

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 255**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/122** (2006.01)

**A61K 31/353** (2006.01)

**A61K 31/355** (2006.01)

**A61K 31/385** (2006.01)

**A61K 31/4415** (2006.01)

**A61P 39/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011 PCT/EP2011/053680**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11110661**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11713715 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2544675**

54 Título: **Composiciones antioxidantes para reducir el estrés oxidativo atribuible al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales**

30 Prioridad:

**12.03.2010 EP 10425067**

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

**21.10.2016**

73 Titular/es:

**COR.CON. INTERNATIONAL S.R.L. (100.0%)  
Strada Langhirano, 264/1A  
43124 Parma, IT**

72 Inventor/es:

**CORNELLI, UMBERTO**

74 Agente/Representante:

**RUO , Alessandro**

ES 2 587 255 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones antioxidantes para reducir el estrés oxidativo atribuible al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales

5

**Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a una composición antioxidante como se describe en las reivindicaciones 1-15 para reducir el estrés oxidativo en sujetos sometidos a tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales. Esta composición ha resultado ser particularmente adecuada porque, además de ser sorprendentemente eficaz, se tolera sumamente bien por el cuerpo.

10

**Estado de la técnica**

**[0002]** En los años 50 se descubrió que la progesterona inhibe la ovulación y que el problema de controlar los embarazos presentaba aspectos muy complejos y delicados, ya que se observaban efectos secundarios con el tiempo tales como fenómenos trombóticos, el desarrollo de ciertos tipos de tumores (es decir, de mama), así como, a la inversa, una reducción en otros tipos de tumores (es decir, de colon, rectal, de ovario). Un factor debatido durante mucho tiempo y finalmente demostrado es la presencia de estrés oxidativo (EO) cuando se usa un tratamiento anticonceptivo (TA) [1, 2]. El EO realmente puede promover la aparición de enfermedades cardiovasculares y episodios trombóticos y también está presente cuando se usan bajas dosificaciones de estrógenos-progestina, y parece estar muy relacionado con el propio tratamiento anticonceptivo.

15

20

**[0003]** Aunque las razones de estos acontecimientos aún no se han esclarecido completamente, se mantiene el principio de conseguir el mejor compromiso entre una baja dosificación y la eficacia.

25

**[0004]** En efecto, los intentos de optimizar la relación beneficio/riesgo han variado desde altas dosificaciones de progestina a combinaciones de estrógenos con progestinas de diversos tipos.

**[0005]** En este sentido, se conocen sistemas de liberación transdérmica, sistemas de liberación intrauterina (DIU, dispositivo intrauterino) y sistemas con depósitos subcutáneos o intramusculares. En general, los diversos tipos de anticonceptivos disponibles actualmente se recetan basándose en el estado de salud y los hábitos del estilo de vida (tales como el hábito de fumar).

30

**[0006]** Sin embargo, incluso en el caso de mujeres sanas, se ha detectado un aumento en los fenómenos de oxidación durante el ciclo menstrual que, aunque no alcanzan niveles tales como para clasificarse como EO, indican un aumento en los fenómenos oxidativos en la fase de maduración del óvulo (fase estrogénica) y en la fase posterior de su posible implantación (fase de progesterona).

35

**[0007]** Para comprender las implicaciones subyacentes a la aparición de EO, se examinan con detalle los aspectos hormonales del ciclo menstrual.

40

*Aspectos hormonales relacionados con el ciclo menstrual normal*

**[0008]** Las hormonas esteroideas relacionadas con la función reproductora de las mujeres están reguladas por un mecanismo central localizado en el núcleo arcuato del hipotálamo y el lóbulo anterior de la glándula pituitaria, cuyas neuronas están conectadas con las glándulas suprarrenales, el útero y los ovarios.

45

**[0009]** En resumen [3], las neuronas del núcleo arcuato liberan GnRH (hormona de liberación de gonadotropina) cada hora de una manera cronometrada bajo estímulos noradrenérgicos; por el contrario, las neuronas opioides, dopaminérgicas y gabaérgicas mantienen dichas neuronas en un estado inhibitorio.

50

**[0010]** Por lo tanto, es evidente que es el equilibrio entre estos "activadores" lo que crea el estímulo vectorial central en cuanto a la frecuencia y amplitud (un pico/hora con amplitud de aproximadamente 2 mUI/ml de LH).

55

**[0011]** Las GnRH alcanzan la glándula pituitaria anterior a través de la denominada circulación portal (en una forma espiral) enrollada alrededor de la glándula pituitaria y la estimulan liberando descargas de FSH (hormona estimuladora del folículo) y LH (hormona luteinizante) relacionadas, por lo tanto, con la liberación de GnRH; estas FSH y LH regulan la producción de estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (Pg) por el ovario. (Pg).

60

**[0012]** El E<sub>2</sub> es la hormona de la denominada fase proliferativa; permite la maduración del folículo ovárico y estimula la proliferación y diferenciación de las células endometriales.

**[0013]** Tanto las células de la mucosa como las de los vasos del endometrio aumentan en número (y en volumen); además, el E<sub>2</sub> induce la producción de receptores de Pg en las células, de forma que se vuelven más reactivas a su

65

presencia cuando el cuerpo lúteo empieza a producirla.

**[0014]** La Pg es la hormona de la fase secretora, es decir, la fase que prepara para recibir el óvulo, y procede del cuerpo lúteo que se forma a partir del estroma del folículo ovárico vacío. Su acción limita el efecto proliferativo y estimula de forma más precisa la diferenciación de los vasos y la producción de secreciones más acordes con la implantación del óvulo (blastocisto). En esta fase, la progesterona también estimula a las neuronas a nivel central (opioides, dopaminérgicas y gabaérgicas), lo cual inhibe la liberación de GnRH.

