5 cremas espesas, espumas, postres helados, yogures y gelatinas edulcoradas. Sin limitarse a realizaciones en particular, la forma sólida se puede preparar como una barra, similar a una barra energética, un chip, una masita, una galletita, una pasta o un material inflado, por ejemplo, palomitas de maíz o un producto alimenticio parecido a una galleta de arroz. Algunas realizaciones requieren que el individuo disuelva, suspenda o rehidrate el producto alimenticio para copetín.
- 10 En otra realización, la presente invención se refiere al uso del DHA y/o de su isómero óptico, de una sal farmacéuticamente aceptable, un producto farmacéutico, hidrato, N-óxido o una combinación de ambos. De esta manera, en otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un isómero óptico del DHA. Las composiciones de la presente invención comprenden una sal farmacéuticamente aceptable del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un producto farmacéutico del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un hidrato del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un N-óxido del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden cualquiera de los siguientes: una combinación de isómero óptico, una sal farmacéuticamente aceptable, un producto farmacéutico, un hidrato o N-óxido del DHA.
- 15 La presente invención incluye, asimismo, en otra realización, derivados de un DHA. El término "derivados" incluye, aunque sin limitaciones, los derivados de éter, los derivados de ácido, los derivados de amida, los derivados de éster y similares. Además, la presente invención incluye, asimismo, hidratos de los compuestos de PUFA. El término "hidrato" incluye, aunque no de manera taxativa, hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato y similares.
- 20 La presente invención incluye, asimismo, productos farmacéuticos de los compuestos de DHA. La frase "producto farmacéutico" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico (composición farmacéutica), según se define en la presente.
- Además, la invención abarca isómeros (Z) y (E) puros del DHA y sus mezclas, así como también pares de enantiómeros (RR, SS) y (RS, SR) puros y sus mezclas.
- Composiciones farmacéuticas y métodos de administración
- 25 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser administradas a un sujeto mediante cualquier método conocido para una persona experta en la técnica, tales como, por las vías parenteral, paracancerosa, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.
- 30 En otra realización de las composiciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas han de administrarse por la vía oral y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como un sólido o una preparación líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pellets y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización de la presente invención, el ingrediente activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la presente invención comprenden, además del compuesto activo y el portador o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.
- 35 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración por inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas deben administrarse por la vía intravenosa y en consecuencia, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas deben administrarse por la vía intraarterial y de este modo, se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas han de administrarse por vía intramuscular y por ende, se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.
- 40 En otra realización, las composiciones farmacéuticas deben administrarse tópicamente a las superficies del cuerpo y por ende, se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen, en otra realización, geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares.
- 45 En otra realización, la composición farmacéutica se formula para ser administrada como un supositorio, por ejemplo, un supositorio rectal o un supositorio uretral. En otra realización, la composición farmacéutica debe administrarse mediante implante subcutáneo de un pellet. En otra realización, el pellet contempla la liberación controlada de PUFA y/o uridina durante un período.
- 50 En otra realización, el compuesto activo se suministra en una vesícula, por ejemplo, un liposoma.
- 55 En otras realizaciones, los portadores o diluyentes usados en los métodos de la presente invención incluyen, aunque no taxativamente, una goma, un almidón (por ejemplo almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco o mezclas de los mismos.

En otras realizaciones, los portadores farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas son soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, lo cual incluye solución salina y medios tamponados. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, aceite de otros animales marinos o un lípido de la leche o huevos.

En otra realización, los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer lactato y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrólitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Los ejemplos son líquidos estériles, tales como agua y aceites, con o sin añadir un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, los portadores líquidos preferidos son agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionadas y glicoles, tales como propilenglicoles o polietilenglicoles, en particular para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, aceite de otros animales marinos o un lípido de la leche o huevos.

En otras realizaciones, las composiciones comprenden, asimismo, aglutinantes (por ejemplo acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma de guar, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de guar, glicolato de almidón de sodio), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y concentración iónica, aditivos, tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en las superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de la proteasa, tensioactivos (por ejemplo, lauril-sulfato de sodio), mejoradores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilen-glicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por ejemplo, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metilcelulosa), agentes para aumentar la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, celulosa de etilo, goma de guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, Thimerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril-sulfato de sodio), auxiliares de la fluidez (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato dietílico, citrato trietilico), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropil-celulosa, lauril-sulfato de sodio), recubrimientos poliméricos (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo, celulosa de etilo, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes. Cada uno de los excipientes anteriores representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas provistas en la presente son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el DHA y/o la uridina se liberan durante un cierto período después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos liofílicos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra realización, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir, una composición en la que todo el PUFA y/o la uridina se liberan inmediatamente después de la administración.

En otra realización, la composición farmacéutica se formula para ser suministrada en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede administrarse usando una infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, es posible usar una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989). En otra realización, se emplean materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas en un implante. En otra realización más todavía, se coloca un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico, por ejemplo, el cerebro, requiriendo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984); y Langer R, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones también incluyen, en otra realización, la incorporación del material activo en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc. o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos). Tales composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo*.

En la presente invención también se incluyen las composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado con anticuerpos dirigidos contra receptores específicos de los tejidos, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de tejido-receptores específicos.

También quedan alcanzados por la invención los compuestos modificados por el anexo covalente de polímeros hidrosolubles, tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetil-celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. Se sabe que los compuestos modificados exhiben

semividas sustancialmente más prolongadas en sangre, después de una inyección intravenosa que los correspondientes compuestos sin modificar (Abuchowski et al., 1981; Newmark et al., 1982; y Katre et al., 1987). Estas modificaciones también pueden incrementar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, optimizar la estabilidad física y química del compuesto y reducir en gran medida la inmunogenia y reactividad del compuesto. Como resultado de ello, puede lograrse la actividad biológica *in vivo* mediante la administración de dichos aductos de compuesto polimérico con menor frecuencia o en menores dosis que con el compuesto sin modificar.

La preparación de las composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo, por ejemplo por mezcla, granulación o procesos para la formación de comprimidos, se comprende muy bien en la técnica. El principio activo terapéutico a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Para la administración oral, el PUFA y/o la uridina o sus derivados fisiológicamente tolerados, tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares se mezclan con aditivos habituales para este fin, tales como vehículos, estabilizadores o diluyentes inertes, y se convierten por métodos habituales en formas adecuadas para la administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, alcohólicas o aceitosas. Para la administración parenteral, el PUFA y/o la uridina o sus derivados fisiológicamente tolerados, tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares se convierten en una solución, suspensión o emulsión, si se desea con las sustancias habituales y adecuadas para este propósito, por ejemplo, solubilizantes u otras sustancias.

Un componente activo, en otra realización, se formula en la composición como formas de sales farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formados con los grupos amino libres del polipéptido o molécula de anticuerpo), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos, como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos de carboxilo libre también pueden obtenerse a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina procaína y similares.

#### Sección experimental detallada

##### Ejemplo 1

El tratamiento de las células PC-12 con ácidos grasos omega-3 aumenta la síntesis de los fosfolípidos

#### 30 Materiales y métodos experimentales

##### Reactivos

El cloruro de colina marcada con  $^{14}\text{C}$  se obtuvo de Perkin-Elmer (Boston, MA). El DHA, el ácido oleico o el ácido palmítico se obtuvieron de Biomol, (Plymouth Meeting, PA). La colina  $^{14}\text{C}$  se obtuvo de Amersham Biosciences Corp (Piscataway, NJ).

##### 35 Cultivo celular

Las células PC-12 se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) + 10 % suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*). Para los experimentos, las células se cultivaron en placas de 35 milímetros (mm) recubiertas con colágeno, por quintuplicado. Las células se incubaron durante 18 horas (h) en DMEM sin suero, que contenía 28  $\mu\text{M}$  de colina +/- 5 micromolares ( $\mu\text{M}$ ) de DHA, ácido oleico o ácido palmítico. Luego las células se marcaron durante 2,5 h con 0,5 microcurie ( $\mu\text{Ci}$ )/ml de colina  $^{14}\text{C}$  en DMEM sin suero que contenía 10 micromolares ( $\mu\text{M}$ ) de colina

##### Cuantificación de los fosfolípidos marcados

Las células se homogenizaron en 100 volúmenes de agua helada desionizada, usando un degradador de tejido (Politron PT 10-35, Kinematica AG, Suiza); luego se mezcló 1 ml de las alícuotas con 3 ml de una mezcla de cloroformo + metanol (2:1 v/v) y se centrifugaron vigorosamente durante 30 segundos. Tras enfriar durante 1 h sobre hielo, esta combinación se mezcló secuencialmente con 3 ml de una mezcla de cloroformo + metanol (2:1 v/v) y 1 ml de agua helada desionizada. La mezcla se centrifugó vigorosamente y se la dejó reposar durante toda una noche en una cámara frigorífica (18 h). La fase orgánica (inferior) y la fase acuosa (superior) de las mezclas se separaron por centrifugación (10 minutos a 4 °C; 1000 g). Se usaron una alícuota (2 ml) de la fase superior para la determinación de CDP-colina (ver abajo) y unas alícuotas de 0,1-0,4 ml de la fase inferior se secaron al vacío para el análisis de los fosfolípidos. Los residuos de las alícuotas de 0,1 ml de la fase inferior se sometieron a análisis para determinar el contenido total de fosfolípidos midiendo el fósforo. Los residuos de las alícuotas de 0,4 ml de la fase inferior se reconstituyeron en 40 ml de metanol y se sometieron a cromatografía de capa delgada usando placas de sílice G (Adsorbosil Plus-1®, Alltech), y un sistema que consistía en cloroformo/etanol/trietilamina/agua (30:34:30:8) como la fase móvil. Se usaron los estándares de los fosfolípidos para identificar las bandas correspondientes bajo luz UV después de que las placas se rociaron con difenil-hexatrieno al 0,1 % en éter de petróleo. Las bandas para las

clases de fosfolípidos individuales (PC, PE, SM, PS y PI) se rasparon para separarlas de las placas y se extrajeron en 1 ml de metanol; se secaron al vacío y se sometieron a ensayo para determinar el contenido de fósforo. El fósforo total se determinó por comparación con las curvas estándar, usando una tanda de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con cada ensayo. A cada muestra se le añadieron 0,5 ml de  $\text{HClO}_4$  al 4,5 %/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 27 % y los tubos se calentaron a 180 °C durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 5 ml del reactivo de color (una dilución de 10:1 de unas soluciones que contenían 2,5 mg/ml de molibdato de amonio, 8,2 mg/ml de acetato de sodio y 100 mg/ml de ácido ascórbico respectivamente), y los tubos se incubaron durante 2 horas, a 37 °C. La absorbancia se midió por espectrofotometría a 820 nm. La masa de fosfolípidos se determinó multiplicando el contenido de fósforo por 25.

