

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 493**

51 Int. Cl.:

A23K 20/174 (2006.01)

A23K 50/40 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

A23K 20/179 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2004 PCT/US2004/003220**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2004 WO04071211**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2004 E 04708561 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 1589827**

54 Título: **Métodos y composiciones que utilizan astaxantina**

30 Prioridad:

05.02.2003 US 445077 P

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**IAMS EUROPE B.V. (100.0%)
Vosmatenweg 4
7742 PB Coevorden, NL**

72 Inventor/es:

**CHEW, BOON, PENG;
HAYEK, MICHAEL, GRIFFIN y
PARK, JEAN, SOON**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 636 493 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

Métodos y composiciones que utilizan astaxantina

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a composiciones que son útiles para mejorar la respuesta inmune, o para aumentar la longevidad en un animal de compañía, en el que se utiliza astaxantina.

Antecedentes de la invención

10 En los últimos años, ha habido un creciente interés en los beneficios para la salud de los antioxidantes. Los antioxidantes contrarrestan el efecto de los radicales libres nocivos, o especies de oxígeno reactivas, que se producen como subproductos del metabolismo normal. Los nutrientes antioxidantes comprenden una variedad de compuestos que tienen una capacidad similar para neutralizar los radicales libres dañinos, e incluyen algunas vitaminas comúnmente conocidas, tales como la vitamina A, vitamina C y vitamina E.

15 Los carotenoides son un subconjunto de antioxidantes. Los carotenoides son pigmentos vegetales naturales que son absorbidos en diferentes grados por diferentes especies. Los carotenoides comunes incluyen, por ejemplo, betacaroteno, luteína, licopeno, astaxantina y cantaxantina. Algunos antioxidantes también han demostrado tener propiedades anti-oncogénicas en ciertas especies animales. Se ha descubierto que el betacaroteno inhibe la proliferación de células de neuroblastoma humano y se ha demostrado que la cantaxantina previene la carcinogénesis inducida por productos químicos en ratones.

20 Los efectos sobre el sistema inmune de algunas especies de animales también se han asociado con ciertos carotenoides. Por ejemplo, la cantaxantina aumenta la proliferación de linfocitos en ratas y mejora la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) por los macrófagos en hámsters. En un ensayo con células cultivadas, la astaxantina y el betacaroteno demostraron la capacidad de aumentar la respuesta *in vitro* de anticuerpos de los esplenocitos de ratón frente a antígenos dependientes de T (Jyonouchi *et al.*).

25 Aunque se sabe mucho sobre los carotenoides, es difícil extrapolar lo que se sabe sobre los efectos de un carotenoide en un animal para determinar los efectos que otro carotenoide puede tener en el mismo animal. También es difícil determinar cuál puede ser el efecto de un solo carotenoide en un animal basándose en hallazgos previos en un tipo diferente de animal. Se ha determinado que la absorción y el metabolismo de los carotenoides son específicos de una especie. El ganado y los caballos, por ejemplo, absorben beta-caroteno, mientras que las cabras y las ovejas no absorben carotenoides en absoluto. (Schweigert, F.J., 1998). Después de un estudio de 1931 se demostró que una gran proporción de los beta-carotenos proporcionados a los gatos no era absorbida, muchos creían que los gatos eran incapaces de utilizar el beta-caroteno hasta que, Chew *et al.* (2000) determinó que los gatos domésticos absorben fácilmente el beta-caroteno, y Schweigert *et al.* (2002) demostraron que esta absorción no se acompaña de la conversión de beta-caroteno en vitamina A, lo que indica que los efectos del beta-caroteno en los gatos no se deben a su función como precursor de la vitamina A.

35 Incluso dentro de un solo animal, los carotenoides pueden presentar patrones diferenciales de absorción. La luteína y la zeaxantina se encuentran concentradas en la retina humana, mientras que generalmente se cree que el betacaroteno está ausente del tejido de la retina debido a su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

40 En el campo de la nutrición animal complementaria, son deseables los componentes nutricionales que tienen un efecto positivo sobre la función inmune del animal. Identificar los componentes nutricionales que mejoran la función inmune en una especie en particular es un desafío. Lo que se necesita son las formulaciones nutricionales y los métodos de uso que proporcionan un beneficio a un animal de compañía mejorando la función inmune del animal.

El documento de EE.UU. 6.310.090 B1 se refiere a un proceso y producto para mejorar la respuesta inmune en animales de compañía usando una combinación de antioxidantes.

45 El documento WO 97/35491 se refiere a un agente para aumentar la producción de/en animales de cría y de producción.

Sumario de la invención

50 La presente invención se refiere a composiciones como se definen en las reivindicaciones adjuntas que son útiles para un animal de compañía, en el que las composiciones utilizan astaxantina. Las composiciones comprenden astaxantina, en donde la composición está adaptada para su uso por un animal de compañía. Se describen adicionalmente métodos seleccionados del grupo consistente en atenuar la inflamación, aumentar la inmunidad, aumentar la longevidad y combinaciones de los mismos, que comprende administrar a un animal de compañía una composición que comprende una cantidad eficaz de astaxantina. El animal de compañía es, en la realización preferida, un perro o gato doméstico.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 muestra las concentraciones plasmáticas de astaxantina en perros que recibieron dosis orales diarias de 0, 0,1, 0,5, 2,5, 10 ó 40 mg de astaxantina. Los valores son medias \pm SEM (n = 8).
- 5 La Fig. 2 muestra las concentraciones plasmáticas de astaxantina en gatos que recibieron una dosis oral de 0, 0,02, 0,08, 0,4, 2, 5 ó 10 mg de astaxantina. Los valores son medias \pm SEM (n = 8).
- La Fig. 3 muestra las concentraciones plasmáticas de astaxantina en perros que recibieron dosis orales diarias de 0, 0,02, 0,08, 0,4, 2, 5 ó 10 mg de astaxantina. Los valores son medias \pm SEM (n = 8).
- La Fig. 4 muestra concentraciones plasmáticas de astaxantina en perros alimentados con dietas que contienen 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina durante 16 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 10 La Fig. 5 ilustra la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (expresada como un porcentaje del espesor de la piel medido a 0 h) a una inyección intradérmica con una vacuna polivalente en perros alimentados con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina diariamente durante 12 (figura 5a) o 16 (Figura 5b) semanas. La induración de la piel se midió a 0, 24, 48 y 72 h después de la inyección. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- La Fig. 6 ilustra porcentajes de linfocitos CD21 + B en perros alimentados con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina diariamente durante 16 semanas, calculado expresando el número de células que se tiñeron positivas para el marcador de superficie celular como porcentaje del número total de linfocitos. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 15 La Fig. 7 muestra las concentraciones de IgM (7a) e IgG (7b) en plasma en perros alimentados con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina diariamente durante 16 semanas. Todos los perros fueron vacunados con una vacuna policlonal en las semanas 13 y 15. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 20 La Fig. 8 muestra la actividad citotóxica de células asesinas naturales, expresada como porcentaje de muerte, en perros alimentados con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina diariamente durante 16 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- La Fig. 9 ilustra concentraciones de proteínas C reactivas en plasma, expresadas en nanogramos por mililitro de plasma, en perros alimentados con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina diariamente durante 16 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 25 La Fig. 10 representa las concentraciones de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en plasma (8-OHdG) en perros alimentados con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina diariamente durante 16 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 30 La Fig. 11 muestra concentraciones plasmáticas de astaxantina en gatos alimentados con dietas que contienen 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina durante 12 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- La Fig. 12 ilustra los niveles de respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (expresada como un porcentaje del grosor de la piel medido a 0 h) a una inyección intradérmica con una vacuna polivalente en gatos alimentados con astaxantina diariamente durante 12 semanas por 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina. La induración de la piel se midió a 0, 24, 48 y 72 h después de la inyección. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 35 La Fig. 13 ilustra la incorporación de [³H]-timidina por la proliferación de PBMC inducida por con A- (2,5 μ g/mL), PHA- (1,25 μ g/mL) o PWM- (2,5 μ g/mL) en gatos alimentados con 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina diariamente durante 12 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- La Fig. 14 ilustra porcentajes de células T CD5 + totales (Figura 14a), células CD4 + Th (Figura 14b) y CD21 + B (Fig. 14c) (calculado expresando el número de células que se tiñeron positivas para el marcador de superficie celular como un porcentaje del número total de linfocitos) en gatos alimentados con 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina diariamente durante 12 semanas. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 40 La Fig. 15 muestra las concentraciones de IgG plasmática (Fig. 15a) e IgM (Fig. 15b) en gatos alimentados con astaxantina diariamente durante 12 semanas por 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina. Todos los gatos fueron vacunados con una vacuna policlonal en las semanas 9 y 10. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).
- 45 La Fig. 16 ilustra la actividad citotóxica de células asesinas naturales en gatos alimentados con astaxantina diariamente durante 12 semanas por 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina. Los valores son medias \pm SEM (n = 14).

Descripción detallada de la invención

- 50 Diversos documentos incluyendo, por ejemplo, publicaciones y patentes, se recitan a lo largo de esta descripción. La cita de cualquier documento dado no debe interpretarse como una admisión de que es la técnica anterior con respecto a la presente invención.

Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso a menos que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basándose en la composición total a menos que se indique lo contrario.

En la presente memoria se hace referencia a nombres comerciales de componentes que incluyen diversos ingredientes utilizados en la presente invención. Los inventores de la presente no pretenden estar limitados por materiales bajo un cierto nombre comercial. Materiales equivalentes (*p. ej.*, los obtenidos a partir de una fuente diferente bajo un nombre diferente o un número de referencia) a los referenciados por el nombre comercial pueden ser sustituidos y utilizados en las descripciones de la presente.

En la descripción de la invención se describen diversas realizaciones o características individuales. Como será evidente para el especialista ordinariamente experto, todas las combinaciones de tales realizaciones y características son posibles y pueden dar lugar a ejecuciones preferidas de la presente invención.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en cualquiera de las características o realizaciones descritas en la presente memoria.

Aunque se han ilustrado y descrito varias realizaciones y características individuales de la presente invención, se pueden hacer otros cambios y modificaciones diferentes sin apartarse del alcance de la invención. Como también será evidente, todas las combinaciones de las realizaciones y características enseñadas en la descripción anterior son posibles y pueden dar lugar a ejecuciones preferidas de la invención.

Composición de la presente invención

Las composiciones de la presente invención están adaptadas para su uso por un animal de compañía. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "animal de compañía" significa un animal doméstico que incluye preferiblemente (por ejemplo) perros, gatos, caballos, cerdos (por ejemplo, cerdos vietnamitas), conejos y similares. Los perros domésticos y los gatos son particularmente preferidos. A este respecto, tal como será bien comprendido por los expertos en la materia, el uso principal de las composiciones descritas en la presente memoria es para uso en animales de compañía y, por lo tanto, las composiciones se formulan como tales.