**[0015]** Tanto el E<sub>2</sub> como la Pg, junto con la FSH, modifican la producción de LH por la pituitaria; esta modificación se consigue reduciendo la frecuencia de picos de LH (un pico/3 horas en lugar de 1 pico/hora) y aumentando su amplitud (de 2 mUI/ml a 3-4 mUI/ml de LH).

**[0016]** De esta manera, el último aspecto actúa reduciendo la secreción de LH si el óvulo no se ha implantado, de forma que los niveles de E<sub>2</sub> y Pg se reducen y, por lo tanto, finaliza el ciclo con el flujo menstrual.

**[0017]** Sin embargo, si en lugar de esto se implanta el óvulo, las gonadotropinas coriónicas (hGC) producidas por el trofoblasto y después por la placenta que se formará, estimulan el cuerpo lúteo para que continúe produciendo E<sub>2</sub> y Pg que actúan manteniendo las condiciones del útero adecuadas para el embarazo. Una vez formada, la placenta será autosuficiente para producir los dos tipos de estrógenos.

**[0018]** Estos estrógenos también realizan actividades auxiliares, pero importantes, con fines reproductivos; en las trompas de Falopio, el E<sub>2</sub> estimula la proliferación y diferenciación mientras que la Pg las reduce; el E<sub>2</sub> aumenta la contractilidad del miometrio mientras que la Pg la reduce; el E<sub>2</sub> aumenta la cantidad y fluidez del moco cervical (para facilitar el paso de los espermatozoides) mientras que la Pg las reduce, lo hace más viscoso y altera su consistencia. Uno de los problemas más debatidos, sin embargo, es la acción del E<sub>2</sub> y la Pg sobre el estrés oxidativo. Este dualismo, por el que uno tiene una acción opuesta a la otra, no parece ser factible, ya que los dos tienen una acción estimuladora sobre el uso de la energía celular y la inducción metabólica, aunque para tareas diferentes. Por lo tanto, en términos puramente teóricos, los dos podrían ser pro-oxidantes, pero el equilibrio oxidativo depende de cuánto el estímulo de uno o la otra permite la producción de antioxidantes endógenos. Por lo tanto, aún necesita esclarecerse el estado de la técnica sobre este asunto particular y a continuación se analizarán algunos aspectos importantes.

*Estado del EO durante el ciclo menstrual normal*

**[0019]** Como se muestra en la Figura 1, tanto el ciclo folicular como el luteal se subdividen esquemáticamente en una fase temprana y una fase tardía. Esto permite diferenciar la progresión del estado del EO descrito por algunos autores [4] en forma esquemática.

**[0020]** Basándose en el análisis de las concentraciones locales (tejido endometrial) de GSH (glutati6n reducido), GSSG (glutati6n oxidado), GSHpx (enzima glutati6n peroxidasa) y finalmente MDA (malonil dialdehido), pudieron evaluarse los cambios en las condiciones oxidativas. Dichas condiciones despu6s se correlacionaron con niveles de hormonas (estradiol, progesterona), LH y FSH.

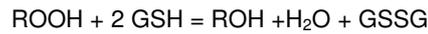
**[0021]** Estos datos demuestran que el pico en EO aparece en las fases intermedias del ciclo (folicular tardía y luteal temprana), es decir, en la maduraci6n del 6vulo y la posible implantaci6n del 6vulo. Esta fase se manifiesta por: a) un aumento en la producci6n de GSHpx; b) una reducci6n en GSH; c) un aumento en GSSG; y d) la estabilidad sustancial de MDA. Esto significa que seg6n aumenta el EO, hay una compensaci6n correspondiente de tal forma que la concentraci6n de MDA (que representa la peroxidaci6n de l6pidos) se mantiene constante; en otras palabras, el sistema se mantiene en equilibrio.

**[0022]** El pico de EO corresponde al pico de estr6genos y LH, mientras que el pico de progesterona parece corresponder a la fase de recuperaci6n de EO.

**[0023]** A este respecto, debe indicarse que GSHpx es el sistema enzimático que utiliza GSH como sustrato, permitiendo que se reduzcan hidroper6xidos de diversos tipos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o de naturaleza lipídica tales como ROOH, etc.) formando H<sub>2</sub>O.

**[0024]** Hay dos tipos de GSHpx, particularmente GSHpx1 que se encuentra en el citoplasma de todas las células, incluyendo los eritrocitos, y GSHpx3 que se encuentra en los fluidos extracelulares, incluyendo el plasma. Los dos tipos de enzimas, aunque se forman a partir de cuatro subunidades idénticas que contienen, cada una, una selenocisteína (SeCys), en realidad son diferentes. A este respecto, los anticuerpos policlonales contra GSHpx1 no reaccionan con GSHpx3. La GSHpx3 encontrada en el plasma se sintetiza principalmente por las células del túbulo proximal del riñ6n. Sin embargo, otras células también son capaces de sintetizarla (hígado, pulm6n, coraz6n, mama, intestino, cerebro, m6sculos) y secretarla [5].

**[0025]** La reacci6n catalizada por GSH en relaci6n con los hidroper6xidos es la siguiente:



5 **[0026]** Por lo tanto, un aumento de GSHpx corresponde, en términos funcionales, a un aumento en la oxidación de GSH; por lo tanto, en los sistemas biológicos, un aumento de la misma corresponde fisiológicamente a una reducción de GSH con un aumento consiguiente en GSSG. Todo esto significa EO; por lo tanto, es erróneo considerar a las GSHpx (de cualquier tipo, 1 o 3) un índice de la capacidad antioxidante, en su lugar deben considerarse una expresión de una mayor necesidad de usar GSH para contrarrestar el EO.

10 **[0027]** Sin embargo, si un estado clínico se caracteriza por niveles reducidos de GSHpx, esto significa que será más difícil usar GSH para contrarrestar el EO.

15 **[0028]** Esto ocurre en la menopausia, por ejemplo, tanto en el endometrio como en el plasma, aunque también parece estar relacionado con una edad avanzada (una situación típica de la menopausia) y, por lo tanto, con una menor eficacia del sistema antioxidante.