#### Análisis estadístico

10 Los datos se analizaron por ANOVA unilateral (análisis de varianza) y luego por la prueba de Student.

#### Resultados

15 Para evaluar el efecto de los ácidos grasos omega-3 en la síntesis de los fosfolípidos, las células PC-12 se incubaron con colina marcada con  $^{14}\text{C}$ , después de una preincubación de 18 horas con o sin DHA. Después se midió la incorporación del marcaje en los fosfolípidos. Se usaron ácido oleico y ácido palmítico, que no son ácidos grasos omega-3, como controles negativos. La síntesis de fosfatidilcolina (PC) aumentó significativamente por la preincubación con DHA, pero no con el ácido oleico o con el ácido palmítico, tal como se evidencia por la mayor incorporación de marcaje en PC (figura 1). De este modo, el tratamiento con ácidos grasos omega-3 aumenta la síntesis celular de los fosfolípidos.

#### Ejemplo 2

20 Los ácidos grasos omega-3 aumentan la síntesis de un número de fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis

25 Para caracterizar aún más la estimulación de síntesis de los fosfolípidos por los ácidos grasos omega-3, las células PC-12 se trataron previamente con diferentes dosis de DHA y se expusieron a colina marcada, tal como se describe en el ejemplo 1 y luego se midió la incorporación de la etiqueta  $^{14}\text{C}$  en los fosfolípidos. El tratamiento previo con DHA aumentó la síntesis de los fosfolípidos (figura 2). El aumento de la síntesis dependió de la dosis. Así, los ácidos grasos omega-3 estimulan la síntesis de los fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis.

#### Ejemplo comparativo 3

El tratamiento de las células SHSY-5Y con ácidos grasos omega-6 aumenta la síntesis de los fosfolípidos

#### Materiales y métodos experimentales

##### Cultivo celular

30 Las células SHSY-5Y se cultivaron hasta casi la confluencia en DMEM + FBS al 10 % en placas de 35 mm. Las células se incubaron durante 18 h en DMEM sin suero + FBS al 1 % que contenía 30  $\mu\text{M}$  de colina +/- 10  $\mu\text{M}$  de DHA, ácido araquidónico o ácido palmítico. Luego las células se marcaron, y los fosfolípidos marcados se cuantificaron como se describe en el ejemplo 1.

##### Preparación del complejo DHA-BSA

35 El DHA se disolvió en etanol a una concentración de 100 micromolares y se congeló en alícuotas de 10 microlitros a -80 °C. Para cada experimento, se diluyó una alícuota en etanol a 10 micromolares; el volumen con el que se obtenía la solución final deseada en el medio de incubación se mezcló con un volumen igual de solución de BSA (1 gm/ml).

#### Resultados

40 El efecto de los ácidos grasos omega-6 en la síntesis de los fosfolípidos se examinó luego en las células SHSY-5Y, sobre una línea celular de neuroblastoma humano. En este caso, la síntesis de los fosfolípidos se optimizó por el ácido araquidónico, un ácido graso omega-6, pero no así por el DHA o el ácido palmítico (figura 3A).

#### Ejemplo comparativo 4

Los ácidos grasos omega-6 aumentan la síntesis de un número de fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis

45 El efecto del ácido araquidónico sobre la síntesis de los fosfolípidos en las células SHSY-5Y se caracterizó de un modo más detallado, tal como se describe para todos los ácidos grasos omega-3 y las células PC-12 en el ejemplo 2. El ácido araquidónico aumentó la síntesis de los fosfolípidos totales, de la PC y de la fosfatidiletanolamina en diversas posologías, de un modo dependiente de la dosis, tal como se observa por el DHA (figura 3B). De este modo, los ácidos grasos omega-6 estimulan la síntesis de una variedad de fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis.

50

## Ejemplo 5

La administración de PUFA aumenta los niveles de fosfolípidos en el cerebro, y la incorporación de uridina da como resultado un mayor aumento sinérgico

## Materiales y métodos experimentales

## 5 Dietas

La dieta de control estándar (tabla 4) consistía en una dieta para roedores con un contenido proteico del 16 % de Teklad Global (Harlan Teklad, Madison, WI), que contenía 0,1 % de cloruro de colina (CC), correspondiente a una dosis diaria de 50 mg/kg/día. Se proveyó el UMP como UMP al 0,5 % · 2Na<sup>+</sup> peso/peso y se añadió a la dieta de control, también preparada por Harlan Teklad, correspondiente a 240 mg/kg/día de UMP. El DHA se administró como 300 mg/kg/día en 200 microlitros (mL)/día de solución arábica al 5 %, en tanto que a los grupos que no recibían DHA se les administró el vehículo (goma arábica al 5 %) solo. El DHA era de Nu-Chek Prep (Elysian, MN) y el UMP, de Numico (Wagenigen, NL). Ninguno de los grupos presentó cambios significativos en el peso corporal durante el desarrollo del experimento.

Tabla 4. Dieta de control estándar.

Análisis aproximado (%)	
Proteína	16,7 %
Carbohidrato	60,9 %
Aceite, fibra, ceniza	13,7 %
Colina	0,1 %
Ácidos grasos (g/kg)	
Saturados	7,34
Insaturados	
C18:1n-9 ácido oleico	8,96
C18:2n-6 ácido linoleico	23,12
C18:3n-3 ácido linolénico	1,53

## 15

## Recolección de cerebros

Unos gerbilinos fueron anestesiados con ketamina y xilazina (80 y 10 mg/kg de peso corporal, i.p.) y sacrificados por inmersión de la cabeza en nitrógeno líquido durante 2 minutos, a lo cual siguió la decapitación. Los cerebros se extirparon inmediatamente y con rapidez (30 segundos), usando una gubia ósea, y se almacenaron a -80 °C.

## 20 Mediciones de los fosfolípidos en el cerebro

Los hemisferios de los cerebros congelados se pesaron y homogenizaron en 100 volúmenes de agua helada desionizada, usando un degradador tisular (Politron PT 10-35, Kinematica AG, Suiza); luego se analizaron tal como se describe en el ejemplo 1.

## Ensayos de ADN y proteínas

25 Se midió la proteína en la muestra con el homogenado de cerebro entero usando el reactivo de ácido bicinconínico (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EE. UU.). El ADN se calculó midiendo 460 nm de emisión de las muestras en un fluorímetro, en presencia de bisbenzimidazol, un pigmento fluorescente conocido como Hoechst H 33258 (American Hoechst Corporation), que tiene un máximo de excitación a 356 nm y un máximo de emisión de 458 cuando se une al ADN.

## 30 Resultados

Unos gerbilinos machos que pesaban 80-100 g se dividieron en 4 grupos de 8 gerbilinos y recibieron los suplementos que se describen en la tabla 1:

Tabla 1. Grupos de tratamiento.

Grupo	Suplemento	Cantidad/ método
1	Dieta de control + vehículo (goma arábica al 5 %)	
2	UMP de sodio + vehículo (goma arábica al 5 %)	Na-UMP 0,5 % de comida.
3	DHA	300 mg/kg diarios, por sonda
4	DHA + UMP de sodio	Como se indica arriba

Después de 4 semanas, los animales se sacrificaron y se sometió a prueba un hemisferio del cerebro - menos el cerebelo y tronco cerebral - para determinar los fosfolípidos totales y el contenido de PC, fosfatidiletanolamina (PE) esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS). Los ácidos grasos omega-3 (DHA) aumentaron los niveles de fosfolípidos totales en valores significativamente superiores a los observados en el grupo de control (figura 4 y tablas 2 y 3). La combinación de DHA con UMP dio como resultado un mayor incremento (26 %) que fue sinérgico (o sea, mayor que la suma de los incrementos observados en los grupos con DHA (12 %) y UMP (5 %)). Se observaron resultados similares con cada uno de los fosfolípidos individuales (tablas 2 y 3). Se observó significancia estadística dependiendo de si los valores de los fosfolípidos se normalizaban a las cantidades de proteína (figura 4A y tabla 2) o al ADN (figura 4B y tabla 3).

Tabla 2. Efectos del tratamiento con DHA, UMP o de ambos tratamientos sobre los niveles de los fosfolípidos en el cerebro, normalizados a los niveles de proteínas. Los datos se presentan como la media +/- error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico utilizó ANOVA bilateral y la prueba de Tukey. “\*” indica  $P < 0,05$ ; “\*\*”  $-P < 0,01$ ; “\*\*\*”  $-P < 0,001$  con respecto al grupo de control.

Tratamiento/lípido	Total PL	PC	PE	SM	PS	PI
Control	351 ± 8	152 ± 6	64 ± 4	45 ± 2	33 ± 3	21 ± 2
UMP	367 ± 22	171 ± 8*	84 ± 8*	52 ± 5	35 ± 3	31 ± 2**
DHA	392 ± 20	185 ± 12*	78 ± 5*	56 ± 3*	39 ± 3	32 ± 2**
UMP + DHA	442 ± 24***	220 ± 12***	113 ± 6***	73 ± 4***	46 ± 6***	36 ± 6***

Tabla 3. Efectos del tratamiento con DHA, UMP o de ambos tratamientos sobre los niveles de los fosfolípidos en el cerebro, normalizados a los niveles de ADN. El análisis estadístico/la presentación de los datos son los mismos que en la tabla 2.