La astaxantina (3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona), un oxicarotenoide o alfa-hidroxi-cetocarotenoide, es un potente antioxidante (Martin *et al.*, 1999). Se utiliza comúnmente en la acuicultura y en la industria avícola como aditivo para piensos, principalmente debido a su pigmento rojo. Se ha observado que la actividad antioxidante de la astaxantina frente a ciertas especies de oxígeno reactivas es superior a la del beta-caroteno, la cantaxantina, la luteína, el alfa-tocoferol, la tunaxantina y la zeaxantina (Naguib, 2000; Miki, 1991). La trucha arco iris alimentada con levadura rica en astaxantina ha demostrado una mayor capacidad para reducir el estrés oxidativo inducido por el aceite oxidado (Nakano *et al.*, 1999) y niveles más bajos de actividad de peróxidos lipídicos y transaminasas en suero (Nakano *et al.*, 1995 y Nakano *et al.*, 1996). Ya sea directa o indirectamente relacionada con su actividad antioxidante, la astaxantina potenció tanto las respuestas inmunitarias humorales (Jyonouchi *et al.*, 1995) como la mediada por células (Chew *et al.*, 1999b), e inhibió el crecimiento de tumores mamarios (Chew *et al.*, 1999a) y de vejiga (Tanaka *et al.*, 1994) en roedores. También se ha demostrado que mejora la proliferación de esplenocitos inducida por mitógenos (Chew *et al.*, 1999) en ratones. En ratones infectados con *Helicobacter pylori* alimentados con extracto de algas rico en astaxantina, se redujo la carga bacteriana y la inflamación gástrica, aparentemente debido a un cambio en los linfocitos T de una respuesta Th1 dominada por IFN-gamma a una respuesta mixta de Th1/Th2 con IFN-gamma e IL -4 (Bennedson *et al.*, 1999).

Hasta ahora, sin embargo, no se ha sabido si los animales de compañía (*p. ej.*, perros y gatos) podrían absorber y utilizar astaxantina en cantidades farmacológicas efectivas, ni se han determinado los efectos de tal absorción en gatos o perros. En estudios realizados por los inventores, los perros domésticos y los gatos que son alimentados con astaxantina muestran una absorción significativa por la sangre y por todos los orgánulos subcelulares de leucocitos sanguíneos. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones útiles para administrar a un animal de compañía una composición que contiene astaxantina como ingrediente o aditivo alimentario en una cantidad suficiente para proporcionar, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 40 mg diarios de astaxantina. Dicha dieta proporciona suficiente astaxantina para ser absorbida por el animal y suministrada a la sangre, *p. ej.*, plasma, leucocitos sanguíneos, en el animal.

Los inventores han descubierto que tanto los perros domésticos como los gatos son capaces de absorber astaxantina en la dieta.

Además, los inventores han descubierto que la astaxantina circulante es significativamente absorbida por leucocitos sanguíneos y está asociada con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en tales animales. También han descubierto que la astaxantina también se distribuye en los diversos orgánulos subcelulares. Se cree que dicha absorción de astaxantina en los diversos orgánulos de leucocitos (1) protege a estas células del ataque de radicales libres de oxígeno y/o (2) regula directamente los eventos nucleares. Por lo tanto, la alimentación de animales de compañía, tales como perros y gatos, con una composición que contiene cantidades efectivas de astaxantina proporciona astaxantina en sitios celulares importantes en los tejidos corporales del animal lo que da como resultado una regulación positiva de la función inmune y una mejor salud en estos animales.

La astaxantina puede proporcionarse como astaxantina libre o como diéster de astaxantina. La astaxantina producida naturalmente se puede obtener de hongos, crustáceos y algas, por ejemplo, *Haematococcus* Sp. (p. ej., como se describe en la Patente de EE.UU. No. 5.744.502). La astaxantina también se produce por la levadura, natural y genéticamente modificada, *Pfaffia*, y está comercialmente disponible en Archer Daniels Midland Co.; Aquasearch Inc.; AstaCarotene AB; Cyanotech Corporation and Micro Gaia, Inc. La astaxantina producida sintéticamente también está disponible comercialmente en Hoffman-LaRoche, Ltd. La forma de astaxantina administrada puede elegirse para proporcionar un producto más biodisponible, por ejemplo, la administración como un microesfera, oleorresina, o similares.

Las composiciones usadas en la presente invención son, en una realización preferida, composiciones alimenticias para animales de compañía. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "composición de alimento para mascotas" significa una composición que está destinada a ser ingerida por un animal de compañía. Éstas incluirán ventajosamente alimentos destinados a satisfacer las necesidades dietéticas necesarias, así como golosinas (p. ej., galletas para perros) u otros complementos alimenticios. Opcionalmente, la composición de la presente invención puede ser una composición alimenticia para animales de compañía tal como una composición seca (por ejemplo, pienso), composición semi-húmeda, composición húmeda o cualquier mezcla de los mismos. Alternativamente o adicionalmente, la composición es un suplemento, tal como una salsa, agua potable, yogurt, polvo, suspensión, chicle, pienso (p. ej., galletas) o cualquier otra forma de administración. Como ejemplo, la astaxantina puede mezclarse con los otros componentes de la composición para proporcionar las cantidades beneficiosas necesarias, o puede añadirse a la composición antes de ofrecerla al animal, por ejemplo, utilizando un polvo espolvoreado.

Como ejemplo, en una realización la composición está nutricionalmente equilibrada. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "nutricionalmente equilibrado", con referencia a la composición para el animal de compañía, significa que la composición tiene conocido nutrientes requeridos para mantener la vida en cantidades y proporciones adecuadas basadas en recomendaciones de las autoridades reconocidas en el campo de la nutrición animal complementaria. Las composiciones nutricionalmente equilibradas son ampliamente conocidas y ampliamente utilizadas en la técnica.

Las composiciones utilizadas en este documento pueden comprender opcionalmente uno o más componentes adicionales. Otros componentes son beneficiosos para la inclusión en las composiciones usadas en la presente memoria, pero son opcionales para los propósitos de la invención. En una realización, las composiciones alimenticias pueden comprender, sobre una base de materia seca, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% de proteína cruda, alternativamente de aproximadamente 20% a aproximadamente 40% de proteína cruda, en peso de la composición alimenticia, o alternativamente de aproximadamente 20% a aproximadamente 35% de proteína cruda. El material de proteína cruda puede comprender proteínas vegetales tales como soja, semilla de algodón y cacahuete, o proteínas animales tales como caseína, albúmina y proteína de carne. Ejemplos no limitativos de proteínas de carne útiles en la presente invención incluyen una fuente de proteína seleccionada del grupo que consiste en carne de res, cerdo, cordero, aves de corral, pescado, vegetales y mezclas de los mismos.

Las composiciones pueden comprender, sobre una base de materia seca, de aproximadamente 5% a aproximadamente 40% de grasa, alternativamente de aproximadamente 10% a aproximadamente 35% de grasa, en peso de la composición alimenticia.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender además una fuente de hidratos de carbono. Granos o cereales tales como arroz, maíz, milo, sorgo, cebada, trigo y similares son fuentes ilustrativas.

Las composiciones también pueden contener otros materiales tales como suero seco y otros productos lácteos por productos.

Las composiciones también pueden comprender al menos una fuente de fibra para mejorar la salud gastrointestinal. Dichas fuentes de fibra pueden comprender, por ejemplo, al menos una fibra moderadamente fermentable. La fibra moderadamente fermentable se ha descrito previamente que proporciona un beneficio al sistema inmune del animal de compañía. La fibra moderadamente fermentable u otras composiciones conocidas por los expertos en la técnica que proporcionan una composición prebiótica que aumenta el crecimiento de microorganismos probióticos dentro del intestino también se pueden incorporar en la composición para ayudar en la mejora del beneficio proporcionado por la presente invención al sistema inmunológico del animal. Además, los microorganismos probióticos, tales como las especies *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, por ejemplo, se pueden añadir a la composición.

Dada la descripción de la presente invención, la cantidad apropiada de astaxantina puede ser determinada por los expertos en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de composición (p. ej., una composición de alimentos para mascotas nutricionalmente equilibrada *versus* un suplemento), el consumo medio de tipos específicos de composiciones por diferentes animales y las condiciones de fabricación en las que se prepara el alimento. Como ejemplo, las composiciones pueden, en ciertas realizaciones, comprender menos de aproximadamente el 3% de astaxantina, en peso de la composición. En una realización aún más, las composiciones pueden comprender de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 2%, o de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1%, o de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%, de astaxantina, todo en peso de la composición.