20 **[0029]** Cuando se analizan los sistemas GSHpx, SOD (superóxido dismutasa) y CAT (catalasa) en el plasma durante el ciclo menstrual [6], se observa que los niveles de GSHpx de los eritrocitos aumentan en la fase folicular tardía y en luteal temprana con respecto a las otras fases, mientras que los niveles de SOD y CAT se mantienen esencialmente constantes (véase la Tabla 1 mostrada más adelante). El análisis de las correlaciones con los niveles de E<sub>2</sub> indica que los niveles de GSHpx están correlacionados en el tiempo (simplificando mucho, un aumento de uno es simultáneo con un aumento de la otra).

25 **[0030]** Los niveles de FSH, LH, progesterona, testosterona y androstenodiona no muestran patrones que estén correlacionados en el tiempo con los de la GSHpx de los eritrocitos.

30 **[0031]** Según lo afirmado y demostrado, la acción aislable de E<sub>2</sub> no es antioxidativa, sino que, más bien, es precisamente lo contrario [7] y corresponde a la activación celular necesaria para el mayor requisito de energía en la fase secretora.

35 **[0032]** Si el óvulo no se ha fertilizado, la fase luteal también se caracteriza por una mayor actividad celular y proliferación tisular, que precede al final del ciclo y el flujo menstrual, volviendo la mucosa uterina de nuevo a las condiciones del principio del ciclo.

40 **[0033]** Esta fase se expresa de forma diferente en términos de actividad final (cambios en la viscosidad del moco, aumento del componente vascular, etc.), pero en términos de oxidación sigue siendo prácticamente igual, siendo una fase proliferativa.

45 **[0034]** Esta fase está dominada por la producción de Pg que se combina con la de E<sub>2</sub> y, por lo tanto, es la fase con la mayor expresión de esteroides estrogénicos-progestogénicos, después de la fase de maduración del óvulo.

**Tabla I.** Cambios en los niveles de enzimas relacionadas con la oxidación en los eritrocitos

Variables	Fases del ciclo			
	Folicular inicial	Folicular tardía	Luteal inicial	Luteal tardía
GSH (UI/g Hb)	15,2 ± 0,38	16,7 ± 0,23	16,3 ± 0,22	14,1 ± 0,31
SOD (UI/100 µg Hb)	1,3 ± 0,04	1,3 ± 0,02	1,2 ± 0,03	1,3 ± 0,02
CAT (UI/g Hb)	18,6 ± 3,24	20,6 ± 2,28	19,6 ± 2,56	18,2 ± 3,12

50 **[0035]** Otra característica de esta parte del ciclo es la producción considerable del radical NO•. NO• es un mediador importante de la vasodilatación, de la relajación del miometrio, la acción antiagregación y el estímulo angiogénico que se lleva a cabo por VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) que estimula la NO sintasa [8], lo que significa que el NO• parece mantenerse a través de la autoinducción de la NO sintasa.

55 **[0036]** Aunque esta última aparece en todas las fases menstruales, ya sea como eNOS (endotelial) o como iNOS (inducible), aumenta sustancialmente tras la estimulación progestogénica [9]. Conjuntamente con este aumento, también se produce un aumento local de SOD. La SOD, que dismuta el O<sub>2</sub>• (superóxido), impide que la reacción NO• + O<sub>2</sub>• forme el ion ONOO<sup>-</sup> (peroxinitrito) que, además de tener un alto poder oxidante, elimina NO• y restringe su disponibilidad. Pero todo dicho N• disponible reacciona con O<sub>2</sub>• (la reacción entre los dos es, con mucha diferencia, la más rápida del cuerpo (1 x 10<sup>-9</sup> segundos) y al final produce EO.

60 **[0037]** La permeabilidad vascular del endometrio y su suministro regular de sangre también se mantienen por una hormona peptídica específica, particularmente la relaxina (RLX).

**[0038]** RLX es un péptido con un PM de 6 kDa, que consiste en dos cadenas peptídicas, estabilizadas tanto internamente como entre sí por puentes S-S [10]. Realmente, es una familia de hormonas (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>) de las que la forma circulante H<sub>2</sub> es la que está más representada. La RLX se secreta principalmente por el cuerpo lúteo e impide estratégicamente cambios en el flujo endometrial para evitar fenómenos de isquemia y reperfusión durante la fase proliferativa del ciclo y después durante un posible embarazo, que podría activar procesos reactivos con la producción de ROS y quimiotáxis.

**[0039]** La acción de la RLX se produce mediante la regulación positiva de iNOS y eNOS y angiogénesis, de forma particular, pero no solamente, en el endometrio; esta acción se produce tanto en los vasos arteriales como en los vasos venosos (por lo tanto, también en vasos sin músculo liso).

**[0040]** Las concentraciones a las que la RLX es activa están a niveles nanomolares y, por lo tanto, alcanzables durante la fase endometrial propiamente dicha de la implantación del óvulo y el embarazo. También es típica de la RLX su acción angiogénica, realizada por la liberación de VEGF y también bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico).

**[0041]** Un aspecto importante de la acción de la RLX es la inhibición de la adhesión de glóbulos blancos inflamatorios al endotelio y la agregación plaquetaria. Esta actividad, junto con la regulación positiva de la producción de NO<sup>•</sup>, impide la generación de ROS y la atracción quimiotáctica típicas de una situación de isquemia/reperfusión.

**[0042]** En general, por lo tanto, la RLX influye considerablemente en la perfusión y el suministro de sangre en el endometrio, manteniendo condiciones de flujo ideales en el mismo y realizando acciones antiinflamatorias y antitrombóticas típicas.

