República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0615381-0 A2**

BRPI0615381A2

(22) Data de Depósito: 25/08/2006
(43) Data da Publicação: 17/05/2011
(RPI 2106)

(51) Int.Cl.:
A23L 1/305
A23L 1/30
A61K 31/198
A61K 31/202
A23K 1/18
A23K 1/16
A61P 9/10
A61P 25/00

(54) Título: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MELHORAR A INTEGRIDADE VASCULAR FUNCIONAL, A SOBREVIVÊNCIA CELULAR E REDUZIR A APOPTOSE NA ISQUEMIA OU APÓS UM EPISÓDIO ISQUÊMICO NO CÉREBRO**

(30) Prioridade Unionista: 26/08/2005 US 60/711,547, 26/08/2005 US 60/711,549

(73) Titular(es): NESTEC S.A

(72) Inventor(es): BRIAN LARSON, YUANLONG PAN

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008354 de 25/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/022991de 01/03/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MELHORAR A INTEGRIDADE VASCULAR FUNCIONAL, A SOBREVIVÊNCIA CELULAR E REDUZIR A APOPTOSE NA ISQUEMIA OU APÓS UM EPISÓDIO ISQUÊMICO NO CÉREBRO. A presente invenção refere-se a composições e métodos para aumentar a integridade vascular em animais. As composições e métodos, que utilizam ácidos graxos poíiinsaturados de cadeia longa e compostos liberadores de óxido nítrico, também são eficazes para reduzir lesões cerebrais induzidas por isquemia em um animal.

PI0615381-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MELHORAR A INTEGRIDADE VASCULAR FUNCIONAL, A SOBREVIVÊNCIA CELULAR E REDUZIR A APOPTOSE NA ISQUEMIA OU APÓS UM EPISÓDIO ISQUÊMICO NO CÉREBRO".**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à nutrição de mamíferos e a seus efeitos sobre a melhora da integridade vascular e a proteção contra danos celulares associados a isquemia ou episódio isquêmico no cérebro. Em particular, a presente invenção utiliza combinações de compostos liberadores de óxido nítrico, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e, opcionalmente, outros ingredientes, incluindo antioxidantes, agentes antiinflamatórios, fatores de crescimento e vitaminas B, administradas como parte de uma dieta regular, para melhorar a integridade vascular, promover a sobrevivência celular e, dessa forma, reduzir a lesão isquêmica no cérebro e/ou outros órgãos, por exemplo, no caso de uma isquemia cerebral.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Várias publicações, incluindo patentes, pedidos publicados, artigos técnicos e artigos eruditos são citados neste relatório. Cada uma dessas publicações citadas é aqui incorporada por referência em sua inteireza.

A lesão cerebral isquêmica hipóxica ocorre como resultado de um suprimento diminuído de oxigênio para o cérebro, devido a uma redução ou interrupção transitória ou permanente do fluxo sangüíneo para o cérebro. A isquemia do cérebro resulta em um acidente vascular cerebral, com subseqüente apoptose e necrose de tecido cerebral, levando a um infarto. Similar à isquemia cardiovascular, a isquemia cerebral pode ser causada por vários fatores, como coágulos sangüíneos, trombose embolismo, bloqueio por placas ateroscleróticas ou outras obstruções da vascularização. Hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes e obesidade, entre similares fatores, foram identificados como fatores de risco para acidentes vasculares cerebrais isquêmicos. Acidentes vasculares cerebrais isquêmicos são uma das principais causas de morte em seres humanos no mundo todo e também afetam outros animais, incluindo animais de companhia.

Também se sabe que lesões isquêmicas contribuem significativamente para o envelhecimento cerebral e demência. A demência é a principal doença que afeta a população mais velha. A incidência de demência aumenta de cerca de 0,3 a 1% em pessoas com idades de 60 a 64 anos para 50% em pessoas com mais de 95 anos, com a prevalência dobrando a cada 5 anos (McDowell, I., Aging (Milano) 13: (2001) 143-162). Nas populações ocidentais, a doença de Alzheimer (AD) é considerada a principal forma de demência, ao passo que a demência vascular (VD) parece ser a forma predominante nas populações orientais (Fratiglioni, L. et al., Drugs Aging (1999) 15: 365-375; Ott, A., et al., The Rotterdam Study, BMJ (1995) 310: 970-973). Indícios crescentes indicam que a demência vascular e a doença de Alzheimer freqüentemente coexistem na população com demência. Por exemplo, Kalaria (Neurobiol. Aging (2000) 21: 321-330) relataram que cerca de 90% dos pacientes com AD tinham patologia cerebrovascular, e cerca de 30% dos pacientes com VD tinham patologia AD. A coexistência da lesão cerebrovascular com AD em pessoas idosas dementes foi confirmada por Snowdan et al. (J. Am. Med. Sco. (1997) 277: 813-817). Além disso, determinou-se que a nota características do diagnóstico patológico de AD (deposição amilóide e entralaçamentos neurofibrilares) existe em pessoas idosas não dementes (Snowdon et al., 1997, supra). Esses dados sugerem que a deposição amilóide e os entrelaçamentos neurofibrilares não são suficientes para causar demência em pacientes com AD, realçando a contribuição significativa das lesões isquêmicas cerebrais para o envelhecimento do cérebro e o desenvolvimento e progressão tanto de VD, quanto de AD (Korczyn, A. J. Neurol. Sci. (2005) 230: 3-6). Conseqüentemente, a prevenção de lesões cerebrais induzidas por isquemia e da apoptose de neurônios em seres humanos e animais pode retardar o envelhecimento cerebral, reduzir o risco de disfunção cognitiva e retardar a progressão da demência.

A isquemia pode ocorrer em qualquer tecido, mas é mais comumente associada a danos cerebrais, cardíacos ou renais. Conforme acima discutido, a isquemia no cérebro pode causa danos agudos, por exemplo, acidente vascular cerebral, ou prejuízos crônicos, como demência e condi-

ções relacionadas. No coração, episódios isquêmicos podem resultar em insuficiência cardíaca; da mesma forma, a insuficiência renal pode resultar de eventos isquêmicos nos rins.

Durante o acidente vascular cerebral isquêmico do cérebro ou qualquer outro tecido, ocorrem reações bioquímicas na vascularização que podem levar a edema, transformação hemorrágica e comprometimento adicional do tecido afetado, por exemplo, neurológico. Assim, o tratamento e proteção da vascularização foi identificado como uma avenida em potencial a explorar no acidente vascular cerebral isquêmico agudo, para desenvolver novas terapias. Além disso, a proteção vascular tem implicações para reduzir danos tissulares que ocorram como resultado de um episódio isquêmico.

Determinou-se que o endotélio vascular serve a várias funções reguladoras, incluindo a modulação do tônus vascular, inflamação e homeostasia, por manutenção de uma superfície não adesiva antitrombótica (Boak, L., et al. Cur. Vasc. Pharmacol. (2004) 2:45-52). A homeostasia vascular é, em parte, função da contração e relaxamento de músculos lisos vasculares, que é mediada por vários fatores, incluindo o óxido nítrico de radical livre (NO), que é um forte relaxante do músculo liso vascular.

O NO é produzido por três enzimas NO sintetase (NOS) diferentes: NOS neuronal (nNOS), que está localizada principalmente no tecido nervoso e gera NO para neurotransmissão; NOS induzível (iNOS), que é encontrada principalmente em macrófagos e pode responder a mediadores pró-inflamatórios; e NOS endotelial (eNOS), que é produzida por células endoteliais, como aquelas encontradas no endotélio vascular. (Michel, T., et al. J. Clin. Invest. (1997) 100: 2146-2152, Moncada, S., et al. Pharmacol. Rev. (1991) 43: 109-142, e Nathan, C. (1992) FASEB J6: 3051-3064). NO liberado por eNOS desempenha um importante papel na vasodilatação, proliferação de músculo liso, regulação da pressão sangüínea arterial e tem efeitos anticoagulantes e antiinflamatórios mediante inibição da adesão e agregação de plaquetas e leucócitos. (Gewaltig, M. T., et al. Cardiovasc. Res. (2002) 55: 250-260, De Graaf, J. C. et al. Circulation (1992) 85: 2284-2290, Freedman, J. E., et al. Circ. Res. (1999) 84: 1416-1421, Furchgott, R. F., et al. FA-

SEB J (1989) 3: 2007-2018, Gaboury, J., et al. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (1993) 265: H862-H867, e Kubes, P., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 4651-4655). Uma diminuição na produção de NO durante uma isquemia prolongada foi associada à lesão endotelial (Laude, L., et al. Braz. J. Med. Biol. Res. (2001) 34: 1-7).