Métodos

- 5 Los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración oral (es decir, a través de la ingestión) de una composición de la presente invención a un animal de compañía y más preferiblemente a un perro o gato doméstico, para atenuar la inflamación, mejorar la respuesta inmune, aumentar la longevidad, o combinaciones de los mismos.
- Se describe también un método para proporcionar astaxantina en una dosificación eficaz para potenciar la respuesta inmune de un perro o gato en el que la astaxantina está asociada con una lipoproteína de alta densidad (HDL). El método también proporciona una cantidad suficiente de astaxantina en la dieta del animal de modo que la astaxantina es absorbida por los leucocitos del animal.
- 10 El método proporciona astaxantina a un nivel eficaz para aumentar la respuesta inmune mediada por células en un perro o gato. El método también proporciona un nivel eficaz de astaxantina para aumentar la respuesta inmune humoral en un animal de compañía, así como la producción *in vivo* de IgG e IgM.
- Proporcionando una función inmune mejorada al animal, también se proporciona un método para promover la longevidad en un animal de compañía, que comprende el paso de alimentar al animal con una dieta que comprende una cantidad eficaz de astaxantina durante un tiempo suficiente para que la astaxantina incremente la capacidad del animal para provocar una respuesta inmune.
- 15 Las composiciones de la presente invención son ingeridas por animales de compañía que necesitan (por ejemplo) una respuesta inmunitaria mejorada, una fuente de alimento apetecible, o medios para satisfacer las necesidades de hambre o nutricionales. Las composiciones también pueden ser ingeridas como suplemento frente a requerimientos dietéticos normales.
- 20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "administración oral", con respecto al animal de compañía, significa que el animal ingiere o a un ser humano se le instruye para alimentar, o realmente alimenta, al animal con una o más de las composiciones de la presente invención. Preferiblemente, la composición es una composición alimenticia para mascotas o un suplemento, como se ha descrito en este documento. En el caso que el ser humano esté instruido para alimentar con la composición, tal instrucción puede ser aquella que instruya y/o informe al ser humano que el uso de la composición puede y/o proporcionará el beneficio referenciado, por ejemplo, una respuesta inmune mejorada. Por ejemplo, tal instrucción puede ser una instrucción oral (p. ej., mediante la instrucción oral de, por ejemplo, un médico, veterinario u otro profesional de la salud, o medios de radio o televisión (es decir, anuncios), o instrucción escrita (p. ej., a través de la instrucción escrita de, por ejemplo, un médico, veterinario u otro profesional de la salud (p. ej., guías), profesional de ventas u organización (p. ej., a través de, por ejemplo, folletos de marketing, panfletos u otros artículos didácticos), medios escritos (p. ej., internet, correo electrónico u otros medios relacionados con la informática), y/o envases asociados con la composición (p. ej., una etiqueta presente en un recipiente que contiene la composición). Como se usa en este documento, "escrito" significa a través de palabras, imágenes, símbolos y/u otros descriptores visibles. Dicha información no necesita utilizar las mismas palabras utilizadas en la presente memoria, por ejemplo, "mejorar", "inmune", "respuesta" o similares, sino más bien el uso de palabras, imágenes, símbolos y similares que transmiten el mismo significado o similar contemplado dentro del alcance de esta invención.
- 25 30 35
- Las composiciones descritas en la presente memoria pueden usarse como suplemento de los requisitos dietéticos ordinarios o pueden servir como alimento primario para el animal de compañía (y, como tal, los suplementos o alimentos pueden estar nutricionalmente equilibrados). La administración puede ser, según sea necesario o según se desee, por ejemplo, una vez por mes, una vez por semana o diariamente (incluyendo varias veces al día). Cuando se utiliza como suplemento a requerimientos dietéticos ordinarios, la composición se puede administrar directamente al mamífero o de otro modo junto con un alimento o comida diaria o mezclarse con éste. Cuando se utiliza como alimentación diaria o alimento, la administración será bien conocida por los expertos en la materia.
- 40 45
- La cantidad de composición utilizada puede depender de una variedad de factores, incluyendo la condición y/o edad del animal de compañía, la calidad de la composición o suplemento alimenticio (cuando sea aplicable) y el tamaño o raza del animal de compañía (cuando sea aplicable). Como orientación, se puede administrar a un animal de compañía aproximadamente de 0,001 mg a aproximadamente 40 mg, diariamente, de astaxantina. Como otro ejemplo, se pueden administrar a gatos aproximadamente de 0,02 mg a aproximadamente 10 mg, diariamente, de astaxantina. Como otro ejemplo, se pueden administrar a perros aproximadamente de 1 mg a aproximadamente 40 mg diarios de astaxantina.
- 50 55
- Además, la concentración plasmática de astaxantina puede aumentarse en un gato de aproximadamente 20 nmol/l a aproximadamente 0,14 µmol/L después de administrar la composición. La concentración plasmática de astaxantina en un perro puede aumentarse desde aproximadamente 0,01 µmol/l hasta aproximadamente 0,14 µmol/l después de administrar la composición.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1

Efectos de la suplementación con astaxantina en perros

Materiales y métodos

5 Se asignaron al azar a perros Beagle hembra (de 9 a 10 meses de edad, $8,2 \pm 0,2$ kg de peso corporal, Covane Research Products Inc., Kalamazoo, MI) ($n = 14/\text{tratamiento}$) para alimentarlos con 0, 10, 20 ó 40 mg de astaxantina (109 g de astaxantina/kg de concentrado de oleoresina de *Haematococcus pluvialis*, AstraZanthin™, La Haye Laboratories, Redmond, WA) diariamente durante 16 semanas. La astaxantina se incorporó a una dieta basal comercial (The Iams Co., Lewisburg, OH) y se administró dos veces al día (200 g de alimento/día). La composición de la dieta fue la siguiente (g/kg): 85,3 de humedad, 275,8 de proteína, 60,7 de cenizas, 115,0 de grasa, 9,9 de Ca, 9,3 de P, 21,3 de fibra bruta y 18,914 kJ/kg de energía bruta; la proporción de ácidos grasos n-6:n-3 fue de 7,9. Los perros fueron alojados en jaulas de 2 x 3 m (2 perros/jaula) a una temperatura (de 20 a 22°C) y una instalación controlada con luz (14 horas luz). El peso corporal se registró en la semana 0, 4, 8 y 16. Se recogió sangre en las semanas 0, 6 y 12 para evaluar la función inmune. Todos los perros fueron vacunados (Vanguard 5™, Smithkline Beacham, West Chester, PA) dos veces en la semana 12 y 14 y les fue tomada sangre nuevamente en la semana 16 para evaluar las respuestas inmunitarias post-vacunación.

15 *Hipersensibilidad de tipo retardado.* En la semana 12 (antes de la vacunación) y 16 (después de la vacunación), se les inyectaron intradérmicamente a todos los perros 100 microlitros de (1) solución salina (8,5 g/L; control negativo), (2) una vacuna polivalente atenuada que contenía el virus de moquillo canino, adenovirus tipo 2, virus parainfluenza y parvovirus (sin diluir, Vanguard 5™, Smithkline Beacham, West Chester, PA) y (3) fitohemaglutinina (PHA, 0,5 g/L) como se ha descrito anteriormente (Chew *et al.*, 2000) para evaluar la hipersensibilidad cutánea de tipo retardado (DTH). La induración de la piel se midió a 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección.

20 *Hematología.* En un analizador de hematología (Vet ABC-Hematology Analyzer, Heska, Fort Collins, CO), utilizando sangre tratada con EDTA, se realizó un hemograma completo (recuento de glóbulos blancos, recuentos de glóbulos rojos y plaquetas, recuentos diferenciales de linfocitos, monocitos y granulocitos, hematocrito, hemoglobina y volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina y hemoglobina y volumen de plaquetas).

25 *Linfoproliferación.* La respuesta de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frente a PHA (concentración final de 2 y 10 mg/L), concanavalina A (Con A, 1 y 5 mg/L) y mitógeno de hierba carmín (PWM, 0,25 y 1,25 mg/L) se evaluó en la semana 0, 6, 12 y 16 utilizando cultivos de sangre completa (Chew *et al.*, 2000). Se cultivó sangre entera para imitar las condiciones *in vivo*.

30 *Subconjunto de leucocitos.* Se cuantificaron subpoblaciones de CD3 (T total), CD4 (Th), CD8 (Tc), MHC II (linfocitos activados) y CD21 (células B maduras) por citometría de flujo en la semana 0, 6, 12 y 16 (Chew *et al.*, 2000).

IgG e IgM. Las concentraciones de IgG (IgG anti-perro de oveja, sensibilidad = 16 microgramos/L) e IgM (IgM anti-perro de cabra, sensibilidad = 31 microgramos/L) en plasma se analizaron mediante ELISA utilizando un kit comercial (Bethyl Lab., Inc., Montgomery, Tx).

35 *Actividad citotóxica de células asesinas naturales.* Se resuspendieron células de adenocarcinoma tiroideo canino (células diana) a 2×10^5 en medio Eagle modificado de Dulbecco (Sigma, St. Louis, MO) que contenía 100 ml/l de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 g/l de sulfato de estreptomina. Se resuspendieron PBMC separadas con ficol (células efectoras) a 1×10^6 y 2×10^6 células/ml y se añadieron 100 microlitros a las células diana en placas de fondo plano de 96 pocillos para proporcionar relaciones efector:objetivo de 5:1 y 10:1. Después de 40 de incubar durante 8 h, se añadieron 20 microlitros (5 g/L) de MTT y se incubaron durante 4 horas. El sobrenadante se retiró y el formazano se resuspendió en 100 microlitros de isopropanol. La densidad óptica se midió a 550 nm y el porcentaje de citotoxicidad específica se calculó como sigue:

$$\% \text{ de citotoxicidad específica} = 1 - (\text{OD}_{\text{efector+diana}} - \text{OD}_{\text{efector}}) / \text{OD}_{\text{diana}} \times 100$$

45 *Proteína C-reactiva.* Los cambios en las proteínas de fase aguda se evaluaron en plasma mediante la medición de las concentraciones de proteína C reactiva (CRP) usando CRP antimucina marcada con peroxidasa de rábano picante en un inmunoensayo sándwich de fase sólida (Tri Delta Diagnostics, Morris Plains, NJ).

Daño oxidativo al ADN. Se midió 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en un ELISA de plasma (Kit BIOXYTECH® 8-OHdG-EIA, OxisResearch, Portland, OR, sensibilidad = 0,5 microgramos/L).

Resultados

50 La dieta no influyó significativamente en el peso corporal durante el estudio. El peso corporal promediado fue $8,18 \pm 0,16$ y $8,57 \pm 0,11$ kg en la semana 0 y 16, respectivamente. La astaxantina no fue detectable en el plasma de todos los perros antes de la suplementación y en perros no suplementados durante el estudio. Sin embargo, la astaxantina aumentó de manera dependiente de la dosis hasta la semana 16 (Figura 5). Las concentraciones máximas de sangre se observaron en la semana 6 en todos los perros suplementados.

Hipersensibilidad de tipo retardado. La dieta no influyó significativamente en la respuesta de induración de la piel frente a la solución salina, la PHA o la vacuna en la semana 0 y 8. Sin embargo, los perros alimentados con 10, 20 y 40 mg de astaxantina presentaron una respuesta de DTH más alta a las 48 y 72 horas después de una estimulación intradérmica con la vacuna en la semana 12 (Figura 5). Esta respuesta se observó antes (a las 24 y 48 h) en la semana 16, después de que los perros fueran vacunados en la semana 12 y 14. No se observó respuesta similar con la PHA.

Hematología. La hematología hemática generalmente no mostró efectos dietéticos durante el estudio.

Linfoproliferación. Los perros alimentados con 20 mg de astaxantina presentaron una mayor proliferación de PBMC inducida por A que los perros no suplementados en la semana 12. Sin embargo, la astaxantina no influyó en los cambios en la proliferación de PBMC estimulada por PHA o PWM en todos los períodos de tiempo.

Subpoblaciones de leucocitos. La astaxantina en la dieta aumentó generalmente la población de células B en las semanas 6 y 12 de una manera dependiente de la dosis (Figura 6). Después de la vacunación en la semana 16, los perros alimentados con 20 mg de astaxantina mostraron la mayor respuesta (Figura 6). La astaxantina no produjo cambios en las poblaciones de CD4, CD8 y MHC clase II en ningún período de tiempo estudiado. Sin embargo, los perros alimentados con 40 mg de astaxantina mostraron una disminución transitoria en la población de CD3.

Producción de inmunoglobulina. Las concentraciones de IgG en plasma fueron mayores en la semana 12 en perros alimentados con 20 mg de astaxantina y de nuevo después de la vacunación en la semana 16 (Figura 7). Una astaxantina dietética más alta (40 mg) no produjo la misma estimulación en la producción de IgG. La concentración de IgM en plasma no fue influenciada por la dieta de astaxantina pre-vacunación (semana 0 a 12) (Figura 7). La vacunación en las semanas 12 y 14 generalmente aumentó las concentraciones plasmáticas de IgM aproximadamente 300% en todos los perros. Los perros alimentados con 20 mg de astaxantina mostraron concentraciones significativamente mayores de IgM en la semana 16. Al inicio del estudio, las concentraciones de IgG e IgM fueron similares entre los grupos de tratamiento.