Tratamiento/lípido	Total PL	PC	PE	SM	PS	PI
Control	885 ± 45	332 ± 12	176 ± 13	112 ± 5	79 ± 8	54 ± 5
UMP	878 ± 18	368 ± 10*	195 ± 9	111 ± 4	86 ± 7	78 ± 6**
DHA	909 ± 77	366 ± 13*	196 ± 18	126 ± 8	98 ± 7	84 ± 13**
UMP + DHA	1058 ± 25***	462 ± 26***	261 ± 30***	169 ± 11 ***	110 ± 5***	85 ± 10***

Estos hallazgos confirman los resultados de los ejemplos anteriores, que demuestran que los dos, los ácidos grasos omega-3 y los ácidos omega-6 aumentan la síntesis de los fosfolípidos en el cerebro y los niveles de fosfolípidos en el cerebro, tanto los niveles totales como los de los fosfolípidos individuales. Estos hallazgos demuestran además que la combinación de PUFA con uridina da como resultado un mayor aumento sinérgico. Además, estos hallazgos muestran que la estimulación de síntesis de los fosfolípidos por los PUFA es un fenómeno general, no restringido a un fosfolípido particular o modelo experimental.

Los aumentos proporcionales en los 4 fosfolípidos estructurales que comprenden el grueso de las membranas celulares en el cerebro (los 4 fosfátidos: PC, PE, PS y esfingomielina) fueron aproximadamente iguales, donde los niveles de cada uno de estos cuatro compuestos se eleva en un 20 % aproximadamente. De este modo, las proporciones de los 4 fosfolípidos estructurales en las membranas se mantuvieron. En consecuencia, la masa de la membrana aumentó sin alterar la estructura y la función normales de la membrana. Estos hallazgos corroboran los

datos de los ejemplos anteriores, aportando más evidencias de que las composiciones de la presente invención mejoran y optimizan la función del cerebro.

#### Ejemplo 6

5 La administración de ácidos grasos omega-3 a los gerbilinos reduce los niveles de cdp-colina en el cerebro, al tiempo que aumenta los de los fosfolípidos en el cerebro

#### Materiales y métodos experimentales

##### Ensayo de CDP-colina

10 Unas alícuotas (2 ml) de la fase superior (acuosa) se secaron al vacío, se reconstituyeron y se inyectaron en una HPLC. Las muestras secas se reconstituyeron en 100-200 ml de agua y se analizaron por HPLC en una columna de intercambio de aniones (Alltech Hypersil APS-2, 5 mm, 250 X 4,6 mm). Se eluyó CDP-colina con un gradiente lineal de tampones A ( $H_3PO_4$ , 1,75 mM, pH 2,9) y B ( $NaH_2PO_2$ , 500 mM, pH 4,5) de 0 a 100 % de B durante un período de 30 minutos. Con este sistema, la CDP-colina se resolvió a partir de sustancias de coelución similar, tales como UMP en un sistema isocrático, por un lapso de 40 minutos. El tiempo de retención para CDP-colina fue de 9,5 minutos. La columna se lavó con tampón B al final de cada experimento y cada varios días para eliminar los nucleótidos retenidos. Los picos de nucleótidos individuales se detectaron por absorción UV a 280 nm y se identificaron por comparación con las posiciones de los estándares auténticos, así como también por la adición de estándares de nucleótidos con las muestras.

##### Resultados

20 Para determinar el efecto de la administración de PUFA en los niveles de CDP-colina, los niveles de CDP-colina en el cerebro se midieron en los animales del ejemplo anterior. La administración de DHA y/o UMP redujo los niveles de CDP-colina (figura 5A) y los niveles de CDP-etanolamina (figura 5B). El DHA redujo los niveles de CDP-colina en un 26 % (en comparación con los que recibieron solo la dieta de control y el vehículo de DHA) y en los gerbilinos tratados con UMP en un 21 % (en comparación con los que recibieron la dieta que contiene UMP y el vehículo de DHA) (ambos  $P < 0,05$ ). El ANOVA bilateral reveló un efecto significativo de DHA [ $F(1,28) = 31,7$ ;  $P < 0,001$ ].

25 En otro estudio, la adición de UMP a la dieta estándar sin tratamiento concurrente con DHA aumentó significativamente los niveles de PC, PE y PI en el cerebro, en un 13 %, 29 % y 48 %, respectivamente (tabla 5A). La administración de DHA sin UMP también incrementó significativamente los niveles de estos fosfátidos en el cerebro, en un 22 %, 20 % y 52 %, respectivamente), así como también, de esfingomielina (en un 24 %). El UMP + DHA aumentaron todos los fosfolípidos en más de la suma de los aumentos producidos por el UMP o el DHA solos.

30 Luego se examinó el curso temporal de estos aumentos. Después de 1 semana de tratamiento, el UMP no produjo efectos significativos, en tanto que la combinación de UMP + DHA causó aumentos pequeños pero significativos en la PC (21 %) y la PS (38 %) del cerebro. El tratamiento con UMP + DHA durante 3 semanas causó aumentos significativos (21-48 %) en los 5 fosfolípidos; el UMP solo produjo aumentos menores, pero significativos de todas maneras (tabla 5B).

35 Tabla 5. Efectos de UMP y/o PUFA sobre los niveles de fosfolípidos en el cerebro.

Tratamientos (grupos)	PL total (nmol/mg prot.)	PC (nmol/mg prot.)	PE (nmol/mg prot.)	SM (nmol/ mg prot.)	PS (nmol/ mg prot.)	PI (nmol/ mg prot.)
<b>A</b>						
Dieta de control + vehículo	351 ± 8	152 ± 6	64 ± 4	45 ± 2	33 ± 3	21 ± 2
Dieta de UMP + vehículo	367 ± 22	171 ± 8*	84 ± 8*	52 ± 5	35 ± 3	31 ± 2**
Dieta de control + DHA	392 ± 20	185 ± 12*	78 ± 5*	56 ± 3*	39 ± 3	32 ± 2**
Dieta de UMP + DHA	442 ± 24***	220 ± 12***	113 ± 6***	73 ± 4***	46 ± 6***	36 ± 6***
<b>B</b>						
Control + vehículo	403 ± 23	155 ± 8	69 ± 3	47 ± 3	34 ± 1	20 ± 2
Una semana						
UMP + vehículo	390 ± 21	154 ± 6	63 ± 4	49 ± 3	39 ± 1	20 ± 4

UMP + DHA	436 ± 15	188 ± 8*	79 ± 6	57 ± 6	47 ± 1**	23 ± 1
Tres semanas						
UMP + vehículo	479 ± 6**	199 ± 5**	87 ± 4*	70 ± 4*	42 ± 2*	25 ± 1
UMP + DHA	502 ± 12***	217 ± 5***	102 ± 4***	73 ± 5**	41 ± 1*	27 ± 1*

Así, en estas condiciones, el efecto de la administración de PUFA en los fosfolípidos del cerebro es atribuible a una mayor conversión de CDP-colina en PC y los fosfátidos relacionados.

#### Ejemplo 7

- 5 La administración de ácidos grasos omega-3 y/o uridina a los gerbilinos aumenta los niveles de proteínas sinápticas

#### Materiales y métodos experimentales

#### Ensayos de los niveles de proteínas sinápticas

10 Las proteínas sinápticas se sometieron a ensayo mediante Slot-Blot [análisis de transferencia en ranura] y Western Blot [análisis de transferencia Western]. Para el análisis Western Blot, las alícuotas de los homogenados de cerebro se mezclaron con tampón de carga 2X KFL y se hirvieron durante 5 minutos antes de la electroforesis con gel. Se cargaron cantidades iguales de proteína y se separaron usando SDS-PAGE (4-20 %; Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Luego las proteínas se transfirieron a las membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Los restantes sitios de unión se bloquearon con leche deshidratada descremada, del 4 % (Varnation, Glendale, CA, EE. UU.), durante 30 minutos, en solución salina con tampón Tris-Tween (TBST). Se preparó un tampón de carga 2X KFL combinando lo siguiente: 3,76 ml de TRIS1M, pH 6,8; 6 ml de dodecilsulfato de sodio al 20 %; 6 ml de glicerol; 1,5 ml de mercaptoetanol; 2 ml de 1 % azul de bromfenol; y 10,74 ml de agua.

15 Para el ensayo *slot blotting* [transferencia en ranura], dos grupos de alícuotas (18-21 µl; que contenían 20 µg de proteína) de los homogenados del cerebro en agua desionizada se transfirieron directamente sobre unas membranas de fluoruro de polivinilideno (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) por filtración al vacío, usando un aparato de microfiltración para slot-blot [Minifold® II Slot Blot System (SCR 072/0); Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH, EE. UU.]. Los restantes sitios de unión se bloquearon con 4 leche deshidratada descremada, del 4 % (Varnation, Glendale, CA, EE. UU.) durante 30 minutos en TBST. Las membranas (de las transferencias en ranura y transferencias Western) se enjuagaron luego 5 veces en tampón TBST y se sumergieron en una solución de TBST que contenía el anticuerpo de interés (anti-NF-70 de ratón, anti-NF-M de conejo, antiPSD-95 de ratón y anti-sinapsina-1 de ratón). Después de toda una noche incubación y cinco enjuagues en tampón TBST, las transferencias se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa apropiado. Las transferencias luego se enjuagaron en tampón TBST cinco veces, y se detectaron los complejos de proteína-anticuerpo y se visualizaron usando el sistema ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y una película Kodak X-AR. Las películas se digitalizaron usando un escáner Supervista S-12 con un adaptador para transparencias (UMAX Technologies, Freemont, CA, EE. UU.). Las bandas inmunorreactivas se compararon por densitometría, usando el programa NIH Image de dominio público. Las áreas bajo la curva de absorbancia se normalizaron como porcentajes de las generadas en los grupos de control en la misma transferencia. Los niveles de proteínas se expresaron como un porcentaje en ellos en los animales de control.

#### Resultados

20 Los niveles cerebrales de 4 las proteínas sinápticas se midieron en animales (n = 8) que recibieron tanto UMP como DHA en las cantidades descritas en el ejemplo 5. Después de 3 o 4 semanas de tratamiento, las proteínas neurofibrilares de las neuritas NF-70 y NF-M se elevaron en un 43 % (P<0,01) o en un 102 % (P<0,001), y en un 19 % (P<0,05) o 48 % (P<0,01), respectivamente (figura 6). Los niveles de la proteína de densidad postsináptica PSD-95 y la proteína vesicular Sinapsina-1 se elevaron en un 38 % y en un 41 % después de 3 semanas (ambos P<0,001) y en 35 % (P<0,01) o 25 % (P<0,05) después de 1 semana (figura 7).