As enzimas NOS oxidam L-arginina em citrulina, resultando na formação de NO como um subproduto. Assim, foi sugerido que a suplementação com precursores de NO, como L-arginina, pode melhorar a saúde vascular e pode facilitar o reparo de estados patológicos vasculares. De fato, demonstrou-se que a suplementação dietética com arginina induz a restauração da vasodilação e melhora a circulação coronariana em modelos animais e pacientes humanos com hipercolesterolemia, assim como intensifica a função endotelial global em pacientes com doença da artéria coronariana (Boak, L., et al. 2004). Além disso, também se demonstrou que a suplementação com L-arginina aumenta os níveis de NO e atenua a lesão miocárdica mediada por radicais O_2 livres em pacientes humanos (Kiziltepe, U., et al. Int. J. Cardiol. (2004) 97: 93-100). Estudos mais recentes demonstraram que a suplementação com arginina facilita o reparo endotelial no intestino de ratos após isquemia-reperfusão intestinal induzida (Sukhotnik, I., et al., Pediatr. Surg. Int. (2005) 3: 191-196). Assim, a administração de precursores de NO, como L-arginina, tem implicações para a ativação e proteção de células endoteliais, particularmente com relação a células endoteliais vasculares.

Também se demonstrou que ácidos graxos modulam a ativação de células endoteliais. Descobriu-se que a administração de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) inibe a adesão de linfócitos a células endoteliais vasculares (Khalfoun, B., et al. Transplantation (1996) 62: 1649-1657). Investigações subseqüentes determinaram que a administração de LCPUFA reduz a expressão em células endoteliais de moléculas de adesão e citocinas em resposta à estimulação, sugerindo que LCPUFA têm propriedades antiaterogênicas e antiinflamatórias (De Caterina, R., et al. Am. J. Clin. Nutr. (2000) 71 (supl) 213S-223S). Indícios crescentes indicam que o consumo regular de LCPUFA, em particular ácidos graxos n-3, protege o

sistema cardiovascular, reduz a formação de placas ateroscleróticas e reduz o risco de mortalidade por doença cardiovascular, particularmente após um infarto do miocárdio (Calder, P. C. Clin. Sci. (Lond). 2004 107: 1-11). Em contraste, houve pouca investigação quanto aos efeitos de LCPUFA na dieta sobre a vascularização e tecidos do cérebro, particularmente com relação a um episódio isquêmico no cérebro.

Sabe-se há muito tempo que o estresse e os danos oxidativos estão envolvidos no processo de envelhecimento. O estresse oxidativo também foi estabelecido como desempenhando um papel na patogênese de inúmeras doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer e certas formas de demência (por exemplo, Smith, M. A., Dementia & Geriatric Cognitive Disorders (1999), Vol. 10, Supl. 1). Portanto, a suplementação com antioxidantes foi empregada para retardar o processo de envelhecimento e proteger contra os efeitos degenerativos do estresse oxidativo. Da mesma forma, as vitaminas B ácido fólico, vitamina B-6 e vitamina B=12 são importantes para o bem-estar e funcionalmente normal do cérebro. O status dessas vitaminas é freqüentemente inadequado nos idosos, e essas inadequações podem resultar em hiperomocisteinemia, um fator de risco recentemente identificado para aterosclerose (Temple ME, et al. Ann. Pharmacother. 2000, 34: 57-65; Hankey GJ, et al., Lancet 1999, 354: 407-413) e doença de Alzheimer (Clarke R., et al., Arch. Neurol. 1998 55: 1449-1455). Essas inadequações podem resultar em isquemia do cérebro e similares tecidos mediante doença vascular oclusiva, acidente vascular cerebral ou trombose.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um aspecto da presente invenção apresenta uma composição compreendendo um ou mais ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) e um ou mais compostos liberadores de óxido nítrico (NORC), em uma quantidade eficaz para aumentar a integridade vascular, por exemplo, no cérebro, e/ou reduzir a apoptose em um animal. A intengridade vascular aumentada, por exemplo, do cérebro, e/ou sobrevivência celular servem para reduzir a lesão isquêmica em tecidos, por exemplo, no cérebro, no caso de um episódio isquêmico, e também podem exercer um efeito protetor con-

tra a ocorrência inicial desses eventos isquêmicos.

Em certas modalidades, a composição é uma composição de ração para animais de estimação, suplemento dietético ou um produto alimentar formulado para consumo humano. Em várias modalidades, o LCPUFA inclui pelo menos um dentre ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, ácido docosapentaenóico ou ácido docosaexaenóico, e o NORC inclui pelo menos um dentre L-arginina ou seus derivados. As composições podem compreender ingredientes adicionais. Por exemplo, um ou mais antioxidantes, vitaminas B, fatores de crescimento celular ou agentes antiinflamatórios podem ser incluídos.

Em certas modalidades, as composições são formuladas para animais de companhia, como um cão ou gato. Em outras modalidades, as composições são formuladas para consumo humano.

Outro aspecto da invenção apresenta um método para aumentar a integridade vascular e/ou reduzir a lesão cerebral induzida por isquemia em um animal, compreendendo a administração ao animal, em bases regulares, de uma composição compreendendo um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, opcionalmente suplementada com ingredientes adicionais, conforme acima descritos, em uma quantidade eficaz para aumentar a integridade vascular em tecidos do animal e/ou reduzir a lesão cerebral induzida por isquemia no caso de um episódio isquêmico no cérebro do animal. Em certas modalidades, o método é aplicado a um animal de companhia, como um cão ou gato. Em outras modalidades, o método é aplicado a seres humanos.

Em certas modalidades, a administração regular da composição ao animal resulta em uma redução nos danos cerebrais no caso de um episódio isquêmico no cérebro do animal, ou resulta em um retardamento do envelhecimento cerebral do animal. Em outra modalidade, a administração regular da composição ao animal resulta em uma redução na apoptose celular no local de uma isquemia que ocorra no animal, que pode ser em qualquer tecido, incluindo o cérebro, coração e rins.

Outras características e vantagens da invenção ficarão claras

por referência aos desenhos, descrição detalhada e exemplos que se seguem.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Gráfico de barras mostrando o efeito de dietas de controle e de teste sobre o volume da lesão isquêmica em todos os ratos submetidos a isquemia cerebral transitória. As composições das dietas de controle e de teste são descritas no exemplo 1 (*p < 0,01 *versus* controle).

Figura 2. Gráfico de barras mostrando o efeito de dietas de controle e de teste sobre o volume da lesão isquêmica em todos os ratos exibindo lesões após isquemia cerebral transitória. As composições das dietas de controle e de teste são descritas no exemplo 1 (*p < 0,01 *versus* controle).

Figura 3. Gráfico de barras mostrando o efeito de dietas de controle e de teste sobre apoptose induzida por isquemia cerebral em ratos. As composições das dietas de controle e de teste são descritas no exemplo 1 (*p < 0,001 *versus* controle).

Figura 4. Gráfico mostrando a correlação entre o volume da lesão isquêmica (eixo X) e a porcentagem de células apoptóticas conforme definido por coloração TUNEL (eixo Y) em ratos submetidos a isquemia cerebral transitória. As composições das dietas de controle e de teste são descritas no Exemplo 1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES EXEMPLIFICATIVAS

DEFINIÇÕES

Vários termos relacionados aos métodos e similares aspectos da presente invenção são usados no relatório e reivindicações. Esses termos devem ser tomados em seu significado ordinário na técnica, a menos que indicado de outra forma. Outros termos especificamente definidos devem ser tomados de maneira consistente com a definição aqui apresentada.