Actividad citotóxica de células asesinas naturales. La astaxantina dietética produjo un aumento dependiente de la dosis en la actividad de las células NK en la semana 6; los perros alimentados con 40 mg de astaxantina son significativamente más altos que el control (Figura 8). En la semana 12, los perros alimentados con 20 mg pero no los alimentados con 40 mg de astaxantina presentaron una mayor actividad citotóxica de las células NK que el control. Esta misma tendencia continuó hasta la semana 16. No se observó ninguna diferencia de tratamiento en la semana 0.

Proteína C-reactiva. Las concentraciones de PCR en el plasma fueron similares a la semana 12 del estudio (promediada 4,48 mg/L). Sin embargo, la astaxantina en la dieta disminuyó las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva después de la vacunación en la semana 16.

Daño oxidativo del ADN. No hubo ninguna influencia dietética sobre la concentración de 8-OHdG en la semana 12 (Figura 10). Al igual que con la proteína C reactiva, la astaxantina dietética inhibió la producción de 8-OHdG en el plasma de perros suplementados. No hubo ninguna disminución adicional en las concentraciones plasmáticas de 8-OHdG en perros alimentados con 40 mg de astaxantina.

La astaxantina alimentaria potenció tanto las respuestas inmunes mediadas por células como humorales en perros. Las dosis diarias de 10 a 40 mg de astaxantina aumentaron la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) a un antígeno específico (la vacuna) pero no frente a PHA, un antígeno no específico, en la semana 12 de la alimentación. Después de la vacunación, la respuesta de DTH se potenció de forma similar con la astaxantina en la dieta. Sin embargo, la respuesta general de induración de la piel fue más rápida después de la vacunación (observada 24 horas después de la estimulación intradérmica) que antes de la vacunación (48 horas después de la estimulación intradérmica). Se observó una mayor respuesta de DTH de la alimentación de astaxantina en perros en comparación con otros carotenoides previamente investigados, incluyendo β -caroteno (Chew *et al.* 2000), y la luteína (Kim *et al.* 2000) como se determina por la respuesta cutánea, que generalmente se considera un método clínico confiable para la evaluación de la función de las células T *in vivo* en perros (Miyamoto *et al.* 1995).

La respuesta aumentada de DTH es consistente con una respuesta proliferativa de linfocitos más alta a con A, un mitógeno de células T. La mayor respuesta blastogénica se observó en este estudio con 20 mg de astaxantina. Las células asesinas naturales (NK) sirven como un sistema de inmunovigilancia contra tumores, y la astaxantina dietética también demostró la capacidad de mejorar la actividad de las células NK.

La astaxantina dietética también estimuló la inmunidad humoral, aumentando la producción de IgG e IgM sobre los controles sin suplementar después de la vacunación, con una respuesta óptima en estos estudios observada para 20 mg/d de suplementos de astaxantina. En este estudio, la mayor respuesta de anticuerpos estuvo en paralelo con el aumento de la subpoblación de células B. De hecho, en la semana 16, los perros alimentados con 20 mg tenían tanto la subpoblación de células B más alta como las concentraciones más altas de IgG e IgM. Esto es compatible con estudios previos realizados en perros con 20 mg de β -caroteno (Chew *et al.*, 2000) y 20 mg de luteína (Kim *et al.*, 2000) donde aquellos perros también exhibieron mayores concentraciones de IgG plasmática que los animales

no suplementados.

Los caninos suplementados con astaxantina también mostraron concentraciones más bajas de CRP circulante después de la estimulación con la vacunación. Las concentraciones de CRP en sangre aumentan en respuesta a la infección, inflamación y otros estados de enfermedad que implican necrosis tisular, todos los cuales pueden ser

5

Ejemplo 2

Efectos de la suplementación con astaxantina en gatos

Materiales y métodos

Se asignaron aleatoriamente (n = 14/dieta) gatos domésticos de cabello corto de 8 a 9 meses de edad, 3,2 ± 0,04 kg de peso corporal, Liberty Farms, Waverly, NY para ser alimentados con 0, 1, 5 ó 10 mg de astaxantina (109 g de astaxantina/kg de concentrado de oleoresina de *Haematococcus pluvialis*, AstraZanthin™, La Hays Laboratories, Redmond, WA) diariamente (basado en una ingesta media de 90 g de alimento/día) durante 12 semanas. La astaxantina se incorporó a una dieta basal comercial (The Iams Co., Lewisburg, OH) y se proporcionó *ad libitum*. La composición de la dieta fue la siguiente (g/kg): 63,1 de humedad, 350,6 de proteína, 62,7 de cenizas, 213,6 de grasa, 10,0 de Ca, 7,6 de P, y 7,1 de fibra bruta, 21.707 kJ/kg de energía bruta; la proporción de ácidos grasos n-6:n-3 fue de 9,9. Los gatos fueron alojados a una temperatura (de 20 a 22°C) y en instalaciones con luz controlada (luz de 14 horas) y los pesos corporales se determinaron en las semanas 0, 4, 8 y 12. La sangre se recogió en la semana 0 y 8 para evaluar la función inmune. Para evaluar los efectos en la dieta de la astaxantina sobre la respuesta inmune después de una estimulación antigénica, todos los gatos fueron vacunados (Felocell™, Pfizer, Nueva York) dos veces (semanas 8 y 10) y se recogió sangre en la semana 12 para medir los mismos parámetros inmunes.

10

15

20

25

Hipersensibilidad de tipo retardado. Se evaluó la respuesta de la hipersensibilidad de tipo retardada cutánea (DTH) a las semanas 0, 8 (pre-vacunación) y 12 (post-vacunación), como describió Kim *et al.*, 2000b). A los gatos les fueron inyectados intradérmicamente 100 µl de (1) solución salina (8,5 g/l; control negativo), o (2) una vacuna polivalente atenuada que contenía virus del herpes felino-1, calicivirus, parvovirus y *Chlamydia psittaci* (Felocell™, Pfizer, NY, NY) para medir la inmunidad específica, y (3) concanavalina A (con A, 0,5 g/l). La induración de la piel se midió a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección.

30

Hematología. Se midieron los parámetros hematológicos (recuentos de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, recuentos diferenciales de linfocitos, monocitos y granulocitos, hematocrito, hemoglobina y volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina y hemoglobina y volumen de plaquetas) mediante un analizador de hematología (Vet ABC-Hematology Analyzer, Heska, Fort Collins, CO).

35

Linfoproliferación. Se evaluó la proliferación de células mononucleares de sangre periférica inducida por mitógenos (PBMC) incubando sangre entera en presencia de PHA (concentración final de 0,25 y 1,25 mg/L), con A (0,5 y 2,5 mg/L) y mitógeno de hierba carmín (PWM; 0,025 y 0,125 mg/L) como se ha descrito previamente (Chew *et al.*, 2000). Se utilizó sangre entera para simular las condiciones *in vivo*. Los resultados se muestran como el índice de estimulación (cpm de cultivos estimulados por mitógenos ÷ cpm de cultivos no estimulados).

40

Subconjunto de leucocitos. La sangre recogida en las semanas 0, 8 y 12 fue fenotipificada para poblaciones de CD3 (T total), CD4 (Th), CD8 (Tc), MHC II (linfocitos activados) y CD21 (células B maduras) por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickenson, San José, CA) como se ha descrito anteriormente (Chew *et al.*, 2000).

45

Actividad citotóxica de células asesinas naturales. Se cultivaron cultivos de células de fibroblastos de riñón felino Crandell (CrFK, ATCC CRL-9761, Crandell *et al.*, 1973) en medio Eagle Modificado de Dulbecco (Sigma, St. Louis, MO) con suero bovino fetal al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 g/l de sulfato de estreptomina. A una confluencia del 70-90%, las células se tripsinizaron, se lavaron y se ajustaron a 2 x 10⁵ células/ml. Se inyectaron cien microlitros de suspensión celular en cada pocillo de placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) y se incubaron a 37°C durante 8 horas. Las PBMC separadas con Ficoll se ajustaron a 1 x 10⁶/ml o 2 x 10⁶/ml y 100 µl de las suspensiones celulares se añadieron a las células diana CrFK para proporcionar relaciones células efectoras:diana de 5:1 y 10:1. Después de incubar durante 8 horas, se añadieron 20 µL de MTT (5 g/l) y la mezcla se incubó durante 4 horas. El sobrenadante se retiró y el formazano se resuspendió en 100 µl de isopropanol. La densidad óptica se midió a 550 nm y el porcentaje de citotoxicidad específica se calculó como sigue:

50

$$\% \text{ de citotoxicidad específica} = 1 - (\text{OD}_{\text{efector+diana}} - \text{OD}_{\text{efector}}) / \text{OD}_{\text{diana}} \times 100$$

Resultados

El peso corporal promediado fue 3,23 ± 0,04 y 3,22 ± 0,06 kg en las semanas 0 y 12, respectivamente, y no fue

significativamente diferente entre los tratamientos. Mientras que la astaxantina no fue detectable en el plasma de gatos no suplementados, generalmente hubo un aumento dependiente de la dosis en las concentraciones de astaxantina (Figura 7). Después de un rápido aumento inicial en las concentraciones plasmáticas de astaxantina en la semana 8, la astaxantina plasmática siguió aumentando, aunque de forma más gradual, hasta la semana 12.

5 *Hipersensibilidad de tipo retardado.* La astaxantina en la dieta estimuló la respuesta de DTH tanto con la estimulación específica antigénica (vacuna) como con la no específica (con A) (Figura 8), pero no con la solución salina (no mostrada) en la semana 8. La respuesta máxima de induración de la piel frente a la vacuna se observó a las 72 h después de la inyección y se observó una mejora significativa en gatos alimentados con 10 mg de astaxantina. Los gatos alimentados con 5 o 10 mg de astaxantina presentaron una respuesta DTH más alta frente a la con A a las 24 y 48 h después de la estimulación intradérmica (Figura 8). La respuesta de DTH con astaxantina en la dieta se redujo un poco después de la vacunación en la semana 12. Los gatos alimentados con 10 mg de astaxantina todavía mostraron una respuesta DTH mejorada frente a la vacuna, pero a las 24 h después de la inyección (Figura 8). La respuesta frente a con A fue significativa sólo con 1 mg de astaxantina.

10 *Hematología.* La astaxantina en la dieta generalmente no influyó en los parámetros hematológicos de la sangre (recuentos de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, recuentos diferenciales de linfocitos, monocitos y granulocitos, hematocrito, hemoglobina y volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina y hemoglobina y volumen de plaquetas). Todos los valores estaban dentro del rango normal.

15 *Linfoproliferación.* A pesar de que la astaxantina en la dieta no influyó en la proliferación de PBMC inducida por mitógenos en la semana 8, los gatos alimentados con 1 mg, pero no los que recibieron mayores cantidades de astaxantina, mostraron una mayor respuesta proliferativa frente a la vacunación con ConA, PHA y PWM en la semana 12 (Figura 9).