*Acción de los estrógenos sobre la oxidación de lipoproteínas*

**[0043]** Un factor final a considerar es el efecto de los estrógenos sobre la oxidación de lipoproteínas.

**[0044]** La mayoría de experimentos realizados *in vitro* o *ex vivo* han demostrado la capacidad antioxidante del E<sub>2</sub> y que su efecto sobre la peroxidación de lípidos es similar al del α-tocoferol o β-caroteno, pero de una manera más clara que sus metabolitos estradiol y estrona.

**[0045]** Realmente, la mayoría de los experimentos realizados [11-12] se llevaron a cabo usando concentraciones mucho mayores que las fisiológicas, al menos del orden de 1-10 nmol/ml, que corresponden a 273 y 2730 ng/ml respectivamente. Estas concentraciones apenas se alcanzan cuando los estrógenos alcanzan un pico en la mitad del ciclo y sólo durante periodos de tiempo limitados; por esta razón, únicamente pueden afirmar con dificultad una acción antioxidante protectora para LDL [13].

**[0046]** Sin embargo, en un experimento realizado en mujeres menopáusicas, la administración de E<sub>2</sub> por vía intraarterial o en forma de un parche transdérmico (durante 3 semanas) ha demostrado claramente un retraso en la oxidación de LDL (mayor tiempo de retraso o tiempo de oxidación por Cu<sup>2+</sup>) del 11% y del 16% respectivamente, con una vuelta a las condiciones iniciales tras la interrupción del tratamiento [12]. No obstante, sigue habiendo grandes dudas de que los niveles de E<sub>2</sub> obtenidos por medio de las dos vías de administración fueran realmente fisiológicos, ya que se determinaron únicamente en un punto; sólo se tiene que considerar el pico sanguíneo obtenido con la administración intraarterial antes de que se establezca su distribución. Aparte de esto, no se detectaron diferencias en la actividad protectora de LDL entre los dos tipos de administración a pesar de las diferencias considerables en los niveles (de 4 a 7 veces mayores con el parche).

**[0047]** A partir de los diversos estudios realizados se deduce que para observar un efecto antioxidante (independientemente del problema de los niveles), el E<sub>2</sub> debe estar en contacto con el plasma, ya que si simplemente se añade a LDL no se observa actividad [11]. Este fenómeno se ha interpretado como que el E<sub>2</sub> necesita activarse por un componente sanguíneo, determinado como LCAT (lecitin-colesterol aciltransferasa), que esterifica el E<sub>2</sub> con un ácido graso; sólo en estas condiciones puede ejercer un efecto protector hacia las lipoproteínas. La esterificación parece tener lugar en el carbono C17, dejando libre el grupo hidroxilo en C3; este éster parece insertarse en la membrana de lipoproteínas con la parte hidrófila girada hacia la superficie exterior y la parte lipófila dentro de la membrana [14]. En teoría, una configuración similar podría proteger a la membrana de la oxidación, por consiguiente, por la oxidación del éster de E<sub>2</sub>, pero sigue sin saberse si esto puede ser suficiente para proteger una LDL.

**[0048]** Por lo tanto, el problema se evaluó desde el punto de vista estequiométrico.

**[0049]** Los niveles de los esteres de E<sub>2</sub> en las mujeres premenopáusicas apenas son medibles y los niveles más altos se encuentran en el fluido folicular a concentraciones de aproximadamente 0,1 μmol/l [15]. Todo esto significa que la relación entre las lipoproteínas (LDL, HDL, VLDL) es muy alta ya que solo las LDL están presentes en la sangre en una medida de al menos 0,6 μmol/l (correspondiente a 1,6 g/l para un pm de 2,6 x 10<sup>6</sup>). Por lo tanto, la presencia de esteres de E<sub>2</sub> en las lipoproteínas es muy pequeña (una molécula de éster de E<sub>2</sub> por miles de

lipoproteínas) y, por lo tanto, no compatible con una acción antioxidante directa; el posible mecanismo de protección de LDL puede ser únicamente de tipo enzimático (activación de las enzimas antioxidantes presentes en las lipoproteínas, tales como paraoxonasa, apoA, apoJ, GSHpx), pero esto no se sabe actualmente.

5 **[0050]** Con respecto a los tipos de esteres de E<sub>2</sub>, los aislados a partir del fluido folicular predominantemente están insaturados, es decir, un 96% (linoleatos, araquidonatos, palmitatos) y solo un 4% están saturados (estearatos) [15].

10 **[0051]** Se ha propuesto la hipótesis de que los esteres de E<sub>2</sub> son un medio de mantener el E<sub>2</sub> disponible como reserva, ya que su presencia es relativamente constante en los lípidos epiloicos y subcutáneos (aproximadamente 1 pmol/g de tejido) en mujeres premenopáusicas, mientras que tienden a reducirse sustancialmente durante la menopausia [16].

15 **[0052]** Una de las consideraciones a hacer con respecto a su presencia en las lipoproteínas es que, de esta manera, a diferencia de lo que ocurre con los estrógenos libres, no pueden eliminarse a través de los riñones y se liberan al interior de las células a través de la ruta del receptor de LDL. Debido a su liposolubilidad, los estrógenos libres pueden atravesar fácilmente la membrana celular de una manera menos controlable.

20 **[0053]** Por lo tanto, en general, el significado estratégico de los esteres de E<sub>2</sub> es, sin duda, no actuar como antioxidantes directos, sino, si acaso, ser antioxidantes indirectos y modular la liberación de E<sub>2</sub> para crear una reserva que se activará cuando sea necesario. El mecanismo para formar los esteres de hormonas esteroideas y su escasa presencia en la circulación en una forma pero protegida (lipoproteínas), sin unirse a albumina/globulina ni a SBP (proteínas de unión a esteroides) o CBG (globulinas de unión a corticosteroides), es una prueba de la necesidad de usarlos como reservas de esteroides listas para utilizarse cuando sea necesario.

25 **[0054]** El E<sub>2</sub> se puede oxidar fácilmente, mientras que los esteres de E<sub>2</sub> en menos medida.