As seguintes abreviações podem ser usadas no relatório e exemplos: AA, ácido araquidônico; ALA, ácido alfa-linoléico; ANOVA, análise de variância; DHA, ácido docosaexaenóico; DM, matéria seca; DPA, ácido docosapentaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico; LA, ácido linoléico; LC-PUFA, ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa; NORC, compostos libe-

radores de óxido nítrico; L-Arg, L-arginina.

No contexto deste relatório, o termo "cerca de" é interpretado como significando opcionalmente mais ou menos 20%; mais preferivelmente, opcionalmente mais ou menos 10%; ainda mais preferivelmente, opcionalmente mais ou menos 5%; o mais preferivelmente, opcionalmente mais ou menos 2%.

"Quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de um composto, material ou composição, conforme aqui descrita, que seja eficaz para atingir um resultado biológico particular. Esses resultados incluem, mas não se limitam a, aumento da integridade vascular ou redução da lesão cerebral isquêmica. Essa atividade eficaz pode ser conseguida, por exemplo, por administração das composições da presente invenção ao animal.

O termo "integridade vascular" refere-se à saúde global dos vasos sangüíneos em um animal, incluindo, sem limitação, tônus e estrutura vasculares saudáveis, crescimento vascular saudável, constrição e dilatação saudáveis, permeabilidade diminuída, proliferação diminuída, inflamação diminuída, adesão celular e/ou plaquetária diminuída, manutenção de pressão sangüínea e fluxo sangüíneo normais e similares. "Integridade vascular aumentada" refere-se qualquer melhora na saúde global dos vasos sangüíneos em um animal, conforme medida por qualquer meio adequado na técnica.

Conforme aqui usado, "ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa" ou "LCPUFA" refere-se a qualquer ácido monocarboxílico com pelo menos 20 átomos de carbono e pelo menos duas duplas ligações. Exemplos não limitativos de LCPUFA incluem ácidos graxos (n-6), como ácido araquidônico, e ácidos graxos (n-3), como ácido eicosapentaenóico, ácido docosapentaenóico e ácido docosaexaenóico.

Conforme aqui usado, "compostos liberadores de óxido nítrico" ou "NORC" refere-se a qualquer composto que cause a liberação de óxido nítrico livre em um animal. Exemplos preferidos desses compostos incluem L-arginina e análogos ou derivados de L-arginina, como arginina alfa-cetoglutarato, GEA 3175, nitroprusseto de sódio, trinitrato de glicerila, S-

niroso-N-acetil-penicilamina, nitroglicerina, S-NO-glutationa, fármacos antiinflamatórios não esteróides conjugados a NO, como NO-naproxen, NO-aspirina, NO-ibuprofen, NO-diclofenaco, NO-flurbiprofen e NO-cetoprofen, composto 7 liberador de NO, composto 5 liberador de NO, composto 12 liberador de NO, composto 18 liberador de NO, diolatos de diazênio e seus derivados, NONOato de dietilamina ou qualquer composto orgânico ou inorgânico, biomolécula ou seu análogo, homólogo, conjugado ou derivado que cause a liberação de óxido nítrico livre em um animal.

"Isquemia" refere-se a qualquer diminuição ou interrupção do suprimento sangüíneo para qualquer órgão, tecido ou parte do corpo, causada por qualquer constrição ou obstrução da vascularização. "Episódio isquêmico" refere-se a qualquer período transitório ou permanente de isquemia.

"Vascularização" refere-se a qualquer rede de vasos sangüíneos no corpo de um animal, os vasos sangüíneos incluindo, sem limitação, artérias, veias e capilares.

"Células endoteliais vasculares" ou "endotélio vascular" refere-se a células que compõem a camada de células finas e planas que revestem a superfície interna de vasos sangüíneos, formando uma interface entre o sangue circulante no lúmen e o restante da parede do vaso.

A presente invenção refere-se a qualquer animal, de preferência um mamífero, mais preferivelmente animais de companhia e, o mais preferivelmente, seres humanos. Um "animal de companhia" é qualquer animal domesticado e inclui, sem limitação, gatos, cães, coelhos, cobaias, furões, hamsters, camundongos, gerbos, cavalos, vacas, cabras, ovelhas, burros, porcos e similares.

Conforme aqui usado, o termo "ração para animais de estimação" ou "composição alimentar para animais de estimação" significa uma composição que se destine a ingestão por um animal e, de preferência, por animais de companhia. Uma "ração para animais de estimação completa e nutricionalmente balanceada" é uma que contenha todos os nutrientes requeridos conhecidos em quantidades e proporções apropriadas, com base

em recomendações de autoridades reconhecidas no campo da nutrição de animais de companhia e seja, portanto, capaz de servir de única fonte de ingestão dietética para manter a vida ou promover a nutrição, sem a adição de fontes nutricionais suplementares. Composições de ração para animais de estimação nutricionalmente balanceada são amplamente conhecidas e amplamente usadas na técnica.

Conforme aqui usado, um "suplemento dietético" é um produto que se destine a ser ingerido além da dieta normal de um animal.

Conforme aqui usado, um "produto alimentar formulado para consumo humano" é qualquer composição destinada a ingestão por um ser humano.

DESCRIÇÃO

Os inventores observaram que arginina suplementar em cães aumentava a expressão de múltiplos fatores de crescimento e proteínas anti-inflamatórias de maneira dependente da dose. Muitos desses fatores de crescimento, incluindo NFG, nIGF e BDNF, exercem efeitos protetores neuronais em potencial. (Mattson, MP et al. Neurobiol. Aging (2002) 23: 695-705, e Kruttgen, A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95: 9614-9619). Em investigações adicionais com cães, usando fontes naturais de arginina, incluindo farelo de arenque (contendo óleo de peixe rico em LCPUFA), os inventores descobriram uma resposta igual ou melhor do que a observada usando L-arginina pura. Conforme descrito em detalhes nos presentes exemplos, estudos funcionais de isquemia cerebral transitória em um modelo de rato ovariectomizado mostrou que uma dieta contendo uma combinação de L-arginina, óleo de peixe, antioxidantes e vitaminas B reduziu acentuadamente as lesões cerebrais e apoptose, mais do que dietas contendo apenas arginina ou óleo de peixe. Portanto, vários aspectos da presente invenção utilizam essas descobertas apresentando composições dietéticas e métodos para melhorar a integridade vascular de um animal e para reduzir a lesão isquêmica em um evento de isquemia em um animal, por exemplo, uma lesão cerebral no caso de uma isquemia cerebral no animal.

Espera-se que as composições dietéticas seja eficazes em vá-

rias situações isquêmicas, incluindo, mas não limitadas a, envelhecimento cerebral (acidentes e miniacidentes vasculares cerebrais) e transtornos relacionados, eventos cardíacos isquêmicos, isquemia induzida e cirurgia de reperfusão (administração pré- e pós-operatória), isquemia periférica induzida por diabetes e como uma alternativa pós-menopausa ao tratamento com estrogênio para reduzir os riscos de acidente vascular cerebral e doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.

Em várias modalidades, as composições e métodos da presente invenção se aplicam a uma abordagem de múltiplos componentes para melhorar a integridade vascular funcional, reduzir a apoptose e aumentar a sobrevivência celular após uma ocorrência isquêmica. Esses componentes incluem (1) aumento da integridade e função vascular, (2) aumento do reparo celular, (3) melhora dos efeitos antiinflamatórios, (4) otimização do metabolismo celular e (5) redução do estresse oxidativo.

COMPOSIÇÕES

Um aspecto da invenção apresenta composições compreendendo um ou mais ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) e um ou mais compostos liberadores de óxido nítrico (NORC), em uma quantidade eficaz para aumentar a integridade vascular em animais. Os LCPUFA e NORC podem estar presentes na composição como um ingrediente ou aditivo. Em modalidades preferidas da composição, os LCPUFA compreendem pelo menos um dentre os ácidos graxos (n-3), como ALA, EPA, DPA e DHA, e os NORC compreendem pelo menos um dentre L-Arg e seus derivados. As composições enriquecem o plasma sangüíneo com LCPUFA e NORC em animais aos quais a composição seja administrada.