20 *Subpoblaciones de leucocitos.* La astaxantina dietética aumentó las poblaciones de células T CD5 + totales y células T auxiliar (CD4 +) en las semanas 8 y 12 (Figura 10). Los aumentos fueron generalmente dependientes de la dosis. En contraste, la astaxantina disminuyó la población de células B. La dieta no influyó en la distribución de las células T citotóxicas CD8 + (Tc) (promediado $(4,7 \pm 0,4)$ ni en las poblaciones de MHC clase II (promediado $94,1 \pm 1,0$).

25 *Producción de inmunoglobulina.* Las concentraciones de IgG e IgM en plasma fueron mayores en la semana 8 en gatos alimentados con 10 mg de astaxantina (Figura 11). Incluso las concentraciones tanto de IgG como de IgM fueron todavía numéricamente superiores en estos gatos después de la vacunación en la semana 12, sólo aquellos alimentados con 5 mg de astaxantina fueron significativos.

30 *Actividad citotóxica de células asesinas naturales.* No hubo diferencias en el tratamiento dietético en la actividad citotóxica de las células NK en la semana 8. Sin embargo, la astaxantina estimuló la actividad citotóxica de las células NK en la semana 12 con proporciones efectoras:diana de 5:1 (5 y 10 mg de astaxantina) o 10:1 (1, 5 y 10 mg de astaxantina) (Figura 12).

35 Los gatos alimentados con astaxantina mostraron una mayor respuesta de DTH tanto a la vacuna como a con A. Los perros mostraron una respuesta DTH significativa frente a la vacuna. La respuesta de DTH aumentada fue acompañada por un aumento en las poblaciones de linfocitos T y Th totales en gatos alimentados con astaxantina aunque no se observó una respuesta similar en perros.

40 La proliferación de PBMC inducida por mitógenos aumentó generalmente en los gatos y perros alimentados con astaxantina. Además, la actividad citotóxica de las células NK se intensificó en gatos y perros alimentados con una composición de dieta que contenía astaxantina.

45 La astaxantina dietética también estimuló la inmunidad humoral tanto en gatos como en perros, y la suplementación con astaxantina proporcionó un aumento en la producción de IgG e IgM antes y después de la vacunación. La producción de anticuerpos aumentó generalmente después de la exposición al antígeno a través de la vacunación, también. En contraste con los perros, la producción de anticuerpos mejorada en gatos suplementados con astaxantina fue acompañada por una disminución en la población de células B en comparación con los gatos no suplementados. Sin embargo, las poblaciones de células T totales y Th en gatos alimentados con astaxantina fueron mayores. Puede ser que la astaxantina aumentara la producción de anticuerpos en gatos estimulando la función de las células T, lo que estaría de acuerdo con los hallazgos de un estudio previo en roedores que demostró una mayor producción de anticuerpos mediados por células T con suplementos de astaxantina (Jyonouchi *et al.*, 1994).

50 La potenciación de las funciones inmunes de los gatos por la astaxantina puede atribuirse a la propiedad antioxidante de la astaxantina, puesto que los inventores demostraron que la astaxantina reducía la peroxidación lipídica en perros. En resumen, la alimentación de astaxantina a los gatos produjo un aumento relacionado con la dosis de astaxantina plasmática. Al mismo tiempo, la astaxantina alimentaria aumentó la respuesta inmunitaria mediada por células como se muestra por una respuesta mejorada de DTH frente a antígenos específicos y no específicos, la proliferación de PBMC, la actividad citotóxica de células NK y el aumento de la población de células T y Th totales.

55

Referencias

- Bass et al., *Am. J. Vet. Res.*, 37, 1355 - 1357 (1976).
- Bennedsen et al., *Immunology Lett.*, 70, 185 - 189 (1999).
- Bertam, J. (1999) Carotenoides y regulación de genes. *Nutr. Rev.* 57:182-191.
- 5 Bjerkgeng et al., *Aquaculture*, 157, 63 - 82 (1997).
- Britton, G., *FASEB J.*, 9, 1551 - 1558 (1995).
- Brown et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 1258 - 1265 (1989).
- Chew et al., *J. Anim. Sci.*, 69, 4892 - 4897 (1991).
- Chew et al., *J. Anim. Sci.*, 71, 730 - 739 (1993).
- 10 Cervený et al., *FASEB J.*, 13, A210 (1999).
- Cervený et al., *FASEB J.*, 13, A210 (1999).
- Chew, B. P., *J. Nutr.*, 125, 1804S - 1808S (1995a).
- Chew, B. P., The influence of vitamins on reproduction in pigs. En: *Recent Advances in Animal Nutrition*. (P. C. Garnsworthy and D. J. A. Cole, eds.) pp 223-239. Nottingham Univ. Press, Nottingham, England.
- 15 Chew et al., *Anticancer Res.*, 19, 1849 - 1853 (1999a).
- Chew et al., *Anticancer Res.*, 19, 5223 - 5272 (1999b).
- Chew et al., *J. Nutr.*, 130, 1788-1791 (2000a).
- Chew et al., *J. Nutr.*, 130, 2322 - 2325 (2000b).
- Cornwell et al., *J. Lipid Res.*, 3, 65 - 70 (1961).
- 20 Esterbauer et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 570, 254 - 267 (1989).
- Goulinet y Chapman, *Arterioscler, Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 786 - 796 (1997).
- Gugger et al., *J. Nutr.*, 122, 115 - 119 (1992).
- Julien et al., *Circ. Res.*, 49, 248 - 254 (1981).
- Jyonouchi et al., *Nutr Cancer*, 21, 47 - 58 (1994).
- 25 Jyonouchi et al., *J. Nutr.*, 125, 2483 - 2492 (1995).
- Jyonouchi et al., *Nutr. Cancer*, 23 (2), 171-183 (1995).
- Jyonouchi et al., *Nutr. Cancer*, 36, 59 - 65 (2000).
- Kim et al., *Vet. Immunol. Immunopath.*, 74, 315 - 327 (2000a).
- Kim et al., *Vet. Immunol. Immunopath.*, 74, 331 - 341 (2000b).
- 30 Krinski et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 73, 233 - 246 (1958).
- Kurashige et al., *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 22, 27 - 38 (1990).
- Lawlor y O'Brien, *Nutr. Res.*, 15, 1695-1704 (1995).
- Martin et al., *J. Prakt. Chem.*, 341, 302 - 308 (1991).
- Mathews - Roth, M.M., *Clin. Chem.*, 24, 700 - 701 (1978).
- 35 Miki, W., *Appl. Chem.*, 63, 141 - 146 (1991).
- Miyamoto et al., *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 347 - 349 (1995).
- Naguib, Y. M. A., *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1150 - 1154 (2000).

- Nakano et al., *Biochemica et Biophysica Acta*, 1426, 119 - 125 (1999).
- Nakano et al., *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1570 - 1573 (1995).
- Olson, J. A., *Appl. Chem.*, 66, 1011 - 1016 (1994).
- Osterlie et al., *J. Nutr.*, 129, 391 - 398 (1999).
- 5 Palozza y Krinsky, *Arch. Biochem. Biophys.*, 297, 184 - 187 (1992).
- Park et al., *J. Nutr.*, 128, 1802 - 1806 (1998).
- Park et al., *Nutr. Cancer*, 33, 206 - 212 (1999).
- Poor et al., *J. Nutr.*, 122, 262 - 268 (1992).
- Romanchik et al., *J. Nutr.*, 125, 2610 - 2617 (1995).
- 10 SAS (1991) *SAS/STAT Guía del Usuario*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shigenaga et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 10771 - 10778 (1994).
- Tanaka et al., *Carcinogenesis*, 15, 15-19 (1994.).
- Terao, J., *Lipids*, 24, 659 - 661 (1989).
- Terpstra et al., *Anal. Biochem.*, 111, 149 - 257 (1981).
- 15 Weisburger, J. H., *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 226S - 237S (1991).

REIVINDICACIONES

1. Una composición alimenticia para animales de compañía que comprende astaxantina, para su uso en la mejora de la inmunidad, aumento de la longevidad, o combinación de los mismos, en un animal de compañía.
- 5 2. Una composición alimenticia para animales de compañía según la reivindicación 1, en la que la astaxantina es menor que 3%, preferiblemente de 0,0001% a 2%, más preferiblemente de 0,001% a 1%, lo más preferiblemente de 0,001% a 0,5% en peso de la composición.
3. Una composición alimenticia para animales de compañía según la reivindicación 1 ó 2, en la que el animal de compañía es un gato doméstico o un perro.
- 10 4. Una composición alimenticia para animales de compañía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición de animal de compañía es una composición alimenticia para gatos o perros.
5. Una composición alimenticia para animales de compañía según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición alimenticia para animales de compañía comprende del 20% al 50%, alternativamente del 20% al 40%, o alternativamente del 20% al 35% de proteína cruda en peso de la composición alimenticia.
- 15 6. Una composición alimenticia para animales de compañía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición alimenticia para animales de compañía comprende de 5% a 40%, alternativamente de 10% a 35% de grasa en peso de composición alimenticia.
7. Una composición alimenticia para animales de compañía según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición alimenticia para animales de compañía comprende al menos una fuente de carbohidrato.
- 20 8. Una composición alimenticia para animales de compañía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición alimenticia para animales de compañía comprende al menos una fuente de fibra.
9. Una composición alimenticia para animales de compañía según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición alimenticia para animales de compañía comprende microorganismos probióticos.
- 25 10. Una composición alimenticia para animales de compañía de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición alimenticia para mascotas es un suplemento.
11. Una composición alimenticia para animales de compañía que comprende astaxantina, para uso en:
- aumento de la respuesta inmune mediada por células en un perro o gato;
- aumento de la respuesta inmune humoral en un animal de compañía;
- aumento de la producción in vivo de IgG e IgM en un animal de compañía; o
- 30 atenuación de la inflamación en un animal de compañía.