30 **[0055]** La presencia de MPO (mieloperoxidasa) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (este último también se secreta por las células endoteliales) induce la oxidación de E<sub>2</sub> que se comporta como un propagador de la oxidación además de inducir la producción de MPO por los neutrófilos [13].

**[0056]** Sin embargo, el aspecto oxidativo del E<sub>2</sub> es muy particular.

35 **[0057]** Su comportamiento parece similar al que se produce durante la actividad física [17]; es decir, las LDL se oxidan y se captan más fácilmente de la circulación por receptores hepáticos y se mantienen bajo control y parcialmente "dominadas" por el sistema antioxidante del músculo. Sin embargo, si el sistema antioxidante es insuficiente y sus niveles aumentan, experimentan captación vascular (subendotelial) que desencadena el proceso de arteriosclerosis inflamatoria. De hecho, se someterían a la actividad de la MPO en el subendotelio.

40 **[0058]** Esto explica los niveles reducidos de colesterol y LDL en las mujeres premenopáusicas, interpretados como una mayor eficacia de los receptores hepáticos de LDL y no como una mayor captación de LDL, debido a que están en condiciones parcialmente oxidadas (debe indicarse que existe un límite de oxidación mínimo disponible por encima del cual se desencadena la reacción de los macrófagos).

45 **[0059]** Este equilibrio oxidativo casi nivelado puede describirse como compensable en condiciones fisiológicas de secreción normal de estrógenos-progesterona (por lo tanto, durante un ciclo menstrual normal) pero puede cambiar hacia una pro-oxidación cuando se usa una terapia anticonceptiva (TA).

50 **[0060]** El fenómeno es comprensible, ya que cualquier administración oral de estrógenos-progestina produce un pico sanguíneo de ambos (dependiendo del tipo de TA), que no es de dimensiones fisiológicas y, por lo tanto, la oxidación "ligera y controlable" se transforma en EO.

55 **[0061]** Ahora se ha demostrado el hecho de que este EO se genere por un aumento en la cantidad de LDL oxidadas, o un aumento en los niveles sanguíneos de Cu, o la regulación positiva de iNOS [1] o por una combinación de los mismos [1, 2]. El problema que surge es el del control del EO, pero para conseguir esto, primero es necesario comprender lo que está ocurriendo en relación con el EO en condiciones normales para tomar acciones para reducir el estrés cuando se toma una terapia anticonceptiva.

60 **[0062]** Por lo tanto, se sintió la necesidad de encontrar un remedio eficaz, bien tolerado por el cuerpo y capaz de reducir el estrés oxidativo atribuible al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar dicho remedio.

### Sumario de la invención

65 **[0063]** Este objetivo se consiguió por medio de la composición antioxidante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende levadura de selenio, vitamina B6, ácido alfa-lipoico, coenzima Q10, beta-caroteno y catequina.

[0064] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de dicha composición para reducir el estrés oxidativo atribuible al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales.

5 [0065] En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para la administración de los antioxidantes de dicha composición.

10 [0066] Como será evidente tras la siguiente descripción detallada, la composición de la invención sorprendentemente ha permitido reducir el estrés oxidativo en individuos sometidos al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales mediante una combinación adecuada de componentes antioxidantes que muestran alta tolerancia por el cuerpo.

### Breve descripción de los dibujos

15 [0067] Las características y ventajas de la presente invención serán evidentes tras la siguiente descripción detallada, los ejemplos de trabajo proporcionados con fines ilustrativos y no limitantes y la Figura 1 adjunta, en la que se presentan esquemáticamente los acontecimientos significativos del ciclo menstrual.

### Descripción detallada de la invención

20 [0068] Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición antioxidante que comprende levadura de selenio, vitamina B6, ácido alfa-lipoico, coenzima Q10, beta-caroteno y catequinas. De hecho, se ha observado que la combinación de estos componentes, sorprendente y ventajosamente permite reducir el estrés oxidativo asociado con el consumo de fármacos anticonceptivos hormonales. Esta formulación ventajosamente contiene todos los tipos de antioxidantes, es decir, sistémicos (selenio), citoplásmicos (vitamina B6), mitocondriales (ácido alfa-lipoico, coenzima Q10), de membrana (beta-caroteno) y circulantes (catequinas).

30 [0069] Las catequinas son metabolitos antioxidativos derivados de plantas que pertenecen al grupo de los flavonoides. Se encuentran en varias especies vegetales, pero la fuente más importante en la dieta humana son los diversos té que proceden de la planta del té, *Camellia sinensis*. La hoja de té seca realmente contiene aproximadamente un 25% en peso de catequinas, aunque el contenido total puede variar significativamente de acuerdo con el tipo de planta, el sitio de crecimiento, las variaciones de luz, la estación y la altitud. En particular, las catequinas están presentes en todos los tipos de té, incluyendo el té blanco, té verde, té negro y té oolong (té azul), pero también están presentes en el chocolate, frutas, verduras, vino y muchas otras especies vegetales. De acuerdo con una realización preferida de la invención, dichas catequinas proceden del extracto de té verde.

35 [0070] Preferentemente, dicha composición antioxidante comprende un 8-16% en peso de levadura de selenio, un 0,5-5% en peso de vitamina B6, un 1-10% en peso de ácido alfa-lipoico, un 1-10% en peso de coenzima Q10, un 0,05-0,5% en peso de beta-caroteno y un 40-60% en peso de extracto de catequina, con respecto al peso de la composición. Esta combinación preferida ejerce una acción antioxidante completa y sinérgica. En particular, en las proporciones indicadas, la acción antioxidante prevalente se considera atribuible a los antioxidantes circulantes.