As composições da invenção podem incluir inúmeros componentes adicionais com a finalidade de proporcionar uma abordagem de múltiplos componentes para promover a integridade vascular e aumentar a sobrevivência celular na isquemia, conforme acima indicado. Esses incluem antioxidantes, vitaminas B, fatores de crescimento e agentes antiinflamatórios.

Em uma modalidade preferida, as composições da invenção são composições de ração para animais de estimação. Essas incluem vantajo-

samente alimentos destinados a suprir as exigências dietéticas necessárias, assim como guloseimas (por exemplo, biscoitos) ou outros suplementos dietéticos. Opcionalmente, as composições de ração para animais de estimação podem ser uma composição seca (por exemplo, granulados), composição semi-úmida, composição molhada ou qualquer de suas misturas.

Em outra modalidade preferida, as composições da invenção são produtos alimentares formulados para consumo humano. Esses incluem vantajosamente alimentos e nutrientes destinados a suprir exigências dietéticas necessárias de um ser humano, assim como outros suplementos dietéticos humanos. Em uma modalidade detalhada, os produtos alimentares formulados para consumo humano são completos e nutricionalmente balanceados.

Em outra modalidade preferida, a composição é um suplemento dietético, como um molho, água potável, bebida, concentrado líquido, iogurte, pó, grânulo, pasta, suspensão, ração, petisco, guloseima, lanche, pélete, pílula, cápsula, comprimido ou qualquer outra forma de distribuição. Os suplementos dietéticos podem ser particularmente formulados para consumo por um animal particular, como um animal de companhia, ou um ser humano. Em uma modalidade detalhada, o suplemento dietético pode compreender uma elevada concentração de LCPUFA e NORC, de modo que o suplemento possa ser administrado ao animal em pequenas quantidades ou, alternativamente, possa ser diluída antes da administração a um animal. O suplemento dietético pode requerer misturação com água antes da administração ao animal.

A composição pode ser congelada. Os LCPUFA e NORC podem ser pré-misturados com os outros componentes da composição para fornecer as quantidades benéficas necessárias, podem ser revestidos sobre uma composição alimentar para animais de estimação, suplemento dietético ou produto alimentar formulado para consumo humano ou podem ser adicionados à composição antes de ser oferecida ao animal, por exemplo, usando-se um pó ou uma mistura.

As composições da invenção compreendem LCPUFA e NORC

em uma quantidade eficaz para aumentar a integridade vascular em um animal ao qual a composição tenha sido administrada. Para rações para animais de estimação e produtos alimentares para consumo humano, a quantidade de LCPUFA como porcentagem da composição está na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 13% da composição, com base na matéria seca, embora uma porcentagem maior possa ser suprida. Em várias modalidades, a quantidade é de cerca de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7%, 3,8%, 3,9%, 4,0%, 4,1%, 4,2%, 4,3%, 4,4%, 4,5%, 4,6%, 4,7%, 4,8%, 4,9%, 5,0% ou mais, por exemplo, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13% ou mais, da composição com base na matéria seca, e a quantidade de NORC como uma porcentagem da composição está na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 12% da composição com base na matéria seca, embora uma porcentagem maior possa ser suprida. Em várias modalidades, a quantidade é de cerca de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,3%, 2,4%, 2,5%, 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9%, 3,0%, 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7%, 3,8%, 3,9%, 4,0%, 4,1%, 4,2%, 4,3%, 4,4%, 4,5%, 4,6%, 4,7%, 4,8%, 4,9%, 5,0% ou mais, por exemplo, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12% ou mais, da composição com base na matéria seca. Em uma modalidade específica, utilizam-se 2 – 2,5% de LCPUFA e 2 – 2,5% de L-arginina pura. Os suplementos dietéticos podem ser formulados para conter concentrações várias vezes maiores de LCPUFA e NORC, para poderem ser administrados a um animal na forma de um comprimido, cápsula, concentrado líquido ou outra forma de dosagem similar, ou para ser diluídos antes das administrações, como por diluição em água, pulverização ou borrifamento sobre uma ração para animais de estimação, e similares modos similares de administração.

Em uma modalidade alternativa, a quantidade de LCPUFA e NORC na composição é função da quantidade requerida para estabelecer uma concentração específica de LCPUFA e NORC no soro sangüíneo do

animal. A concentração especificada de LCPUFA no soro sangüíneo pode ser calculada por determinação dos níveis séricos sangüíneos de animais alimentados com as quantidades recomendadas de LCPUFA e NORC acima especificadas, conforme seria percebido por aqueles versados na técnica.

As fontes de cada um dos LCPUFA pode ser qualquer fonte adequada, sintética ou natural. Fontes preferidas de LCPUFA incluem, sem limitação, prímula, legumes verde escuros, como espinafre, algas e algas azul-verdes, como espirulina, sementes e óleos vegetais, como linhaça, canola, soja, nogueira, abóbora, açafroa, gergelim, germe de trigo, girassol, milho e cânhamo, e peixes, particularmente peixes de água fria, como salmão, atum, cavala, arenque, perca, perca listrada, tubarão, hipoglosso, bagre, sardinha, camarão e mexilhões, e seus óleos extraídos, ou os LCPUFA podem ser sintetizados de novo de acordo com qualquer meio adequado na técnica.

As fontes de cada NORC podem ser qualquer fonte adequada, sintética ou natural. Fontes preferidas de arginina incluem, sem limitação, proteínas animais e vegetais. Exemplos não limitativos de plantas particularmente ricas em teor de arginina incluem leguminosas, como soja, tremoços e alfarroba, grãos, como trigo e arroz, e frutas, como uvas. Sementes e nozes, como cacau e amendoins, também são ricas em teor de arginina. Exemplos não limitativos de proteínas animais particularmente ricas em teor de arginina incluem produtos de aves e peixes. Os NORC podem ser sintetizados de novo, de acordo com qualquer meio adequado na técnica, ou fornecido por uma fonte comercial.

As composições da invenção podem opcionalmente compreender substâncias suplementares, como minerais, vitaminas, sais, condimentos, corantes e conservantes. Exemplos não limitativos de minerais suplementares incluem cálcio, fósforo, potássio, sódio, ferro, cloreto, boro, cobre, zinco, magnésio, manganês, iodo, selênio e similares. Exemplos não limitativos de vitaminas suplementares incluem vitamina A, várias vitaminas B, vitamina C, vitamina D, vitamina E e vitamina K. Suplementos dietéticos adicionais também podem ser incluídos, por exemplo, niacina, ácido pantotêni-

co, inulina, ácido fólico, biotina, aminoácidos e similares.

As composições da invenção podem opcionalmente compreender uma ou mais substâncias suplementares que promovam ou mantenham a saúde vascular, ou aumentem ainda mais a integridade vascular ou sobrevivência celular. Essas substâncias incluem, sem limitação, uma ou mais dentre vinpocetina, coenzima Q_{10}, fosfatidilserina, acetil-L-carnitina, ácidos alfa-lipóicos, extratos, como de mirtilo (Vaccinium myrtilis), ou antioxidantes, incluindo tocoferóis, tocotrienóis, carotenóides, como alfa- e beta-caroteno, licopeno, luteína, astaxantina, zeaxantina e flavonóides, como flavanóis, flavanonas, flavonas, flavan-3-óis (catequinas), antocianinas e isoflavonas (isoflavonóides) e similares, assim como agentes antiinflamatórios e fatores de crescimento (particularmente aplicáveis à promoção da sobrevivência celular), conforme seria entendido por aqueles versados na técnica.

Em várias modalidades, rações para animais de estimação ou composições de suplemento dietético da invenção podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 15% a cerca de 50% de proteína bruta, em peso da composição. O material de proteína bruta pode compreender proteínas vegetais, como de soja, semente de algodão e amendoim, ou proteínas animais, como caseína, albumina e proteína de carne. Exemplos não limitativos de proteína de carne utilizáveis incluem carne de porco, cordeiro, cavalo, aves, peixes e suas misturas.