Fig. 1

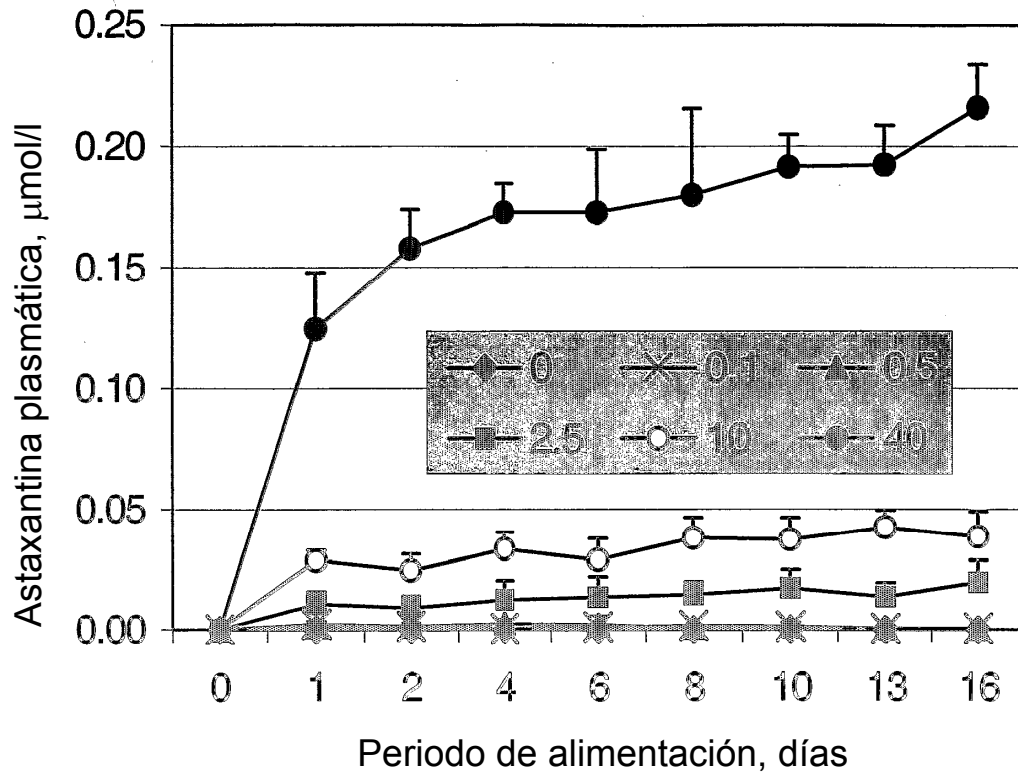


Fig. 2

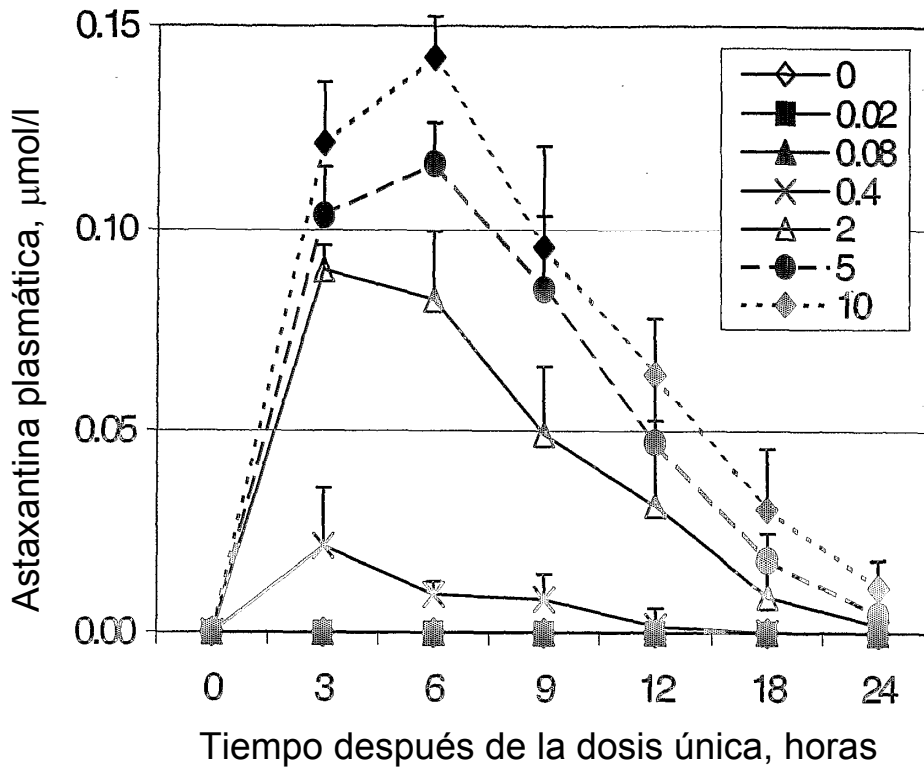


Fig. 3

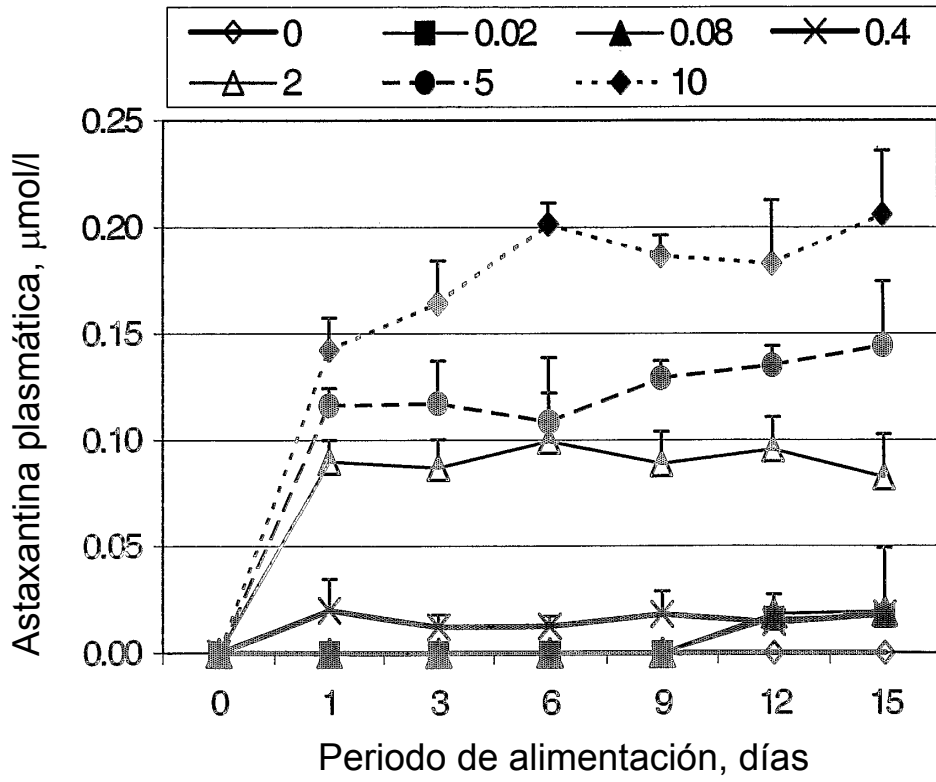


Fig. 4

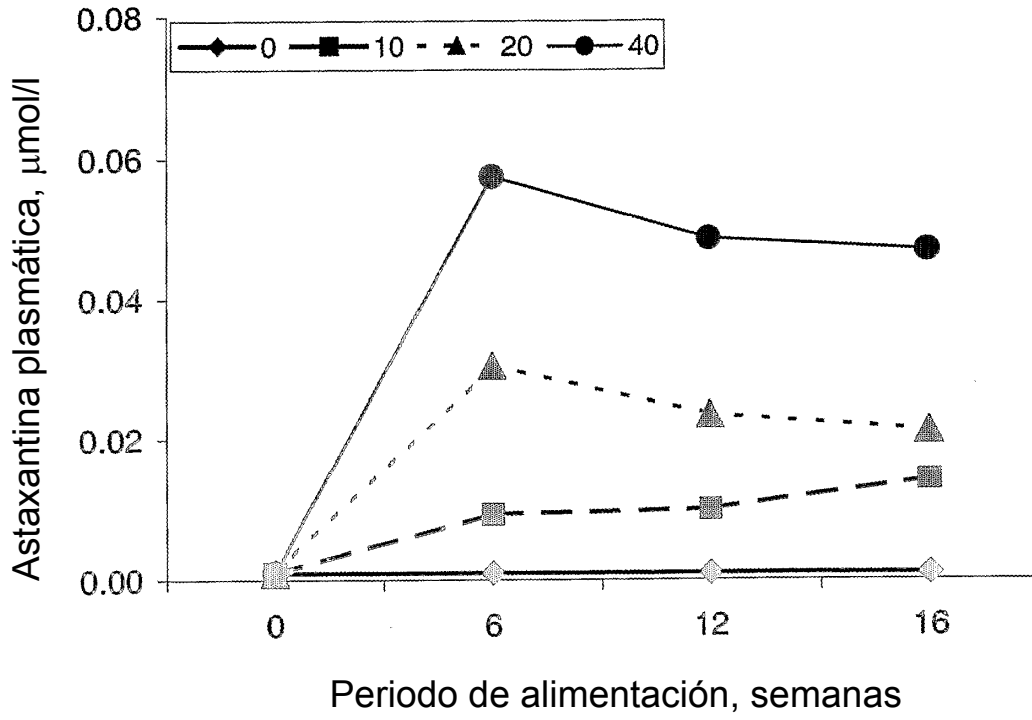


Fig. 5a

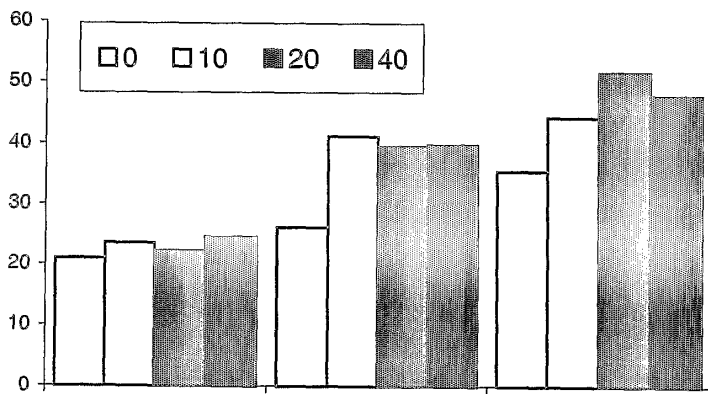
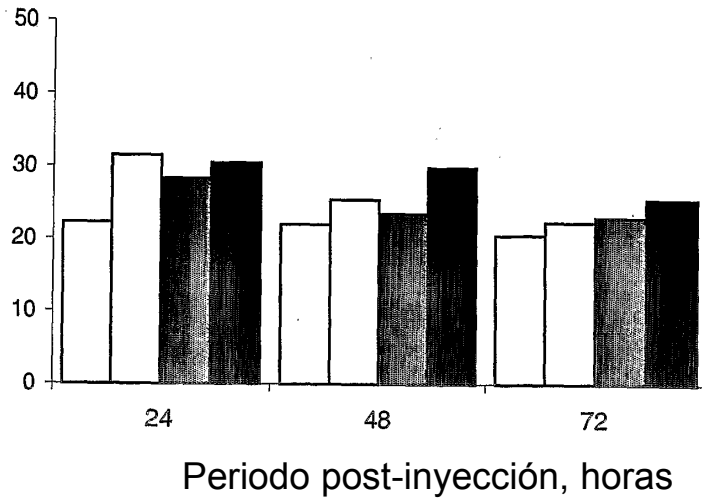
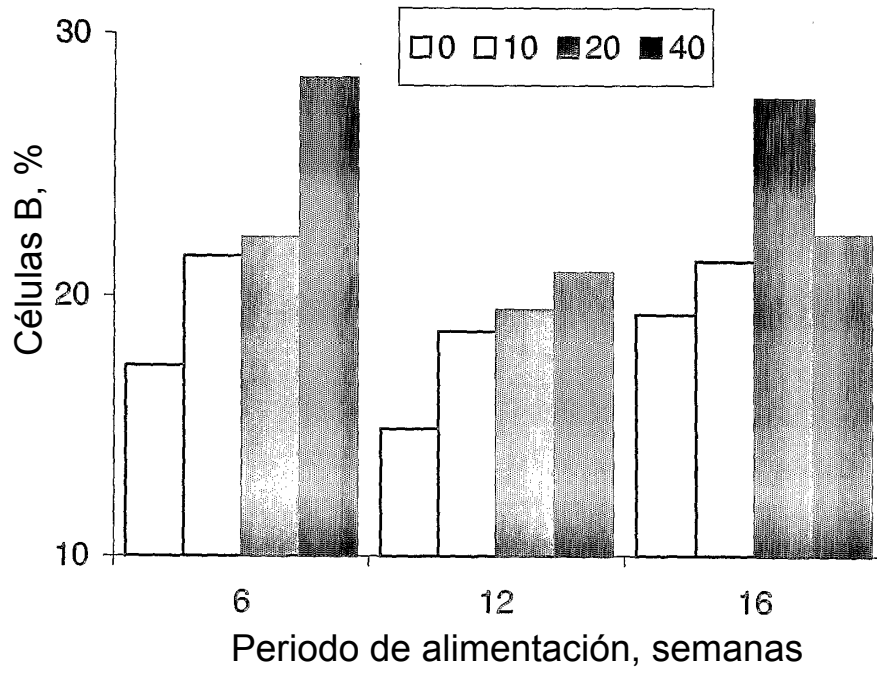