Estos hallazgos aportan más evidencias de que la administración de PUFA y uridina aumenta la cantidad de membranas sinápticas. Estos aumentos fueron similares a los observados en los niveles de fosfolípidos, lo que demuestra que los niveles de sinapsis aumentaron en el cerebro.

#### Ejemplo 8

- 45 El DHA, el EPA y la AA aumentan los niveles de fosfolípidos en el cerebro

#### Materiales y métodos experimentales

A unos gerbilinos adultos se les administró la dieta estándar de control (tabla 4) con o sin UMP al 0,5 % y/o 300

mg/kg/día de DHA, EPA o AA. A los grupos que no recibieron DHA se les administró el vehículo (goma arábiga al 5 %) solo.

Resultados

- 5 A los gerbilinos se les administró UMP y/o PUFA durante 3 semanas y luego se los sacrificó, para medir los niveles de los diversos fosfolípido en el cerebro. Tal como se muestra en la tabla 6, el DHA, el EPA y la AA, todos ellos aumentaron los niveles de fosfolípidos.

Tabla 6. Niveles de fosfolípidos en el cerebro después de la administración de PUFA y/o uridina.

Tratamiento	PL totales	PC	PE	SM	PS	PI
Control + vehículo	333 ± 9	113 ± 6	63 ± 4	19 ± 1	25 ± 2	15 ± 1
UMP + vehículo	332 ± 5	131 ± 2	70 ± 1	22 ± 1	29 ± 1	16 ± 1
Control + DHA	344 ± 16	133 ± 6	77 ± 2	24 ± 2	34 ± 3	18 ± 2
Control + EPA	347 ± 19	125 ± 8	76 ± 4	26 ± 3	31 ± 1	22 ± 2
UMP + DHA	374 ± 17	147 ± 6	88 ± 3	28 ± 3	39 ± 2	22 ± 2
UMP + EPA	407 ± 22	148 ± 3	91 ± 4	30 ± 1	41 ± 2	26 ± 2
UMP + AA	389 ± 28	127 ± 8	88 ± 10	25 ± 2	31 ± 3	22 ± 2

Ejemplo 9

- 10 Los ácidos grasos omega-3 y la uridina aumentan los números de espinas dendríticas en el cerebro de gerbilinos y ratas, tanto adultos como en desarrollo

15 A unos gerbilinos adultos normales se les suministró una dieta de control o una dieta suplementada con UMP (240 mg uridina/kg) y DHA (300 mg/kg, por sonda) a diario, durante un lapso de hasta 2 semanas. Los animales fueron decapitados, y los cortes del hipocampo fijados se tiñeron con el trazador de membrana carbanocianina Dil (C18)3 ("Dil," Molecular Probes, Eugene, OR) al final del tratamiento. Las imágenes de las neuronas del hipocampo se obtuvieron por microscopía de dos fotones. En los animales que recibieron DHA + UMP, la densidad de espinas dendríticas (número de espinas por unidad de longitud de dendrita) aumentó significativamente en las neuronas piramidales del hipocampo CA1 (aumento del 27 %, p = 0,001 frente al grupo de control; (figura 8).

20 En otro estudio, a unas ratas preñadas se les permitió comer a voluntad, durante 10 días antes del parto y 20 días mientras amamantaban, ya sea una dieta de control que contenía colina, o esta dieta suplementada con uridina como UMP; la mitad de cada grupo también recibió DHA o su diluyente en forma diaria, por sonda. Luego las crías se sacrificaron, y los cortes de los cerebros se examinaron para determinar los números de espinas dendríticas del hipocampo. El UMP solo y el DHA solo, cada uno de ellos aumentaron los niveles de números de espinas dendríticas, en tanto que la combinación dio como resultado aumentos mayores todavía (tabla 7).

- 25 Tabla 7. Aumentos en los números de espinas dendríticas en animales en desarrollo, en respuesta a la administración de UMP y DHA.

Tratamiento	Número de espinas	Aumento respecto del control (%)
Control	53	-
UMP	68	28 %
DHA	70	32 %
UMP + DHA	75	42 %

Ejemplo 10

El DHA y el UMP mejoran el aprendizaje

- 30 Materiales y métodos experimentales

5 Se ofreció comida y agua a voluntad hasta el día de la prueba experimental, momento en el cual a los gerbilinos primero se los dejó en ayunas durante 17, en el transcurso de toda una noche y luego se les dio de comer desde las 11 de la mañana hasta las 6 de la tarde. Los gerbilinos comieron la dieta suplementada con UMP y/o 300 mg/kg de DHA desde los 3 meses de edad (n = 8 por grupo), 4 semanas antes del entrenamiento conductual, hasta el final del período de entrenamiento. La manipulación de los animales al principio fue a diario, durante 4 días, para acostumbrarlos al contacto rutinario. Se los familiarizó con el laberinto durante otros 4 días, para lo que se les distribuían pelets de alimento en los caminos del laberinto y se les permitían 3 minutos para la exploración. Los gerbilinos hicieron 1 prueba/día, y todas las superficies se desinfectaron con etanol al 10 % entre un ensayo y otro. El entrenamiento consistía en colocarles un pelet de alimento en el extremo distal de los 2 mismos caminos para todos los ensayos. El gerbilino se colocaba en el centro del laberinto y se le daban 2 minutos para que encontrara los pelets de comida. El gerbilino cometía un error de memoria de trabajo si volvía a entrar a un camino que contenía un pelet de alimento y que ya había visitado previamente durante el ensayo. El gerbilino cometía un error de memoria de referencia si entraba a un camino que nunca había tenido comida en los ensayos anteriores. Se registró el porcentaje de pelets de comida encontrados.

15 **Resultados**

Para determinar el efecto de la uridina y/o DHA sobre el aprendizaje, a los animales se les administraron dietas que contenían uridina y/o DHA y luego se los sometió a una prueba de la memoria. El DHA y el UMP mejoraron el porcentaje de animales que pudieron completar la tarea (figura 9).

Ejemplo 11

20 Los ácidos grasos omega-3 aumentan la síntesis de los fosfolípidos en las neuronas en un cultivo a corto plazo

Materiales y métodos experimentales

25 Unas células de hipocampo de rata fueron cultivadas durante 3 semanas en medio Neurobasal plus B27, hasta que alcanzaron la maduración completa. El día del experimento, las células se incubaron con DMEM + colina, con o sin más adición de DHA. Se añadió colina <sup>14</sup>C, las células se incubaron durante otras 2 horas más y se extrajo PC marcada con <sup>14</sup>C recientemente formada y se midió tal como se describe en el ejemplo 1.

Resultados

30 Para determinar el efecto del DHA en los fosfolípidos en las neuronas en un cultivo a corto plazo, las neuronas se trataron previamente con DHA + colina. El DHA aumentó la síntesis de los fosfolípidos con respecto a las células a las que solo se les había administrado colina ("control") más del doble (figura 10; P = 0,04). Estos hallazgos confirman que el DHA aumenta los niveles de fosfolípidos en el cerebro y en las células neuronales.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende:
  - (1) ácido docosahexaenoico;
  - (2) uridina o un uridin-5'-monofosfato; y
  - 5 (3) colina o una sal de colina,para uso en el tratamiento de un sujeto humano con un trastorno seleccionado entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad Huntington y deterioro cognitivo leve (MCI).
2. Una composición para usar según la reivindicación 1, en la que la enfermedad de Alzheimer está en un estadio incipiente o leve.
- 10 3. Una composición para usar según la reivindicación 1, en la que la enfermedad de Alzheimer está en un estadio moderado o severo.
4. Una composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el sujeto es un adulto que está envejeciendo.
5. Una composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal de colina es cloruro de colina, bitartrato de colina, tartrato de colina o citrato de colina.
- 15 6. Una composición para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición comprende uridin-5'-monofosfato (UMP), una sal de colina y ácido docosahexaenoico.
7. Una composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el ácido docosahexaenoico está presente en una cantidad que aumenta la síntesis de un fosfolípido en una célula cerebral de dicho sujeto.
- 20 8. Una composición para usar según la reivindicación 7, en la que el fosfolípido es una fosfatidilcolina, una fosfatidiletanolamina, un fosfatidilinositol, una fosfatidilserina o un esfingomielina.
9. Una composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la uridina o el uridin-5'-monofosfato se dosifica de modo tal de proveer un intervalo de 10 a 500 mg de uridina por día.
10. Una composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la colina o sal de colina se dosifica en un intervalo de 100 mg a 10 g de colina por día.
- 25 11. Una composición para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición se formula como una composición farmacéutica.
12. Una composición para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición se formula como un suplemento nutricional.
- 30 13. Una composición para usar según la reivindicación 1 a 10, en la que la composición está presente dentro de un producto alimenticio enriquecido, tales como una bebida.
14. Una composición que consiste en lo siguiente:
  - (1) ácido docosahexaenoico;
  - (2) uridina o un uridin-5'-monofosfato y
  - 35 (3) colina o una sal de colina, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 13, para usar como un medicamento.
15. Una composición según la reivindicación 14 para usar como un medicamento para un ser humano.