As composições também podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 5% a cerca de 40% de gordura, em peso da composição. As composições também podem compreender uma fonte de carboidratos. As composições podem compreender, com base na matéria seca, de cerca de 15% a cerca de 60% de carboidratos, em peso da composição. Exemplos não limitativos desses carboidratos incluem grãos ou cereais, como arroz, milho, sorgo, alfafa, cevada, soja, canola, aveia, trigo e suas misturas. As composições também podem opcionalmente compreender outros materiais, como soro de leite seco e similares subprodutos de laticínios.

As composições também podem compreender pelo menos uma fonte de fibras. Várias fibras solúveis ou insolúveis podem ser utilizadas,

conforme é sabido por aqueles versados na técnica. A fonte de fibras pode ser polpa de beterraba, goma-arábica, goma talha, psílio, farelo de arroz, goma de alfarroba, polpa de cítricos, pectina, frutooligossacarídeo adicional à oligofrutose de cadeia curta, mananoligofrutose, fibra de soja, fibra de tremoços, arabinogalactano, galactooligossacarídeo, arabinoxilano e suas misturas. Alternativamente, a fonte de fibras pode ser uma fibra fermetável. Fibras fermentáveis foram anteriormente descritas como capazes de conferir benefícios ao sistema imune de um animal de companhia. Fibras fermetáveis ou outras composições conhecidas por aqueles versados na técnica, que forneçam uma composição pré-biótica para intensificar o crescimento de microorganismos pró-bióticos dentro do intestino, também podem ser incorporadas à composição para ajudar a aumentar os benefícios conferidos pela presente invenção ao sistema imune de um animal. Além disso, microorganismos pró-bióticos, como espécies de Lactobacillus ou Bifidobacterium, por exemplo, podem ser adicionados à composição.

Em uma modalidade detalhada, a composição é uma ração para animais de estimação completa e nutricionalmente balanceada. Nesse contexto, a ração para animais de estimação pode ser uma ração molhada, uma ração seca ou uma ração de teor de umidade intermediário, conforme seria reconhecido por aqueles versados na técnica de formulação e fabricação de rações para animais de estimação. "Ração molhada" descreve ração para animais de estimação que é tipicamente vendida em latas ou bolsas de papel de alumínio e tem um teor de umidade tipicamente na faixa de cerca de 70% a cerca de 90%. "Ração seca" descreve ração para animais de estimação que é de composição similar a uma ração molhada, mas que contém um teor limitado de umidade, tipicamente na faixa de cerca de 5% a cerca de 15% e, conseqüentemente, é apresentada, por exemplo, como pequenos grânulos do tipo biscoito. As composições e suplementos dietéticos podem ser particularmente formulados para animais adultos, ou para animais mais velhos ou mais jovens, por exemplo, uma formulação de "ração para filhotes", "ração para filhotes de gatos" ou "sênior". Em geral, formulações especializadas compreendem as exigências energéticas e nutricionais apropria-

das para animais em diferentes estágios de desenvolvimento ou idade.

Certos aspectos da invenção são, de preferência, usados em combinação com uma ração completa e balanceada (por exemplo, conforme descrito no Conselho Nacional de Pesquisa, 1985, Exigências Nutricionais Para Cães, National Academy Press, Washington D.C., ou Associação de Oficiais Americanos de Controle de Rações, Publicação Oficial, 1996). Isto é, composições compreendendo LCPUFA, ou DHA de acordo com certos aspectos desta invenção, são usadas, de preferência, com uma ração comercial de alta qualidade. Conforme aqui usado, "ração comercial de alta qualidade" refere-se a uma dieta fabricada para produzir a digestão de nutrientes chave de 80% ou mais, conforme exposto, por exemplo, nas recomendações do Conselho Nacional de Pesquisa acima, para cães. Elevados padrões de nutrientes similares seriam usados para outros animais.

Aqueles versados na técnica entenderão como determinar a quantidade apropriada de LCPUFA e NORC a ser adicionada a uma dada composição. Esses fatores que podem ser levados em consideração incluem o tipo de composição (por exemplo, composição de ração para animais de estimação, suplemento dietético ou produto alimentar formulado para consumo humano), o consumo médio de tipos específicos de composições por diferentes animais e as condições de fabricação sob as quais a composição é preparada. De preferência, as concentrações de LCPUFA e NORC a serem adicionadas à composição são calculadas com base nas exigências energéticas e nutricionais do animal. De acordo com certos aspectos da invenção, os LCPUFA e NORC podem ser adicionados a qualquer momento durante a fabricação e/ou processamento da composição. Isso inclui, sem limitação, como parte da formulação da composição de ração para animais de estimação, suplemento dietético ou produto alimentar formulado para consumo humano, ou como um revestimento aplicado à composição de ração para animais de estimação, suplemento dietético ou produto alimentar formulado para consumo humano.

As composições podem ser preparadas de acordo com qualquer método adequado na técnica como, por exemplo, aquele descrito no Livro

Waltham de Nutrição de Cães e Gatos, Ed. ATB Edney, capítulo de A. Rainbird, intitulado "Uma Dieta Balanceada", nas páginas 57 a 74, Pergamon Press Oxford.

MÉTODOS

Outro aspecto da invenção apresenta métodos para aumentar a integridade vascular e/ou promover a sobrevivência celular em um animal, compreendendo a administração ao animal de uma composição compreendendo um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, em um quantidade eficaz para aumentar a integridade vascular e/ou promover a sobrevivência celular no animal. Ainda outro aspecto da invenção apresenta métodos profiláticos para reduzir a lesão induzida por isquemia ao cérebro ou outros tecidos de um animal, compreendendo a administração ao animal, em bases regulares, de uma composição compreendendo um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, em uma quantidade eficaz para reduzir a lesão induzida por isquemia, por exemplo, ao cérebro, no caso de um episódio isquêmico no animal, por exemplo, no cérebro do animal.

Em modalidades detalhadas de qualquer um dos dois aspectos acima mencionados da invenção, a composição é uma composição de ração para animais de estimação, suplemento dietético ou produto alimentar formulado para consumo humano, conforme aqui exemplificado. Em uma modalidade detalhada adicional, o LCPUFA é um ou mais LCPUFA (n-3), incluindo, mas não limitados a, EPA, DPA e DHA, e o NORC é um ou mais dentre L-Arg e seus derivados. Os animais podem incluir qualquer animal domesticado ou de companhia, conforme acima descrito, ou podem incluir seres humanos. Em certas modalidades, o animal é um animal de companhia, como um cão ou gato. Em outra modalidade, o animal é um ser humano.

As composições podem ser administradas ao animal por qualquer uma de várias vias de administração alternativas. Essas vias incluem, sem limitação, oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, intragástrica, transpilórica, subcutânea, retal e outras. De preferência, as composições são administradas por via oral. Conforme aqui usado, o termo "administração oral" ou "administrar por via oral" significa que o animal ingere ou um ser

humano é orientado para alimentar, ou alimenta, o animal com uma ou mais das composições da invenção aqui descritas.

Quando o ser humano é orientado a alimentar a composição, essa orientação pode ser uma que instrua e/ou informe o ser humano de que o uso da composição pode conferir e/ou conferirá os benefícios mencionados, por exemplo, aumento da integridade vascular no animal ou sobrevivência celular no animal, prevenção ou retardamento do envelhecimento cerebral ou de episódios isquêmicos, redução da lesão induzida por isquemia, por exemplo, no cérebro, coração ou outros tecidos, proteção contra danos relacionados a isquemia no caso de um episódio isquêmico, por exemplo, em cirurgia de reperfusão, isquemia periférica induzida por diabetes e similares, conforme acima elaborados. Essa orientação pode ser uma orientação oral (por exemplo, mediante uma forma de instrução oral, por exemplo, um médico, veterinário ou outro profissional de saúde), ou por meio de rádio ou televisão (isto é, propaganda), ou direção escrita (por exemplo, mediante direção escrita de, por exemplo, um médico, veterinário ou outro profissional de saúde (por exemplo, receitas)), profissionais ou organizações de vendas (por exemplo, mediante brochuras de marketing, panfletos ou outros instrumentos de instrução), meios escritos (por exemplo, internet, correio eletrônico ou outros meios relacioandos a computadores) e/ou embalagens associadas à composição (por exemplo, um rótulo presente em um recipiente com a composição).