Fig. 5b

Fig. 6



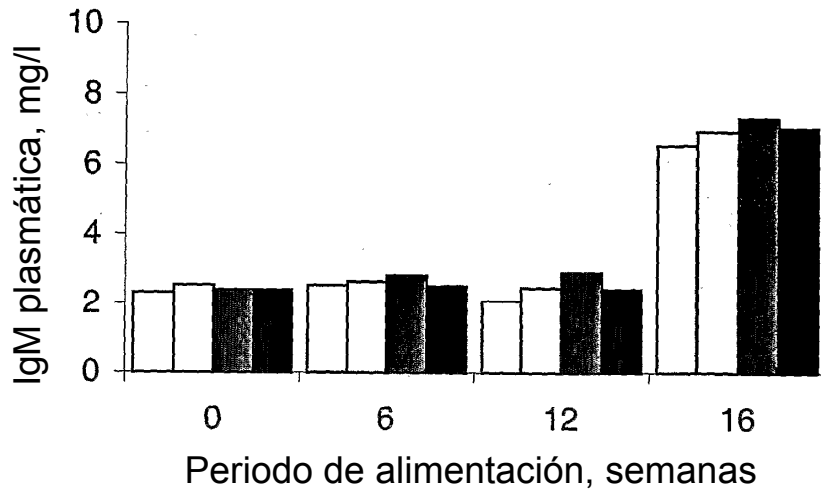


Fig. 7a

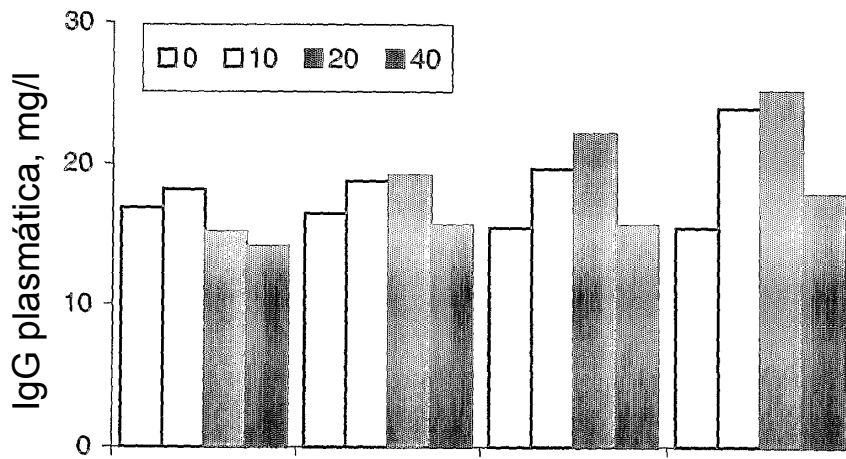


Fig. 7b

Fig. 8

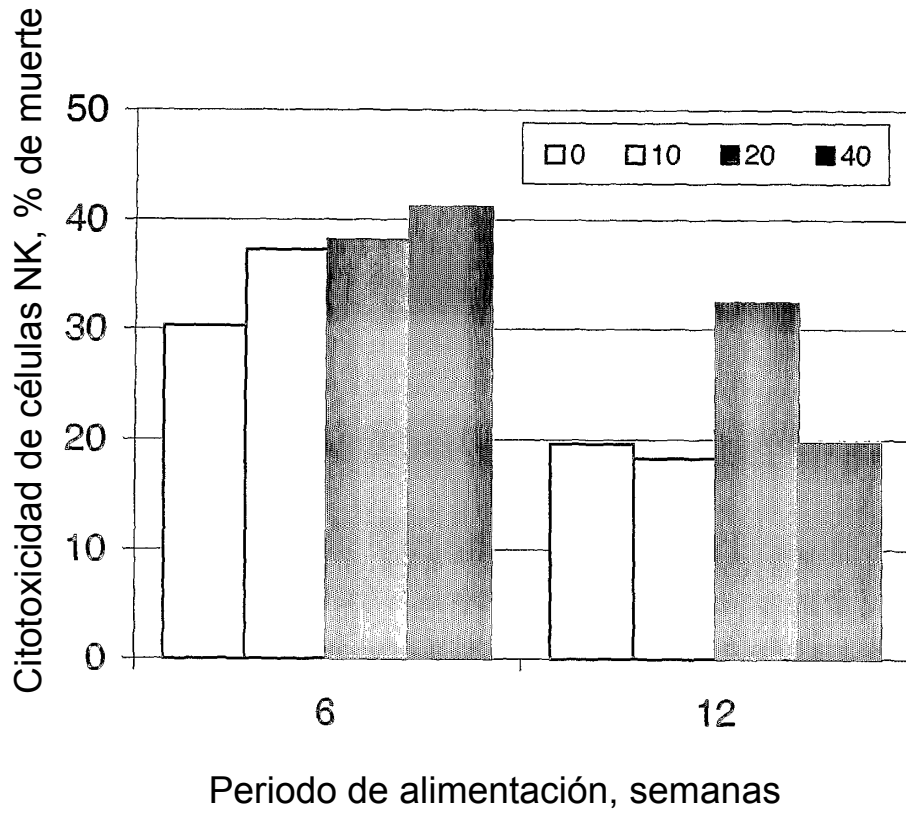


Fig. 9.