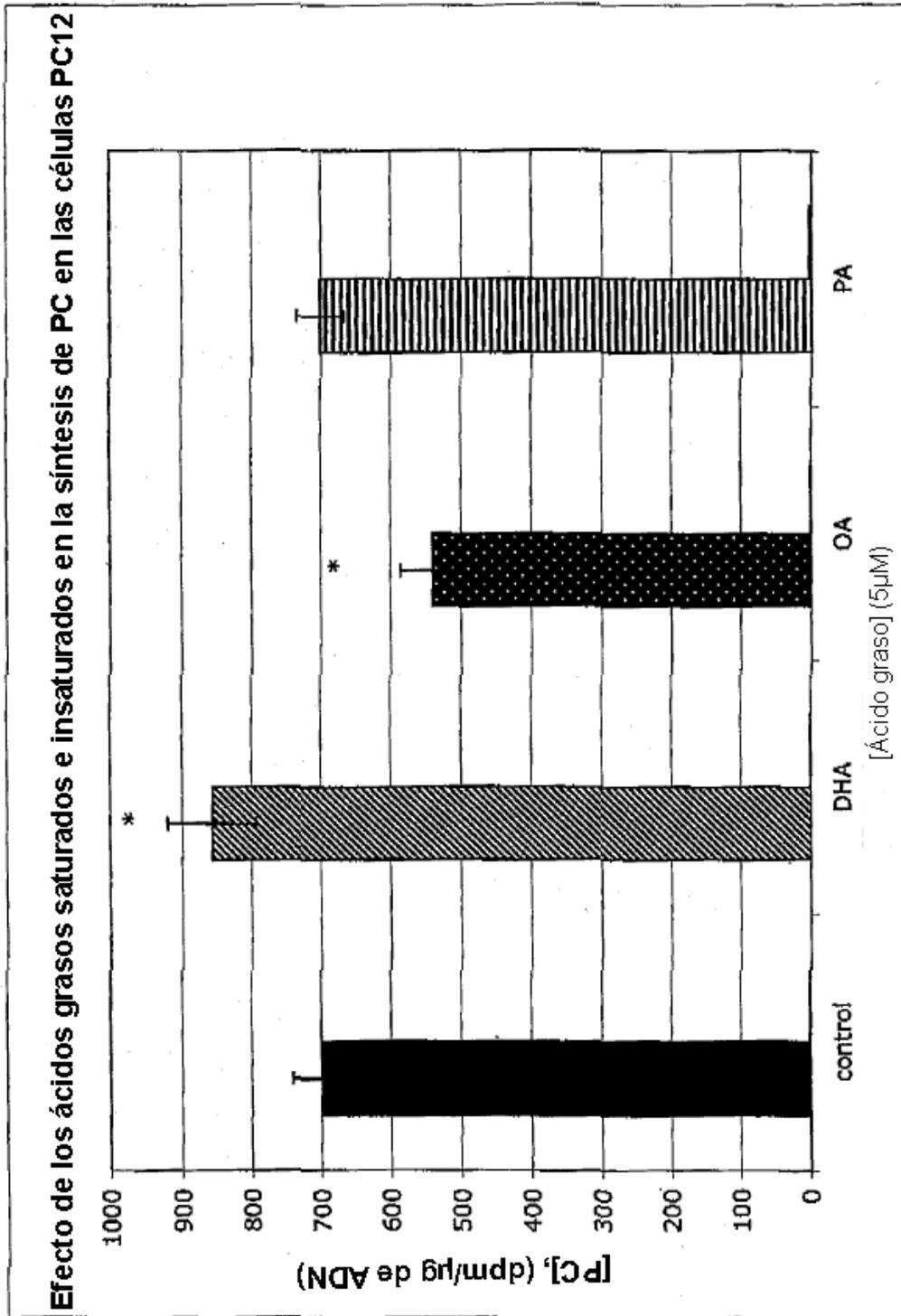


Figura 1

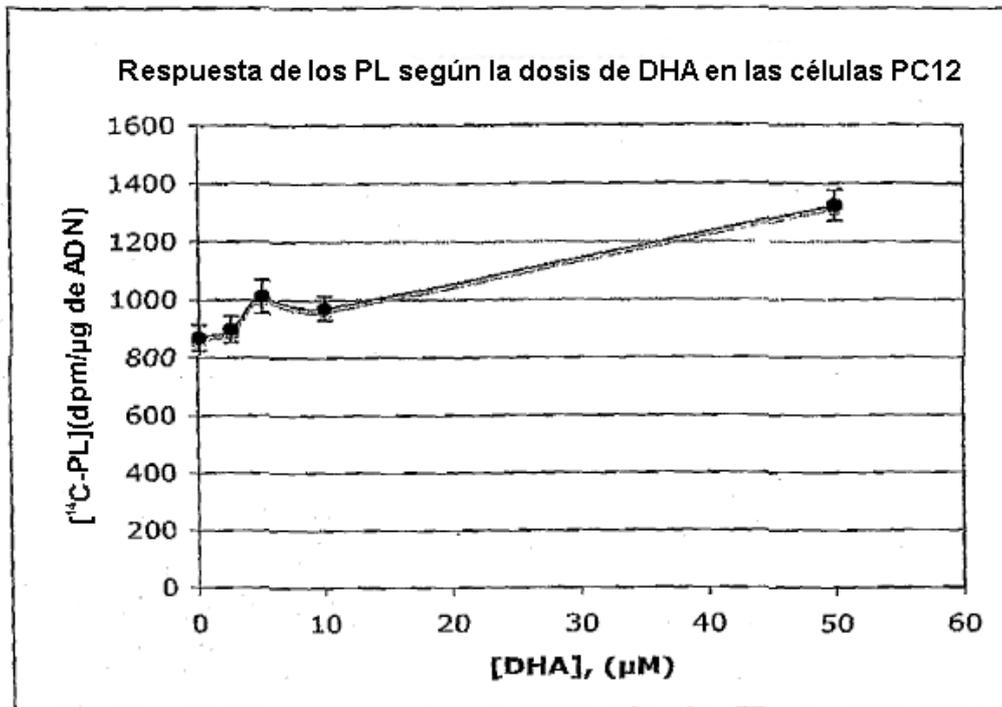


Figura 2

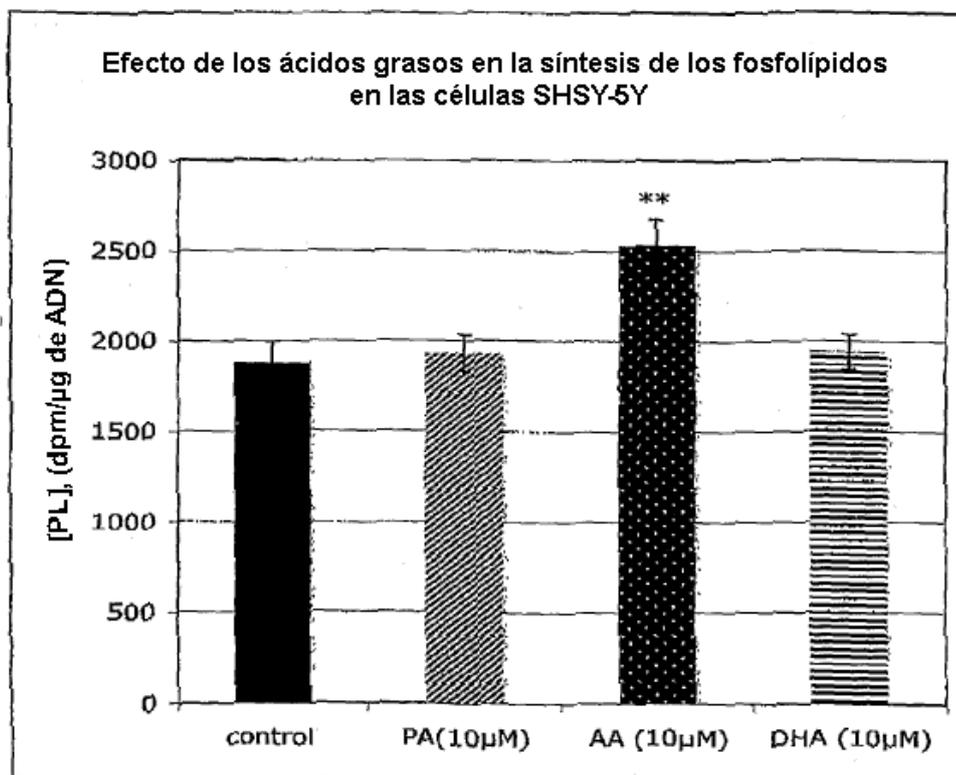


Figura 3a

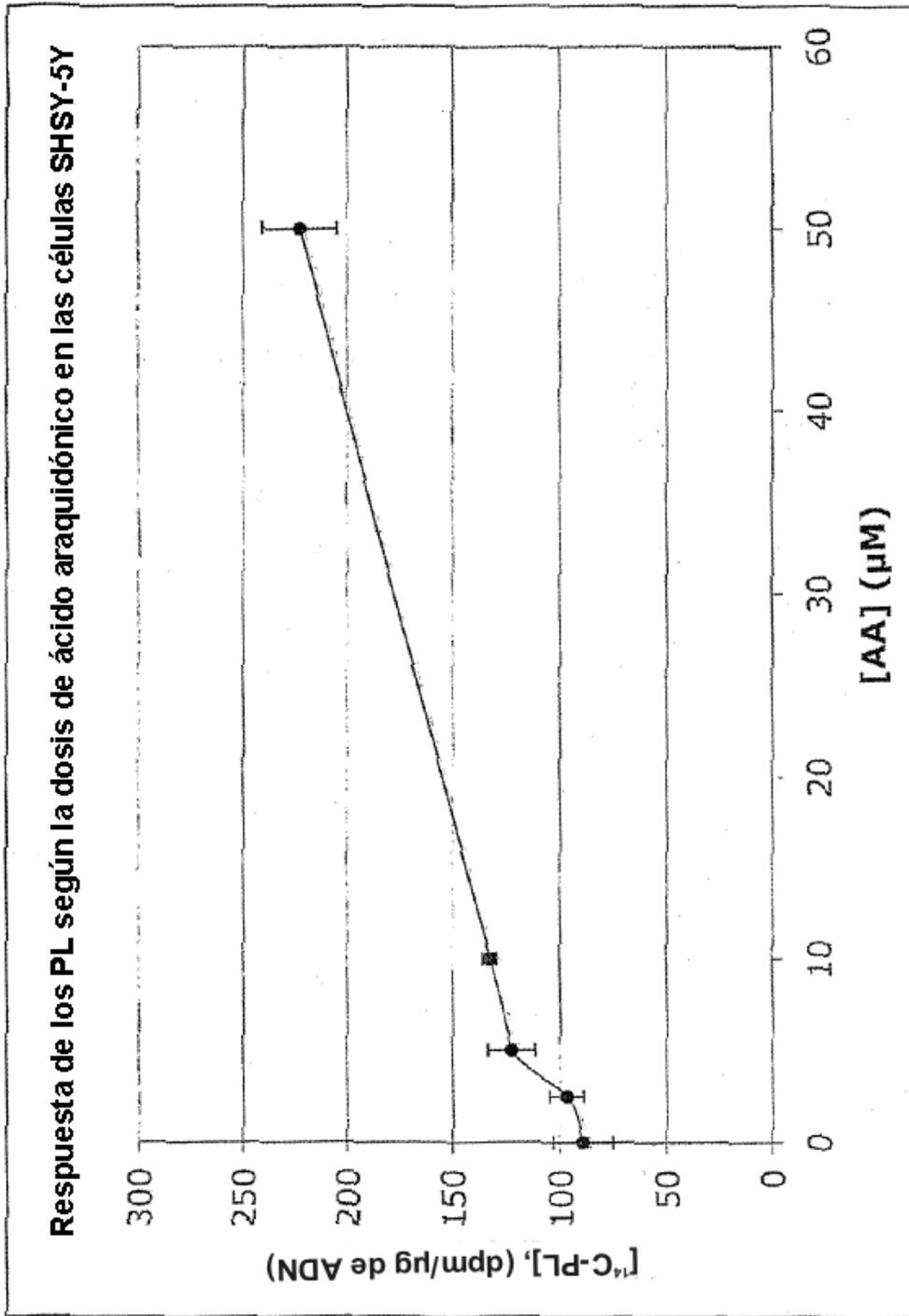
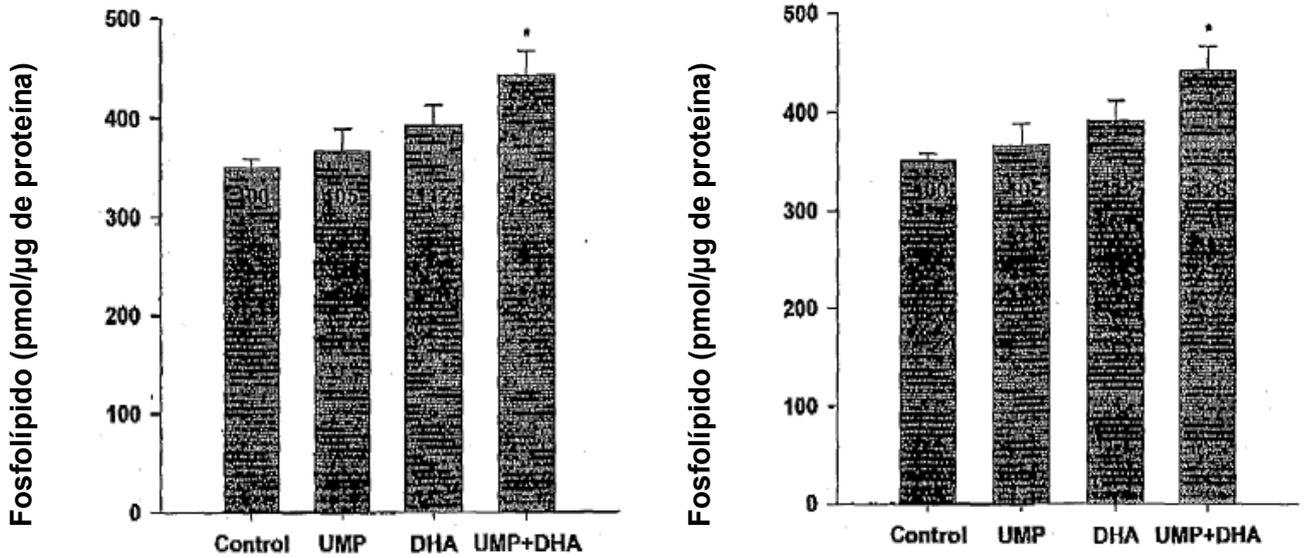
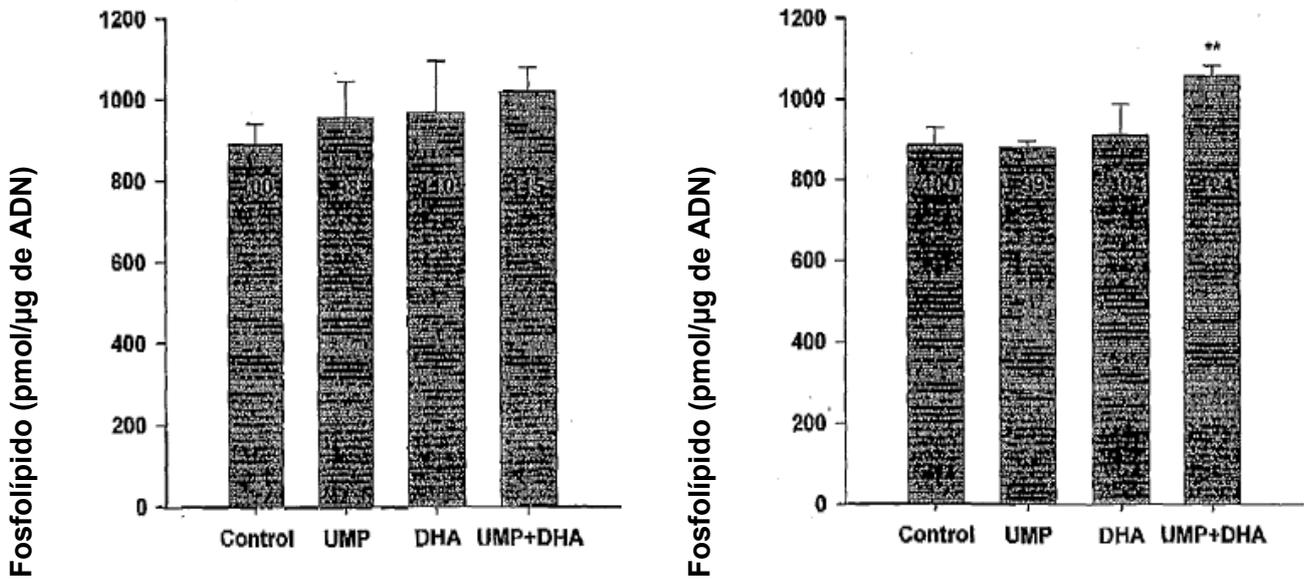


Figura 3B



\* Mayor ( $p < 0,05$ ) que el control (ANOVA unilateral [ $F(3,28) = 4,12$ ;  $p = 0,015$ ]). El ANOVA bilateral reveló un efecto significativo del DHA [ $F(1,28) = 8,78$ ;  $p = 0,006$ ]. Los valores absolutos en los grupos de control y en los grupos con UMP+DHA fueron  $351 \pm 8$  y  $442 \pm 24$  pmol/mg de proteína, respectivamente.



\*\* Mayor ( $p < 0,020$ ) que el control; el ANOVA unilateral indicó una diferencia significativa [ $F(3,28) = 3,215$ ;  $p = 0,038$ ] entre los grupos. Los valores absolutos en los gerbilinos con el control y con UMP+DHA fueron  $885 \pm 45$  y  $1094 \pm 33$  pmol/μg de ADN, respectivamente