40 [0071] Más preferentemente, dicha composición antioxidante comprende un 10-14% en peso de levadura de selenio, un 1-3% en peso de vitamina B6, un 3,5-6% en peso de ácido alfa-lipoico, un 3,5-6% en peso de coenzima Q10, un 0,1-0,3% en peso de beta-caroteno y un 42-51% en peso de catequinas, con respecto al peso de la composición. En este caso, la combinación antioxidante en estos intervalos permite una expresión más amplia de las categorías antioxidantes "no circulantes" y, por lo tanto, una acción convenientemente más prolongada a lo largo del tiempo.

50 [0072] Incluso más preferentemente, dicha composición antioxidante comprende un 12-13% en peso de levadura de selenio, un 1,1-2% en peso de vitamina B, un 4-5,5% en peso de ácido alfa-lipoico, un 4-5,5% en peso de coenzima Q10, un 0,2-0,3% en peso de beta-caroteno y un 45-48% en peso de catequinas, con respecto al peso de la composición. En este caso, además de una mayor duración de tiempo, también hay una acción más potente proporcionada por una relación ideal entre antioxidantes sistémicos, antioxidantes celulares, antioxidantes mitocondriales, antioxidantes de membrana y antioxidantes circulantes tales como catequinas.

55 [0073] En particular, dichas catequinas son galato de epigallocatequina (EGCG), epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) y epicatequina (EC). De acuerdo con una realización preferida adicional, al menos un 35% en peso con respecto al peso de las catequinas es EGCG. Las catequinas, además de presentar una buena actividad antioxidante, también han demostrado una buena biodisponibilidad que permite, particularmente en el caso de EGCG, alcanzar niveles tisulares de aproximadamente un 8-10% de los niveles sanguíneos en los órganos principales (corazón, cerebro, hígado, útero, etc.).

60 [0074] De acuerdo con otra realización preferida, dicha vitamina B6 es piridoxina o una sal de la misma. Más preferentemente, es clorhidrato de piridoxina.

[0075] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición antioxidante para uso como un medicamento. En particular, dicha composición antioxidante se usa para reducir el estrés oxidativo atribuible al tratamiento con

fármacos anticonceptivos hormonales. Como se verá efectivamente por los ejemplos de trabajo que se presentan a continuación, la composición de la invención ha demostrado un efecto sinérgico sorprendente derivado de la combinación oportuna de los diversos componentes que, por el contrario, no han demostrado ninguna eficacia por separado.

5 **[0076]** Preferentemente, dicha composición antioxidante se administra por vía oral.

10 **[0077]** Preferentemente, la composición antioxidante de la invención está en forma de una forma de dosificación unitaria que comprende 15,8-31,5 mg de levadura de selenio, 1-9,5 mg de vitamina B6, 2-19 mg de ácido alfa-lipoico, 2-19 mg de coenzima Q10, 0,1-0,95 mg de beta-caroteno y 80-110 mg de catequinas.

15 **[0078]** Más preferentemente, dicha dosis unitaria comprende 20-27,5 mg de levadura de selenio, 2-5,5 mg de vitamina B6, 7-11,8 mg de ácido alfa-lipoico, 7-11,8 mg de coenzima Q10, 0,2-0,59 mg de beta-caroteno y 85-95 mg de catequinas.

**[0079]** De acuerdo con una realización preferida, la dosis unitaria comprende 24 mg de levadura de selenio, 2,44 mg de vitamina B6, 10 mg de ácido alfa-lipoico, 10 mg de coenzima Q10, 0,5 mg de beta-caroteno y 90 mg de catequinas, donde aproximadamente un 40% es EGCG.

20 **[0080]** En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit que comprende:

- i) al menos una composición antioxidante que comprende levadura de selenio, vitamina B6, ácido alfa-lipoico, coenzima Q10 y beta-caroteno; y
- ii) al menos una solución acuosa que comprende catequinas,

25 para la administración simultánea de los antioxidantes de la composición como se ha descrito anteriormente.

**[0081]** Preferentemente, en dicho kit, dicha composición antioxidante está en forma de polvo para mejorar su conservación a lo largo del tiempo.

30 **[0082]** Debe entenderse que todos los aspectos identificados como preferidos y ventajosos para la composición antioxidante como se ha descrito anteriormente también deben considerarse, por consiguiente, preferidos y ventajosos para el kit de la presente invención.

35 **[0083]** De acuerdo con una realización preferida, el polvo se mezcla con dicha solución en el momento de la administración. Además, dicha solución preferentemente es té verde descafeinado.

**[0084]** En el presente documento, los ejemplos de trabajo de la presente invención proporcionados a continuación se proporcionan con fines ilustrativos y no limitantes.

40 **EJEMPLOS**

**Ejemplo 1.**

45 *Determinación del poder antioxidante de las composiciones de la invención por el ensayo de BAP (potencial antioxidante biológico).*

**[0085]** Se seleccionaron 10 mujeres eumenorreicas voluntarias. Las características generales de las voluntarias se proporcionan a continuación:

50

Características	Valores medios $\pm$ DT*
Edad (años)	28,2 $\pm$ 3,91
Peso (kg)	61,4 $\pm$ 3,78
Altura (m)	1,66 $\pm$ 0,04
Índice de masa corporal (IMC kg/m <sup>2</sup> )	22,5 $\pm$ 2,01
* DT = desviación típica	

**[0086]** Las siguientes composiciones se han preparado como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composiciones de la invención

	Cantidad	Composiciones						
		1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G
Catequinas	mg	99,5	93,5	90	84	106	88	102
Levadura de Se	mg	18	21	24	28	16	26	19
Vitamina B6	mg	5	4	2,4	7	1,5	8	3
Ácido alfa-lipoico	mg	4	8	10	3	11	15	13
Coenzima Q10	mg	4	8	10	3	11	15	13
Beta-caroteno	mg	0,2	0,3	0,5	0,8	0,15	0,6	0,7

5 **[0087]** Se pidió a las voluntarias sanas que consumieran tres composiciones diferentes entre las preparadas anteriormente, es decir, 1A, 1B, 1C, de diferentes dosificaciones, con la intención de determinar la combinación más eficaz en relación con la actividad y duración a lo largo del tiempo.