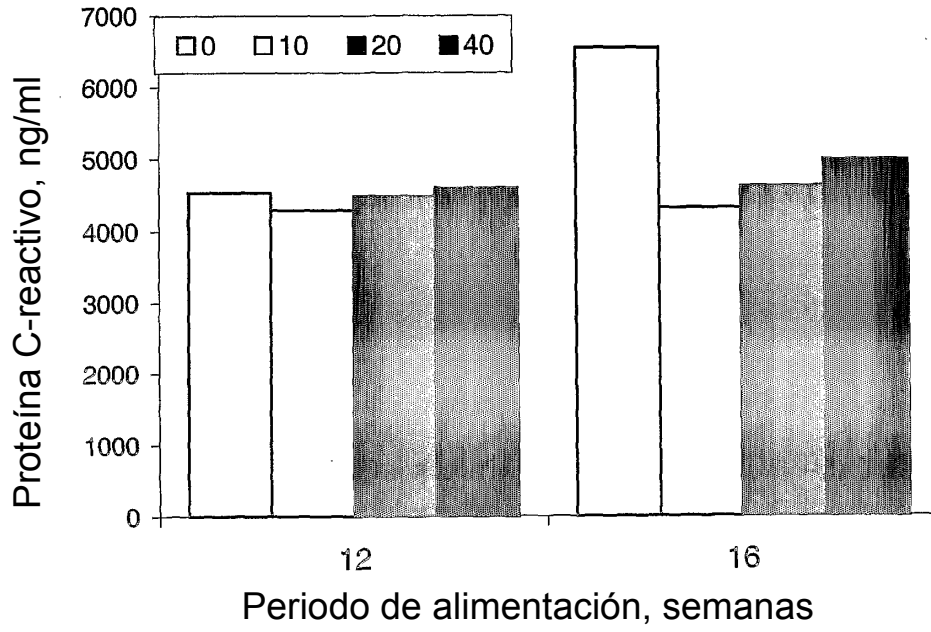


Fig. 10

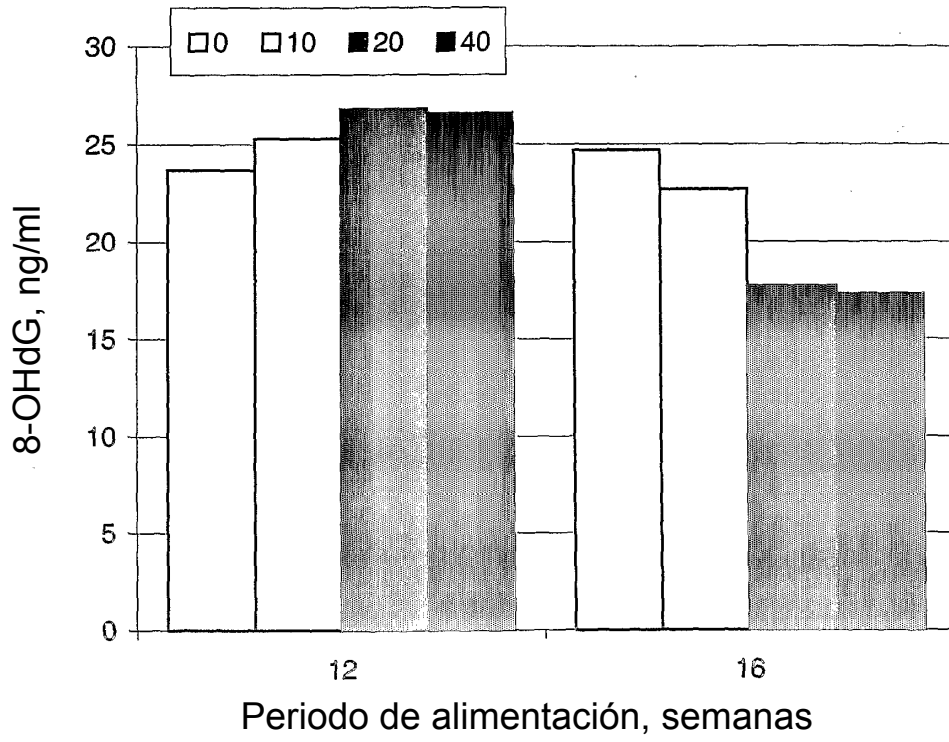
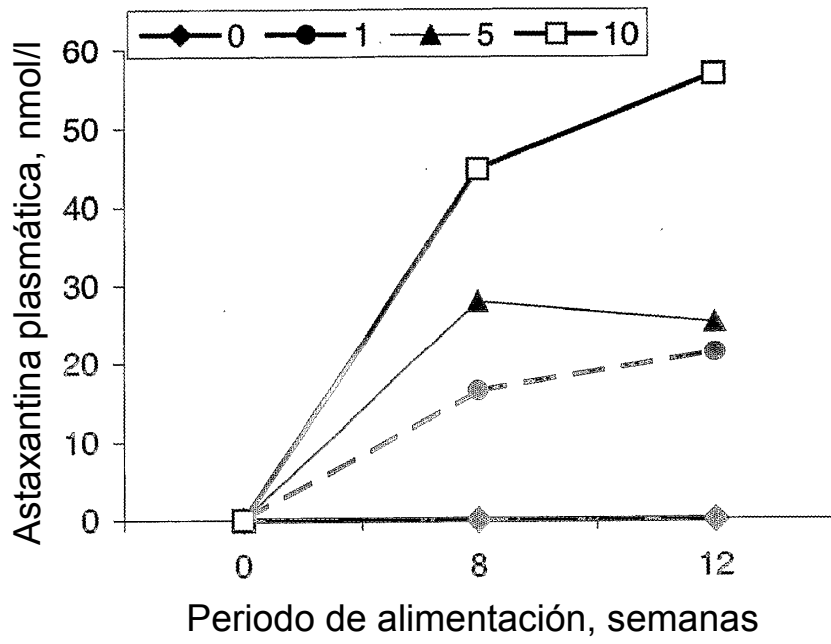


Fig. 11



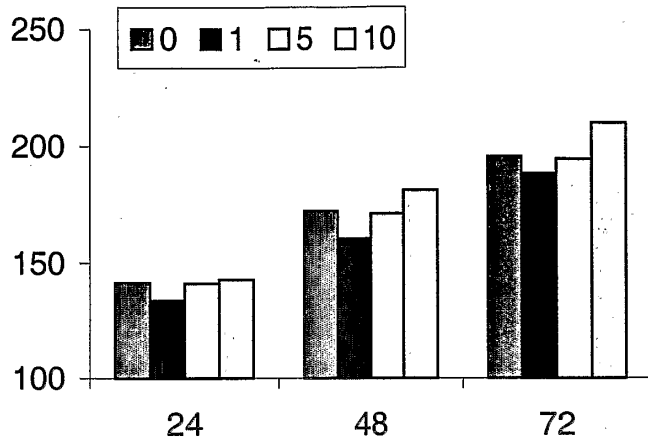
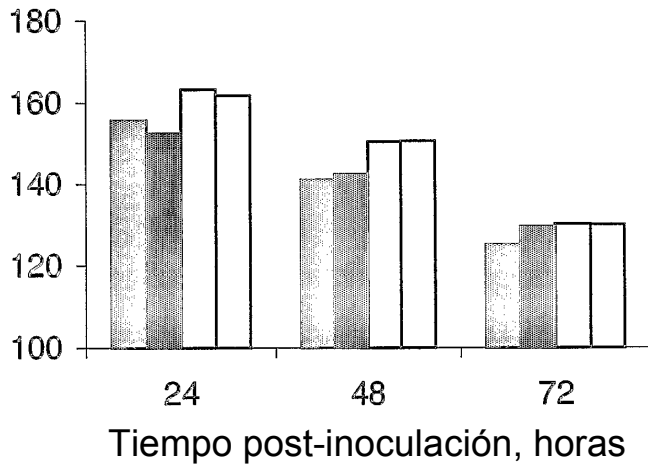


Fig. 12a



Tiempo post-inoculación, horas

Fig. 12b

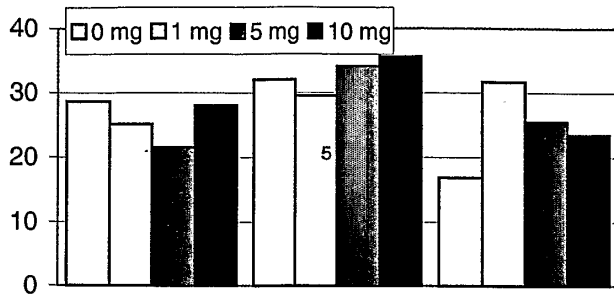


Fig. 13a

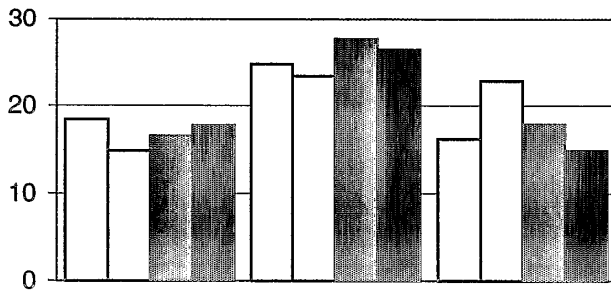
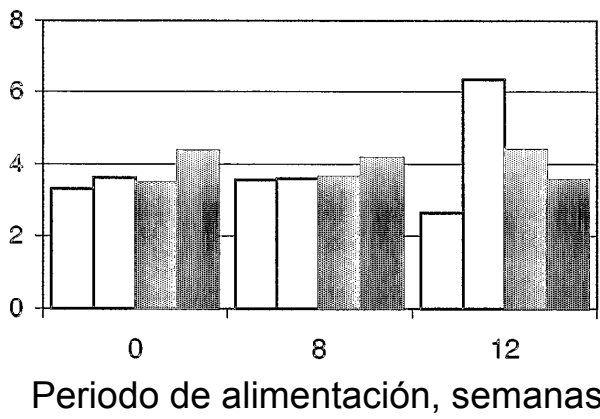


Fig. 13b



Periodo de alimentación, semanas

Fig. 13c

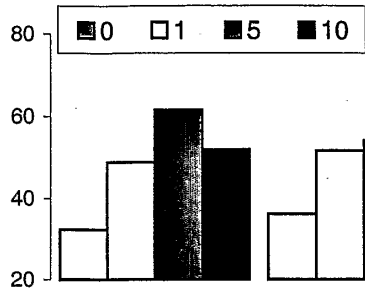


Fig. 14a

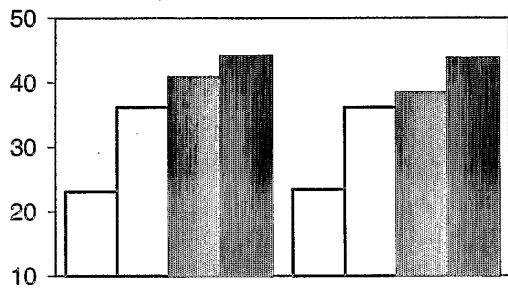
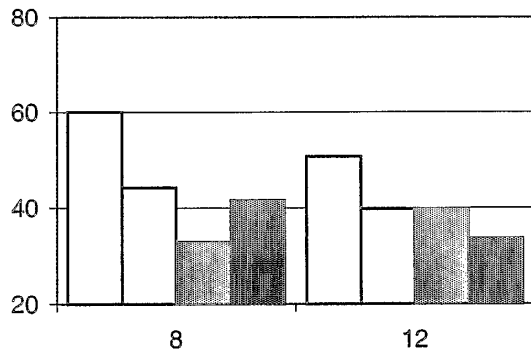


Fig. 14b



Periodo de alimentación, semanas

Fig. 14c

Fig. 15a

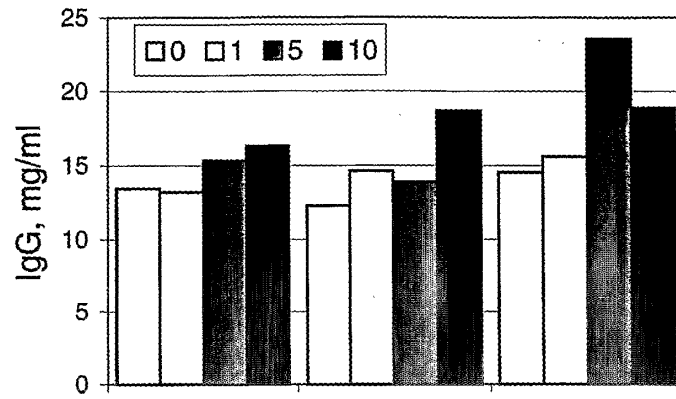


Fig. 15b

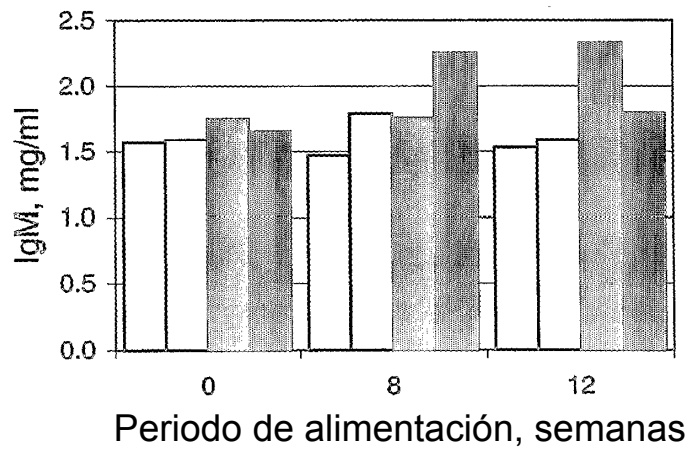


Fig. 16a

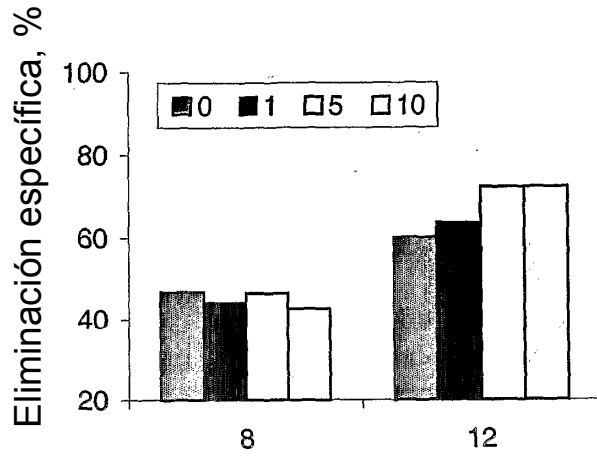


Fig. 16b