Figura 4

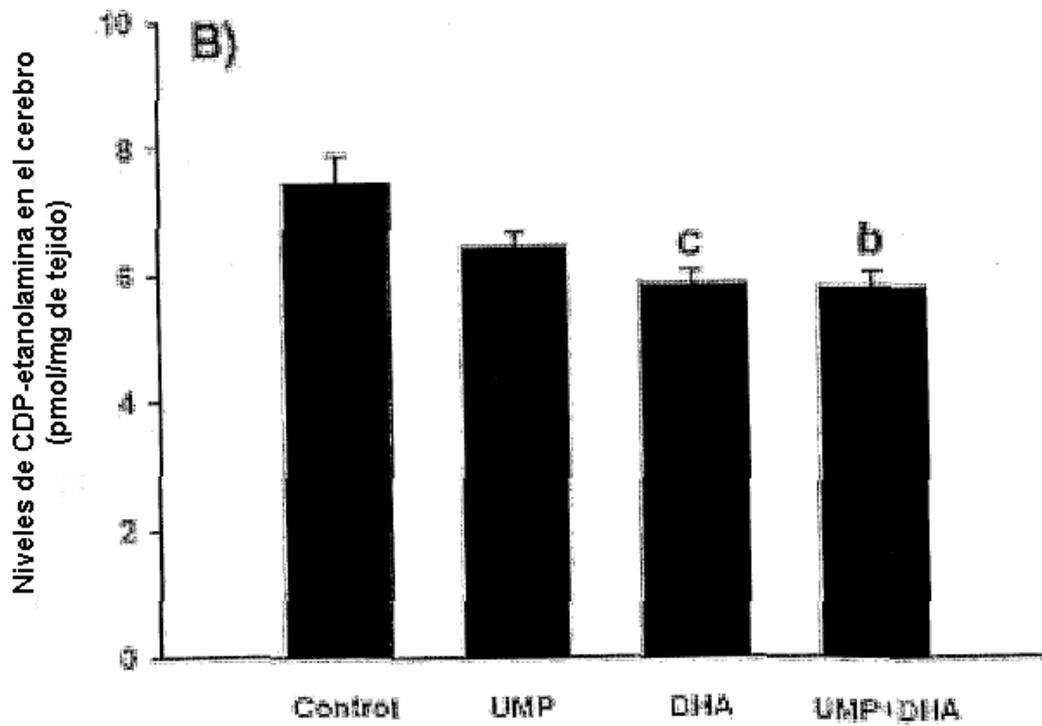
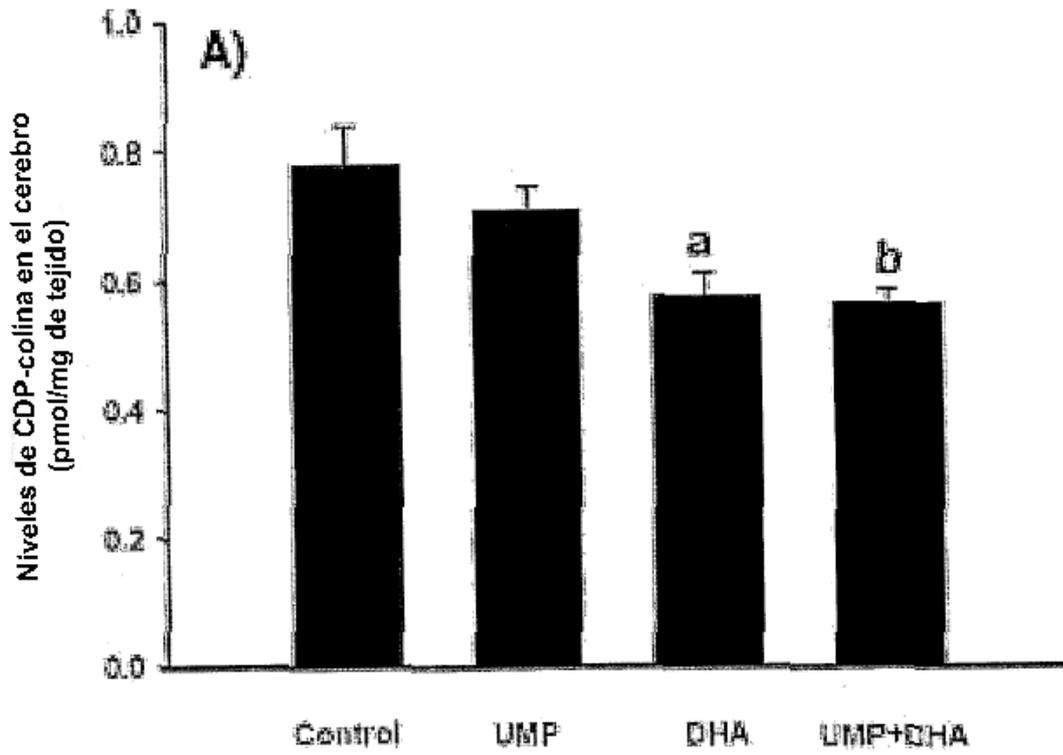
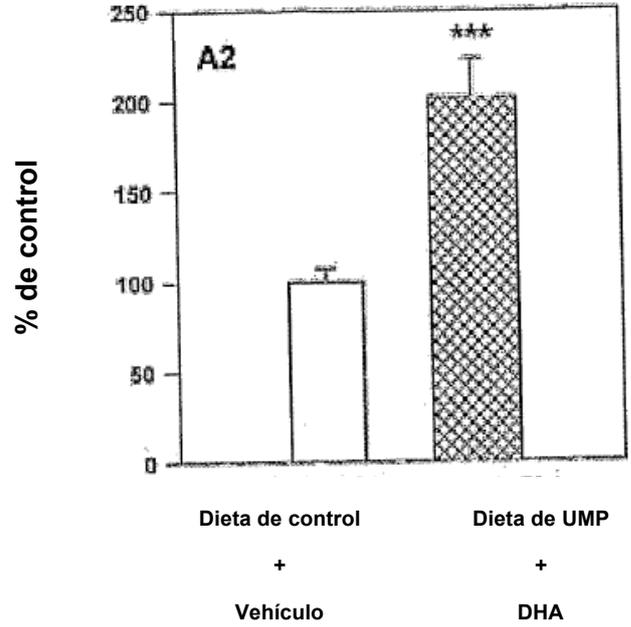
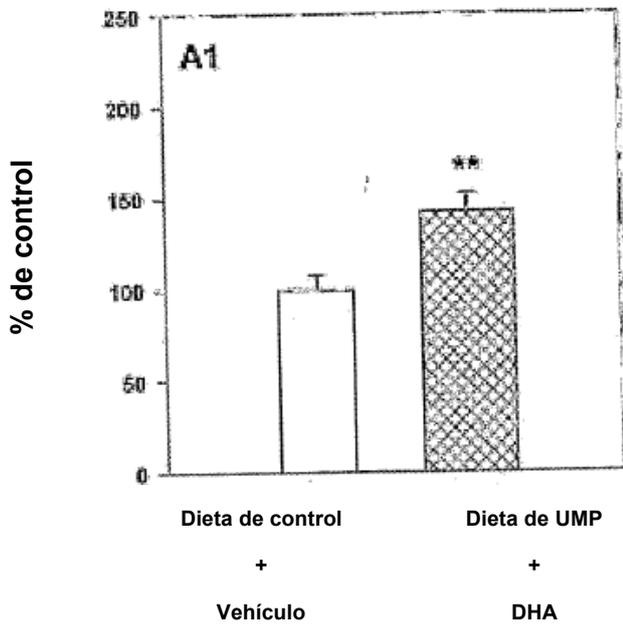


Figura 5

### A) NF-70

3 Semanas

4 Semanas



### B) NF-M

3 Semanas

4 Semanas

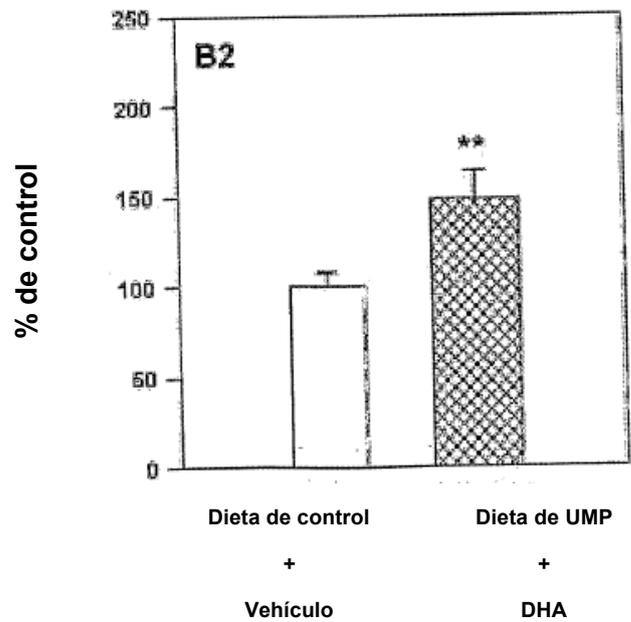
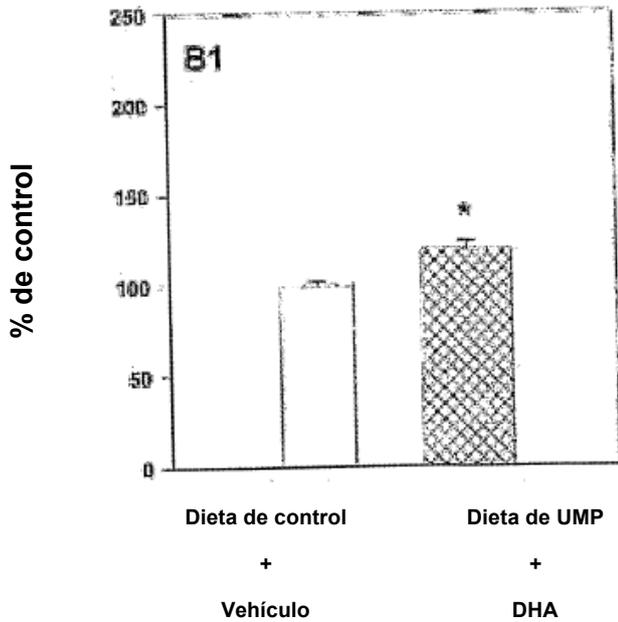
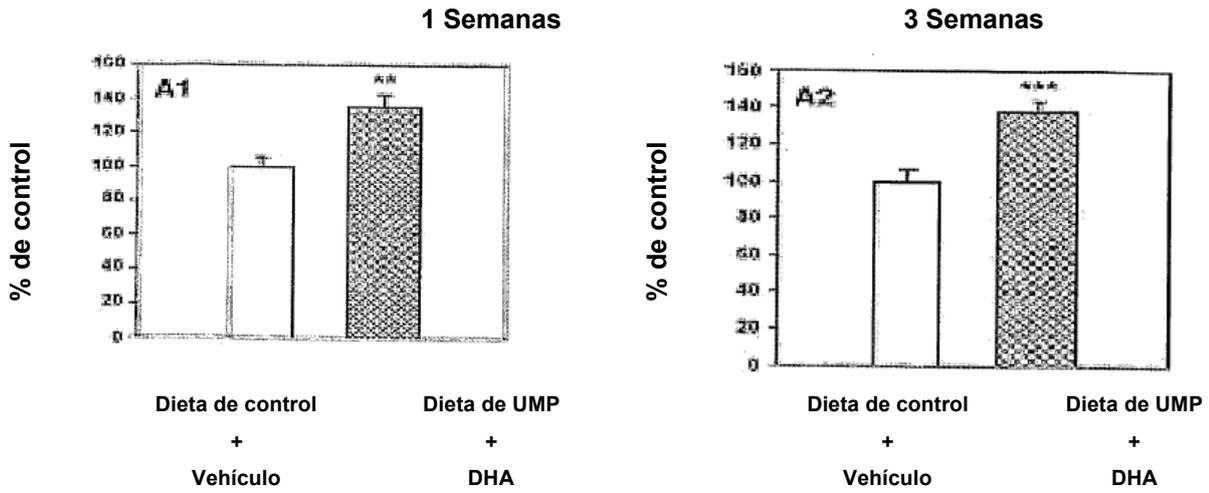
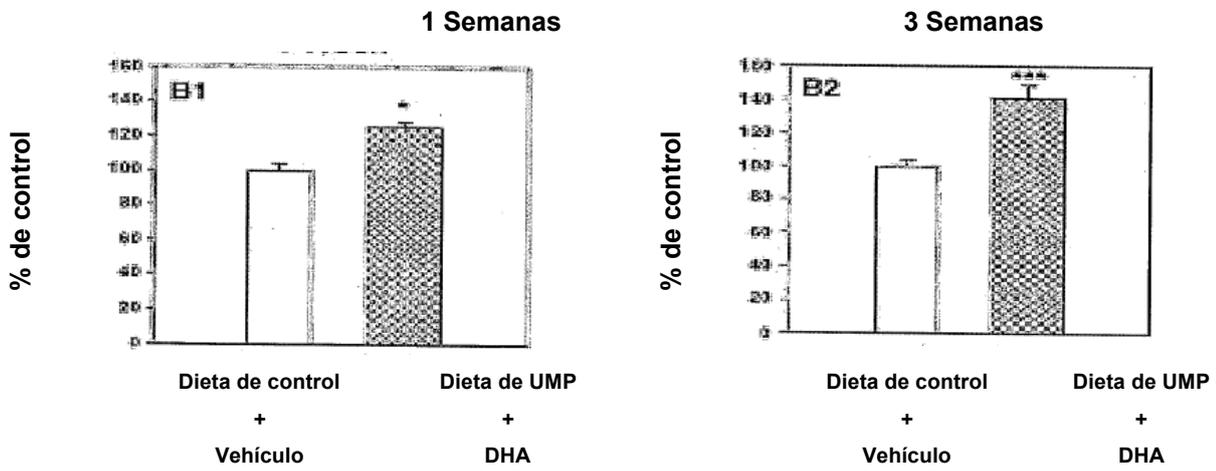