**[0088]** Las tres composiciones se analizaron y ensayaron con respecto a la actividad por el ensayo de BAP.

10 **[0089]** Las catequinas se suministraron en forma de un extracto de té verde, en el que dichas catequinas constituían aproximadamente un 60% en peso.

15 **[0090]** En las tres composiciones, desde la 1A a la 1C, se fue reduciendo progresivamente la cantidad de catequinas y piridoxina (en forma de clorhidrato) y al mismo tiempo se fueron aumentando las cantidades de ácido alfa-lipoico, beta-caroteno, selenio y coenzima 10.

**[0091]** En otras palabras, en las diversas composiciones de A a C, se reducía la cantidad de antioxidantes solubles y se aumentaba la de antioxidantes liposolubles.

20 **[0092]** Las tres composiciones se administraron a las voluntarias durante tres días sucesivos al final de su ciclo, empezando el tercer día después de inicio del flujo menstrual.

25 **[0093]** Durante este periodo no se permitió ninguna otra terapia. El experimento se realizó por la mañana, habiendo permanecido las mujeres en ayunas desde la tarde previa, y sólo se permitió el consumo de agua durante el periodo de las 7:00 a las 13:00.

**[0094]** La administración de las composiciones siempre se realizó en el orden A, B, C.

30 **[0095]** El ensayo de BAP (distribuido por Diacron Srl, Grosseto, Italia) se realizó usando sangre extraída por un pinchazo en el dedo, recogida en microtubos heparinizados (0,15-0,2 ml de sangre); se realizaron cuatro extracciones: la basal, y 1 hora, 3 horas y 5 horas (respectivamente T1, T2 y T3) después de la administración de cada composición.

35 **[0096]** Las diferencias entre los valores se calcularon basándose en el ensayo t y el análisis de varianza para contrastes ortogonales (ANOVA). Los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de BAP a los diversos tiempos de observación después del tratamiento con tres composiciones diferentes de la invención. Valores medios  $\pm$  DT (desviación típica).

Tiempos	Composiciones			ANOVA
	1A	1B	1C	
Basal	1965 $\pm$ 250,4	1994 $\pm$ 178,2	1977 $\pm$ 172,8	A=B=C p > 0,05
T1 (después de 1 h)	2415 $\pm$ 360,1 <sup>a</sup>	2474 $\pm$ 312,7 <sup>a</sup>	2605 $\pm$ 234,8 <sup>a</sup>	C>A=B p < 0,05
T2 (después de 3 h)	2238 $\pm$ 266,5 <sup>a</sup>	2453 $\pm$ 279,6 <sup>a</sup>	2448 $\pm$ 207,3 <sup>a</sup>	B=C>A p < 0,05
T3 (después de 5 h)	1915 $\pm$ 224,6	2223 $\pm$ 256,6 <sup>a</sup>	2270 $\pm$ 190,7 <sup>a</sup>	B=C>A p < 0,05

<sup>a</sup>= ensayo t para datos interdependientes; T<sub>n</sub>Vs Basal p < 0,05

40 **[0097]** Por los datos, puede verse que las tres composiciones aumentaban ventajosamente el poder antioxidante del plasma de forma significativa; las composiciones 1B y 1C adicionalmente proporcionaban una acción más prolongada que la composición 1A; después de 1 hora, la composición 1C mostró inesperadamente una acción

significativamente mejor que las otras.

[0098] A partir de las observaciones, por lo tanto, se demostró que las tres composiciones tenían un poder antioxidante considerable y, por lo tanto, eran biodisponibles, teniendo la composición 1C una eficacia notable y mostrando una acción más considerable y prolongada a lo largo del tiempo.

**Ejemplo 2.**

*Determinación del estrés oxidativo (EO) durante el ciclo menstrual normal.*

[0099] Para este ensayo se seleccionaron 20 mujeres eumenorreicas voluntarias. Eran voluntarias aparentemente sanas, no se estaban sometiendo a ninguna terapia y la mayoría de ellas eran nulíparas (14 de 20). El uso de cualquier terapia con suplementos de la alimentación se consideró un criterio de exclusión.

[0100] El EO durante el ciclo menstrual (Ciclo A) se analizó usando el ensayo d-ROMs [18], que permitía la evaluación de hidroperóxidos en la sangre (plasma o suero), detectables después de un pinchazo en un dedo, en sangre (0,15-0,2 ml) recogida en microcubetas heparinizadas. El ensayo se realizó empezando el primer día posterior al final del flujo menstrual, posteriormente el tercer día y después cada tres días (indicado como t<sub>1</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>n</sub>..., t<sub>27</sub>), hasta el cese completo del flujo menstrual. De esta manera, se determinó la progresión del EO a lo largo del tiempo.

[0101] En las primeras 10 voluntarias, el protocolo también requirió que se evaluara el nivel de E<sub>2</sub> a los tiempos t<sub>6</sub>, t<sub>9</sub>, t<sub>12</sub>, t<sub>15</sub>, t<sub>18</sub>, t<sub>21</sub>, así como los niveles de Pg a t<sub>12</sub>, t<sub>18</sub>, t<sub>21</sub> para determinar la correlación del EO con las fases secretora y luteal del ciclo menstrual.

[0102] El E<sub>2</sub> y la Pg se determinaron usando kits conocidos (Estradiol: N.º de catálogo KE2D1; Progesterona: TKPG1; Inter Medico Markham, Ontario-Canadá). Los límites de detección fueron, respectivamente, 5 pg/ml para E<sub>2</sub> y 0,1 ng/ml para Pg, con un coeficiente de variación del 13,1% para E<sub>2</sub> y del 6,5% para Pg. La sangre se recogió de la vena braquial en tubos de ensayo heparinizados (2 alícuotas de 5 ml).