A administração pode ser à base de quando necessário ou quando desejado, por exemplo, uma vez por mês, uma vez por semana, diariamente ou mais de uma vez ao dia. Da mesma forma, a administração pode ser em dias, semanas ou meses alternados, a cada três dias, semanas ou meses, a cada quatro dias, semanas ou meses ou similar. A administração pode ser de múltiplas vezes ao dia. Quando utilizada como um suplemento para exigências dietéticas ordinárias, a composição pode ser administrada diretamente ao animal ou de outra forma posta em contato ou misturada com a ração ou alimento diário. Quando utilizada como uma ração ou alimento diário, a administração é bem conhecida por aqueles versados na

técnica.

A administração também pode ser realizada em bases regulares, por exemplo, como parte de um regime de dieta para o animal. Um regime de dieta pode compreender a ingestão regular pelo animal de uma composição compreendendo um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, em uma quantidade eficaz para aumentar a integridade vascular ou reduzir a lesão induzida por isquemia ao cérebro no caso de um episódio isquêmico no animal. A ingestão regular pode ser de uma vez ao dia, ou duas, três, quatro ou mais vezes ao dia, em bases diárias ou semanas. Da mesma forma, a administração regular pode ser em dias ou semanas alternadas, a cada três dias ou semanas, a cada quatro dias ou semanas, a cada cinco dias ou semanas ou a cada seis dias ou semanas, e, nesse regime de dieta, a administração pode ser de múltiplas vezes ao dia. A finalidade da administração regular é a de fornecer ao animal a dose diária preferida de LCPUFA e NORC, conforme aqui exemplificado.

De acordo com os métodos da invenção, a administração das composições compreendendo um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, incluindo a administração como parte de um regime de dieta, pode durar um período de tempo que varia da gestação e por toda a vida do animal.

Os exemplos a seguir são apresentados para descrever a invenção em maiores detalhes. Destinam-se a ilustrar, não limitar, a invenção.

EXEMPLO 1

Efeito de 17 β-estradiol ou suplementação dietética com arginina, óleo de peixe ou combinação sobre danos cerebrais por isquemia cerebral transitória no modelo de rato ovariectomizado

O tratamento crônico com 17 β-estradiol (E2) foi comparado com três dietas de teste contendo arginina, LCPUFA na forma de óleo de peixe, ou uma combinação desses, respectivamente, quanto a seus efeitos sobre os danos cerebrais causados por isquemia cerebral transitória em um modelo de rato ovariectomizado.

MÉTODOS

Animais. Ratos fêmeas Charles Rivers Sprague-Dawley (250 g,

Wilmington, MA) foram aclimatadas em instalações para animais três dias antes da cirurgia com um ciclo de claro-escuro de 12 horas. A ovariectomia bilateral foi realizada 2 semanas antes de começar a alimentação com a dieta. Quatro semanas depois do início da alimentação com a dieta, realizou-se a oclusão transitória da artéria cerebral média (tMCA), após injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg).

Dieta e Administração de Hormônio. Quatorze a quinze ratas por grupo foram aleatoriamente distribuídas em um de cinco grupos de tratamento. Esses grupos foram os seguintes:

Grupo 1: dieta de controle (Dieta Branca)

Grupo 2: dieta de controle + implante de SILASTIC® estradiol durante 1 semana (Branca + E2)

Grupo 3: dieta I (Dieta Rosa)

Grupo 4: Dieta II (Dieta Roxa)

Grupo 5: Dieta III (Dieta Cinza)

A dieta de controle era uma dieta padrão de ratos contendo 140 g/kg de caseína, 100 g/kg de sacarose, 50 g/kg de fibras, 155 g/kg de dextrina, 466 g/kg de amido de milho, 35 g/kg de mistura de sais padrão, 40 g/kg de óleo de soja, 10 g/kg de mistura de vitaminas padrão, 1,8 g/kg de L-cisteína e 2,5 g/kg de cloreto de colina. Todas as três dietas de teste (Dietas I, II e III) foram suplementadas com (1) vitaminas B adicionais, incluindo 45 mg/kg de ácido nicotínico,35 mg/kg de pantetonato, 24 mg/kg de piridoxina, 15 mg/kg de tiamina, 9 mg/kg de riboflavina, 3 mg/kg de ácido fólico, 0,8 mg/kg de biotina e 0,225 mg/kg de vitamina B12, e (2) um coquetel antioxidante compreendendo 500 mg/kg de vitamina E, 150 mg/kg de vitamina C, 100 mg/kg de astaxantina e 0,4 mg/kg de selênio. A Dieta I também incluía 2% de arginina (20 g/kg). A Dieta II também incluía 2% de arginina e 2% de óleo do peixe savelha (20 g/kg). A Dieta III também incluía 2% de óleo do peixe savelha.

Todas as dietas foram dadas à vontade às ratas durante quatro semanas. Mudanças no alimento ocorreram uma vez por semana. Também uma vez por semana foram determinados os pesos corporais e ingestão de

alimentos. Uma semana antes da indução de uma oclusão de tMCA, as ratas do Grupo 2 receberam a administração de E2 a uma dose de 4 mg/mL em um pélete de SILASTIC® que foi implantada subcutaneamente. Esse procedimento foi usado para proteger o cérebro de vários insultos e produz um nível fisiologicamente relevante de E2 sérico (Simpkins et al., 1997; Jung et al., 2003). Esse foi um controle positivo, pois foi anteriormente demonstrado que essa dose e momento de tratamento com E2 resultavam na proteção contra efeitos da oclusão da tMCA (Simpkins, et al., 1997; Yang et al., 2004a, Yang et al., 2004b).

Oclusão da artéria cerebral média e preparação das amostras. Os animais foram anesteziados por uma injeção intraperitoneal de cetamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A oclusão da tMCA foi realizada conforme anteriormente descrito (Simpkins et al., 1997) com ligeiras modificações. Resumidamente, a artéria carótida comum esquerda, a artéria carótida externa e a artéria carótida interna foram expostas mediante uma incisão cervical na linha média. Uma sutura de monofilamento 3.0 foi introduzida no lúmen da artéria carótida interna e suavemente avançada até se sentir resistência. O procedimento cirúrgico foi realizado em 20 minutos, com sangramento mínimo. A sutura foi mantida no lugar durante 60 minutos e, então, retirada para permitir reperfusão. A temperatura retal foi monitorizada e mantida entre 36,5 e 37ºC, com uma almofada de aquecimento durante todo o procedimento. 24 horas após o início da reperfusão, os animais foram sacrificados, e os cérebros foram removidos. Os cérebros foram, então, dissecados coronalmente em seções de 2 mm, usando-se uma matriz de cérebro metálica (ASI Instruments Inc.; Warren, MI) e tingidas por incubação em uma solução a 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em salina fisiológica a 37ºC e, então, fixadas em formalina a 10%.