Figura 6

PSD-95



Sinapsina 1



$\beta$ -tubulina

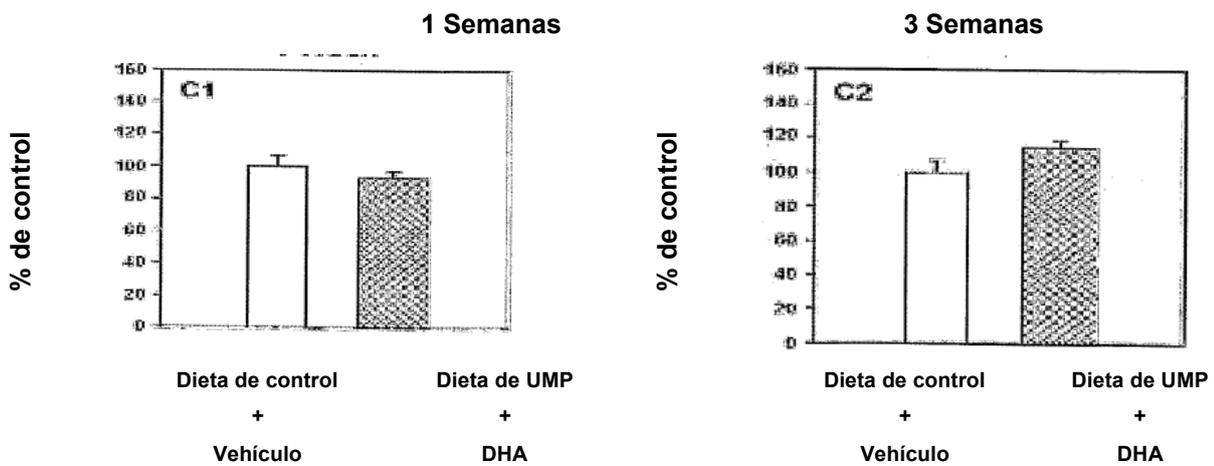


Figura 7

### Mayor densidad de espinas dendríticas en el hipocampo de los gerbilinos adultos



P = 0,001  
(n = 10 por grupo)

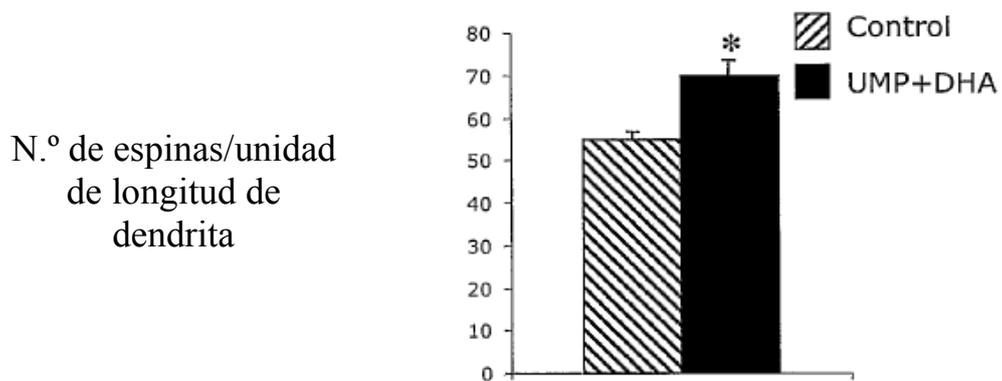


Figura 8

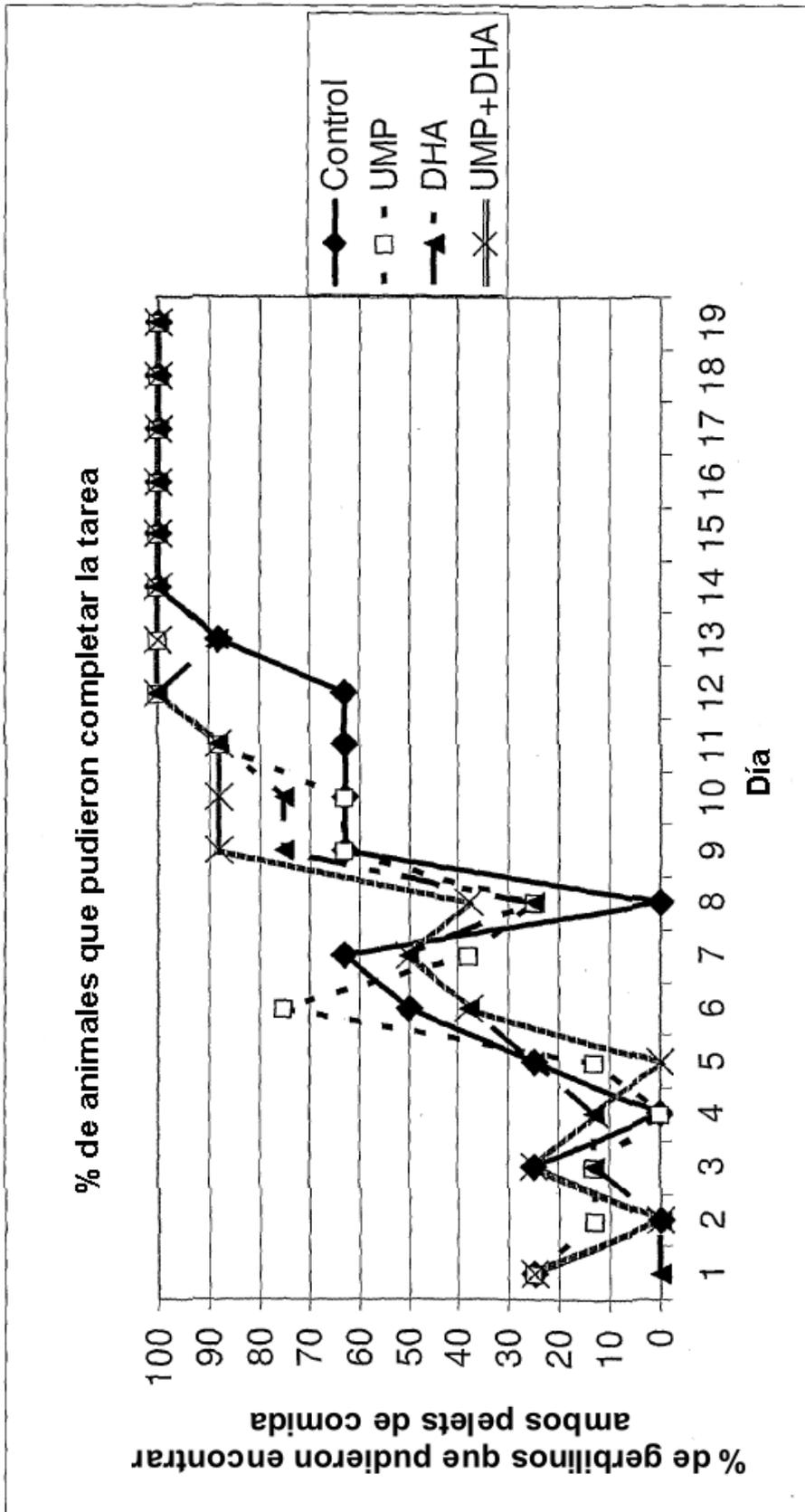


Figura 9

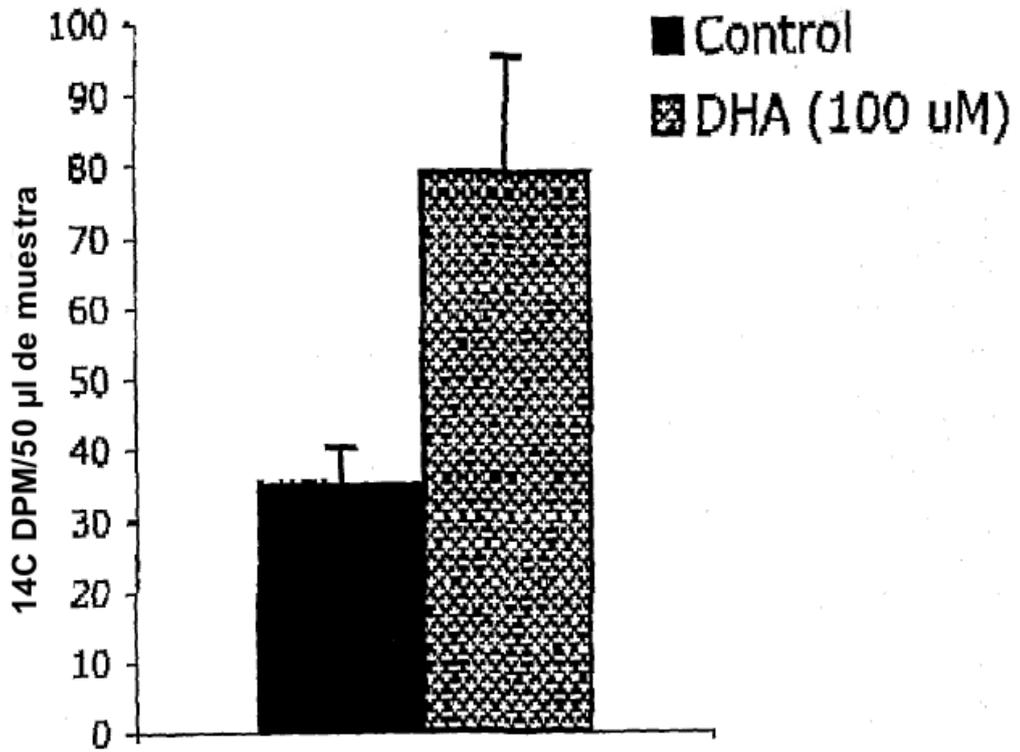


Figura 10