A análise de fragmentação de DNA com oclusão de MCA por Marcação de Extremidade de Entalhe dUTP mediada por TdT (TUNEL) é um modelo de acidente vascular isquêmico focal amplamente usado (Bederson et al., 1986). Esse modelo in vivo para morte neuronal pode induzir rapidamente um processo apoptótico sincronizado em um grande número de neu-

rônios e outras células (Li et al., 1997). Os efeitos da isquemia transitória sobre a apoptose foram, portanto, examinados por análise de fragmento de DNA com o ensaio TUNEL. A coloração TUNEL foi realizada de acordo com as instruções do fabricante modificadas (Gavrieli et al., 1992). Seções de tecido fixadas com formalina e incrustadas em parafina foram desparafinizadas com xileno, reidratadas mediante tratamento com etanol graduado e submetidas a uma lavagem final em PBS. As seções foram pós-fixadas em paraformaldeído a 4% durante 20 minutos. As seções foram, então, lavadas e tratadas durante 15 minutos com 100 µg/mL de proteinase K em PBS, equilibradas com tampão de equilibração durante 10 min e, então, incubadas com tampão contendo enxima TdT e dUTP marcado com FITC (Promega, Madison, WI) a 37ºC em uma câmara umidificada. A reação foi terminada por incubação em 2 x tampão SSC durante 15 minutos à temperatura ambiente. As seções foram, então, montadas com reagentes antiapagamento contendo DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR). Seções de controle positivo foram mergulhadas em solução de DNase I durante 10 min à temperatura ambiente, antes da equilibração em tampão TdT. As seções foram observadas sob um microscópio fluorescente com pares de filtros de excitação/emissão apropriados.

Alguns animais foram eliminados do estudo durante o protocolo. O número de animais quantificados quanto ao volume da lesão variou de 12 a 15 por grupo.

Métodos estatísticos. Os resultados foram analisados com análise unidirecional de variância (ANOVA) usando-se o software Prism (Graphpad Inc.; San Diego, CA). A significância de diferenças entre grupos foi determinada por ANOVA unidirecional seguida por testes de comparações múltiplas de Tukey. Todos os valores são expressos como média ± EPM.

RESULTADOS:

Volume do acidente vascular cerebral. Todas as quatroc ondições experimentais (estradiol e Dietas I, II e III) reduziram o tamanho do infarto (Figura 1). O tratamento com estradiol (Grupo 2) reduziu o volume do infarto em 68%, um valor típico de uma proteção com estrogênio contra da-

nos por acidente vascular cerebral (Simpkins et al., 1997; Fan et al., 2003; Yang et al., 2004a; Yang et al., 2004b). Da mesma forma, a Dieta II reduziu significativamente o volume do infarto em 67%. As duas outras dietas testadas também reduziram os volumes médios do infarto, mas os dados foram variáveis demais para que os valores fossem estatisticamente significativos.

Na medida em que cada grupo tinha ratas sem nenhuma lesão observável (valor de 0 em nossos cálculos de volume de lesão), os dados foram avaliados depois que esses valores foram omitidos, para determinação a extensão em que os valores 0 contribuíram para diferenças de grupos. Conforme mostrado na Figura 2, os mesmos dois grupos foram significativamente menores do que o grupo de dieta de controle com essa modificação nos dados. Assim, as diferenças entre grupos foram determinadas pelo animal em que as lesões foram observadas, assim como pelo número de animais sem lesões observáveis. Os efeitos protetores tanto do tratamento com estrogênio, quanto com as dietas foram exercidos principalmente no córtex, uma área do cérebro chamada de penumbra, pois se acredita que seja "salvável" em acidentes vasculares cerebrais experimentais. Isso contrasta com os gânglios basais, chamados de núcleo do infarto, que não são prontamente salvos por nenhum tratamento até agora testado em acidentes vasculares cerebrais experimentais.

Apoptose. A avaliação de apoptose usando contra coloração TUNEL foi conduzida para determinar as conseqüências do tratamento com estradiol e as três dietas de teste sobre a resposta apoptótica à isquemia experimental. Três regiões do cérebro para colocação TUNEL foram avaliadas em todos os animais que completaram o estudo. TUNEL foi avaliado no núcleo do córtex cerebral, na penumbra do córtex cerebral e no núcleo do subcórtex, com base em nossa avaliação de regiões lesadas do cérebro usando coloração TTC (Wen et al., 2004). O número de células TUNEL positivas foi normalizado para o número total de células no campo usando coloração contra nuclear DAPI. As seções de todas as três regiões do cérebro foram contadas, e suas contagens médias de células para cada animal foram usadas para gerar as médias do grupo. As contagens de células foram con-

duzidas em campos microscópicos aleatoriamente selecionados (seções quadradas de 320 μm) em fatias a partir da extensão máxima do infarto cerebral, conforme determinado por coloração TTC. A coloração TUNEL era extensa em todas as três regiões cerebrais nos animais de controle. Quando se fez uma comparação de todos os cinco grupos de tratamento, a coloração TUNEL em cada cérebro se correlacionou com os resultados encontrados usando-se coloração TTC para quantificar o volume da lesão (Figura 3). Isto é, houve uma redução substancial na coloração TUNEL tanto nos animais tratados com E2, quanto nos animais alimentados com a Dieta II. Animais alimentados com as Dietas I e III ficaram entre os animais de controle e o da Dieta II. Essa correlação entre a coloração TTC e a coloração TUNEL é representada na Figura 4. A caracterização dos efeitos dos hormônios e dietas sobre a coloração TUNEL indica que uma parte substancial da proteção por E2 e Dieta II contra morte celular é mediada por uma inibição da apoptose.

CONCLUSÕES:

Todas as três dietas de teste reduziram o volume de infarto médio, assim como as contagens de células TUNEL positivas, e a Dieta II reduziu esses parâmetros ao nível observado com um neuroprotetor conhecido, o estradiol.

A presente invenção não se limita às modalidades descritas e exemplificadas acima, mas é capaz de variação e modificação dentro do âmbito das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) e um ou mais compostos liberadores de óxido nítrico (NORC), em uma quantidade eficaz para tratar, adiar ou prevenir em um animal, um ou mais de (1) demência, (2) envelhecimento cerebral, (3) disfunção cognitiva, (4) doença cardiovascular,(5) acidente vascular celebral, ou (6) doença de Alzheimer.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a demência é demência vascular.

3. Uso de uma composição que compreende um ou mais ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) e um ou mais compostos liberadores de óxido nítrico (NORC), caracterizado pelo fato de ser na produção de um medicamento, para tratar, adiar ou prevenir em um animal um ou mais de(1) demência, (2) envelhecimento cerebral, (3) disfunção cognitiva, (4) doença cardiovascular, (5) acidente vascular celebral, ou (6) doença de Alzheimer.

4. Uso de uma composição que compreende um ou mais ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) e um ou mais compostos liberadores de óxido nítrico (NORC), caracterizado pelo fato de ser na produção de um medicamento para imitar um ou mais efeitos benéficos da terapia de reposição hormonal em um animal pós-menopausa.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o efeito benéfico da terapia de reposição hormonal inclui proteção contra derrame e proteção contra doença cardiovascular.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos um antioxidante, uma vitamina B, um fator de crescimento, um agente antiinflamatório, ou qualquer combinação dos mesmos.

7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ou mais antioxidantes e uma ou mais vitaminas B.

8. Uso de um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, caracteri-

zado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento ou medicamentos para co-administração para reduzir as lesões cerebrais no caso de um episódio isquêmico no cérebro.

9. Uso de um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento ou medicamentos, para co-administração para retardar o envelhecimento cerebral em um animal.

10. Uso de um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento ou medicamentos para co-administração para reduzir a apoptose celular no local de uma isquemia em um animal.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a isquemia ocorre em um tecido selecionado dentre cérebro, coração e rins.

12. Uso de um ou mais LCPUFA e um ou mais NORC, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento ou medicamentos para co-administração para reduzir lesões cerebrais induzidas por isquemia em um animal.

13. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que o medicamento é uma composição de ração para animais de estimação, suplemento dietético ou um produto alimentar formulado para consumo humano.

14. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que os LCPUFA incluem pelo menos um de ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, ácido docosapentaenóico ou ácido docosaexaenóico.

15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que os NORC incluem pelo menos um de L-arginina e derivados da mesma.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que os LCPUFA estão em uma quantidade de pelo menos cerca de 0,1% a cerca de 13% em peso da formulação, e a L-arginina está em uma

quantidade de pelo menos cerca de 0,1% a cerca de 12% em peso da formulação.

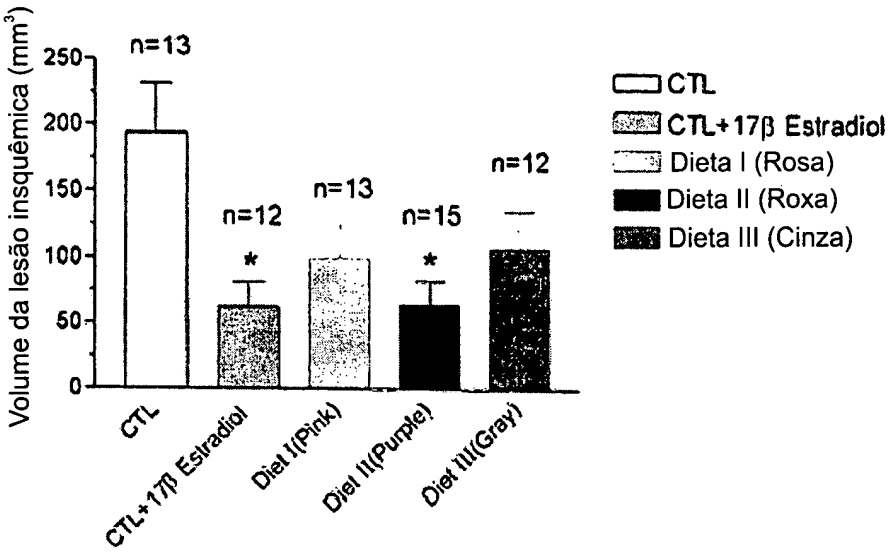

Volume da lesão insquêmica (mm3)
250
200
150
100
50
0
n=13
n=12
n=13
n=15
n=12
*
*
CTL
CTL+17β Estradiol
Diet I(Pink)
Diet II(Purple)
Diet III(Gray)
CTL
CTL+17β Estradiol
Dieta I (Rosa)
Dieta II (Roxa)
Dieta III (Cinza)

Fig.1

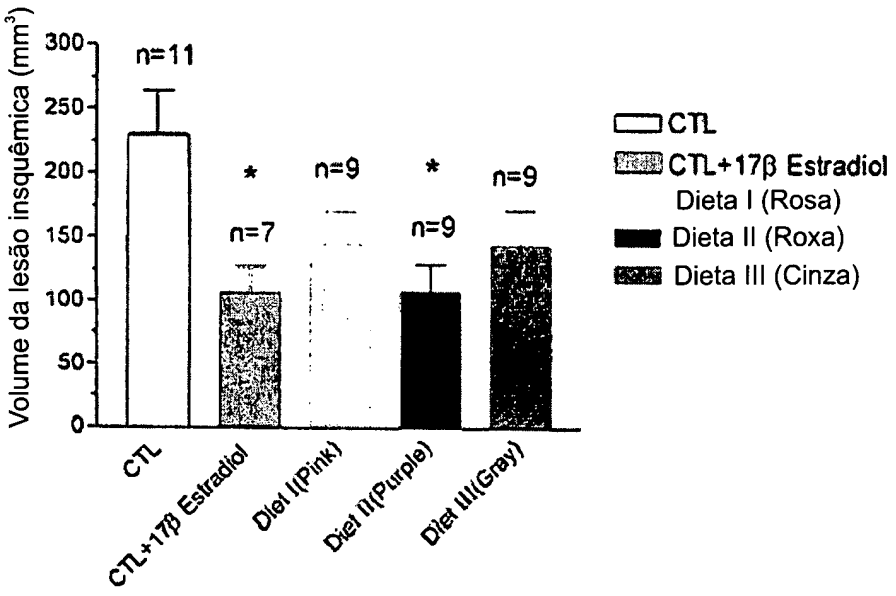

Volume da lesão insquêmica (mm3)
300
250
200
150
100
50
0
n=11
*
n=7
n=9
*
n=9
n=9
CTL
CTL+17β Estradiol
Diet I(Pink)
Diet II(Purple)
Diet III(Gray)
CTL
CTL+17β Estradiol
Dieta I (Rosa)
Dieta II (Roxa)
Dieta III (Cinza)

Fig.2

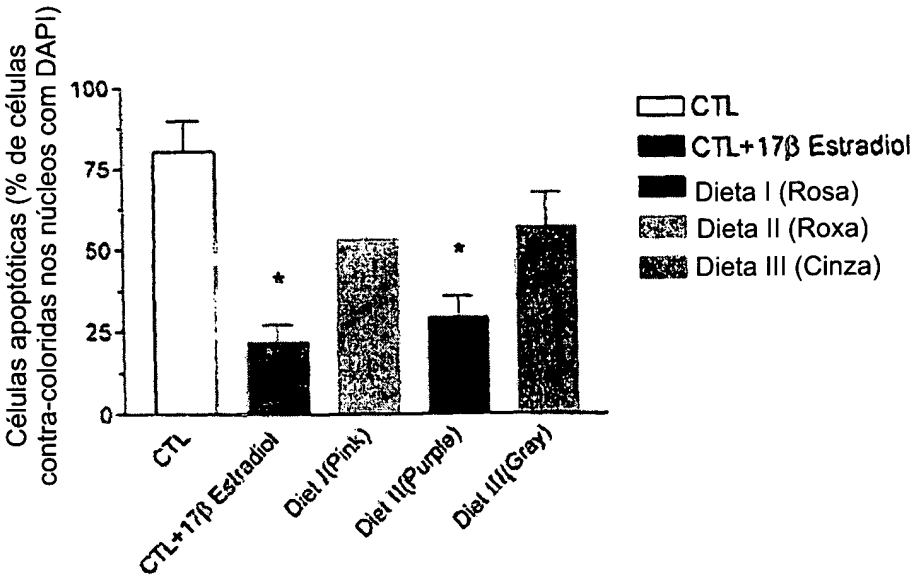

Células apoptóticas (% de células contra-coloridas nos núcleos com DAPI)
100
75
50
25
0
*
*
CTL
CTL+17β Estradiol
Diet I(Pink)
Diet II(Purple)
Diet III(Gray)
CTL
CTL+17β Estradiol
Dieta I (Rosa)
Dieta II (Roxa)
Dieta III (Cinza)

Fig.3

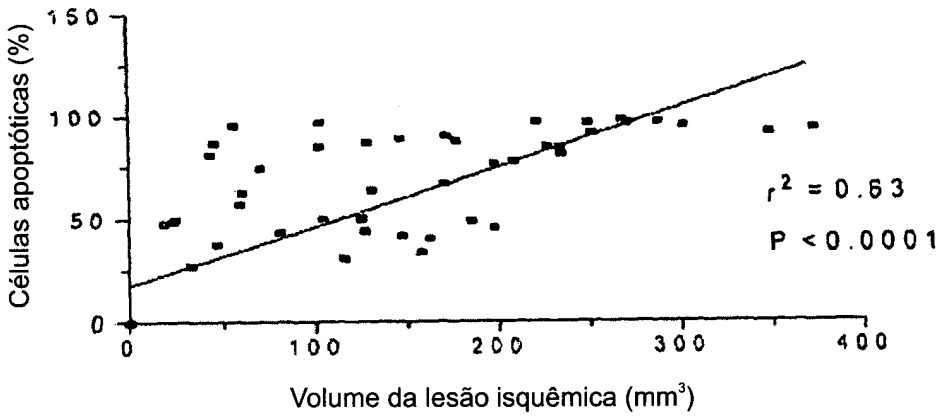

Células apoptóticas (%)
150
100
50
0
0
100
200
300
400
$r^2 = 0.63$
P < 0.0001
Volume da lesão isquêmica (mm^3)

Fig.4

PI 0615381-0

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MELHORAR A INTEGRIDADE VASCULAR FUNCIONAL, A SOBREVIVÊNCIA CELULAR E REDUZIR A APOPTOSE NA ISQUEMIA OU APÓS UM EPISÓDIO ISQUÊMICO NO CÉREBRO".**

A presente invenção refere-se a composições e métodos para aumentar a integridade vascular em animais. As composições e métodos, que utilizam ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e compostos liberadores de óxido nítrico, também são eficazes para reduzir lesões cerebrais induzidas por isquemia em um animal.