[0103] Las características generales de las voluntarias se proporcionan a continuación:

Características	Valores medios ± DT
Edad (años)	30,8 ± 5,66
Peso (kg)	63,2 ± 6,66
Altura (m)	1,67 ± 0,07
Índice de masa corporal (IMC kg/m <sup>2</sup> )	22,6 ± 1,58

[0104] Todas las extracciones de sangre se realizaron por la mañana entre las 8:00 y las 9:30, después de un ayuno desde la tarde anterior al ensayo, determinándose los análisis el mismo día. Se aconsejó a las voluntarias que evitaran comer en exceso el día previo a los ensayos de laboratorio. Los valores para los resultados del ensayo d-ROMs y los niveles de E<sub>2</sub> y Pg se recogen conjuntamente en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Valores para el ensayo d-ROMs, E<sub>2</sub>, Pg a diversos tiempos en voluntarias sanas (media ± DT).

Ciclo A control	Tiempo días	t <sub>1</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>9</sub>	t <sub>12</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>18</sub>	t <sub>21</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>27</sub>
(sin terapia)	Ensayo d-ROMs U. CARR.	284 ± 38,0	273 ± 47,0	284 <sup>a</sup> ± 34,6	299 <sup>a</sup> ± 31,3	336 <sup>a</sup> + 66,8	378 <sup>a</sup> ± 115,6	326 <sup>a</sup> ± 66,4	315 <sup>a</sup> ± 56,3	323 <sup>a</sup> ± 51,1	276 ± 44,8
	Estradiol			99	222 <sup>b</sup>	195 <sup>b</sup>	134 <sup>b</sup>	157 <sup>b</sup>	126		
pg/ml				±	±	±	±	±	±		

				33,7	34,2	39,9	36,2	36,9	38,4		
	Progesterona ng/ml					1,7 ± 0,54		6,3 <sup>c</sup> ± 3,0	13,0 <sup>c</sup> ± 6,2		
<sup>a</sup> ensayo t para datos interdependientes, $p < 0,05$ $t_n$ Vs $t_1$ ; <sup>b</sup> ensayo t para datos interdependientes, $p < 0,05$ $t_n$ Vs $t_6$ <sup>c</sup> ensayo t para datos interdependientes, $p < 0,05$ $t_{12}$ Vs $t_n$											

5 **[0105]** A partir del examen de los datos se dedujo que el EO se produjo entre  $t_6$  y  $t_{24}$ , y a  $t_{27}$  los niveles se redujeron dentro de los valores basales al inicio del ciclo. El aumento máximo asociado correspondía a un retraso de 3 a 6 días con respecto al pico de estrógenos.

**[0106]** La elevación en los niveles de Pg parecía tener el efecto de reducir el EO tras alcanzar su pico en la sangre ( $t_{21}$ ), pero no antes.

10 **[0107]** Debe tenerse en cuenta que, en términos del ensayo d-ROMs, el EO normalmente se define por valores > 300 CARR. U. Como se puede deducir a partir de los valores medios, el aumento en CARR. U con respecto a los valores al principio del ciclo alcanzó un estado de EO de  $t_{12}$  a  $t_{24}$ .

15 **[0108]** No se observaron correlaciones entre los niveles de  $E_2$  y los niveles del ensayo d-ROMs; esto indicó que la situación de una mayor oxidación sistémica no se producía por el  $E_2$  solo, sino también por otros factores que, en las condiciones experimentales indicadas, no podían identificarse (refiriéndose a los niveles de LH, FSH, relaxina, etc.).

20 **[0109]** En cualquier caso, se confirmó esta clara observación ya que en la propia fase estrogénica, se observó que los valores de oxidación sistémica aumentaban y después se reducían con el aumento de progesterona.

**Ejemplo 3.**

*Evaluación de la actividad de un anticonceptivo (TA) sobre los niveles de EO y los cambios en el EO después del cotratamiento con dos tipos diferentes de producto antioxidante.*

25 **[0110]** Para este ensayo se seleccionaron 10 mujeres eumenorreicas voluntarias, aparentemente sanas (una parte de las seleccionadas para el Ejemplo 2) y que no se estaban sometiendo a ninguna terapia.

30 **[0111]** Las características generales de las voluntarias eran las mismas que en el Ejemplo 2.

**[0112]** Durante el periodo de ensayo entero, las voluntarias asistieron al centro cada tres días por la mañana entre las 8:00 y las 9:30 en ayunas desde la tarde anterior.

35 **[0113]** La sangre para la evaluación del ensayo ROMs se extrajo de un dedo y se recogió en una cantidad de 0,1-0,2 ml en microcubetas que contenían heparina (10  $\mu$ l de plasma bastaban para el análisis del ensayo d-ROMs).

**[0114]** Los análisis siempre se realizaron el mismo día que la extracción. Inmediatamente después de extraer la sangre, se distribuyó un desayuno convencional.

40 **[0115]** Por lo demás, no se impuso ninguna otra restricción aparte de evitar comer en exceso la tarde previa a la extracción.

45 **[0116]** Se supervisó a las voluntarias durante todo el ciclo menstrual y se realizaron comprobaciones de sangre empezando al principio del ciclo menstrual ( $t_1$ ), posteriormente el día 3 ( $t_3$ ) y después cada tres días hasta  $t_{27}$  durante la fase de flujo menstrual. El periodo de tiempo se identificó como Ciclo B.

**[0117]** Los resultados se recogen conjuntamente en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Valores de ensayos d-ROMs a diversos tiempos en voluntarias sanas (media  $\pm$  DT)

Ciclo B Control	Tiempo en días	t <sub>1</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>9</sub>	t <sub>12</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>18</sub>	t <sub>21</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>27</sub>
(sin terapia anticonceptiva)	Ensayo d-ROMs	248	240	255a	284a	276a	271a	267a	256	249	246
	U. CARR.	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		28,6	26,5	26,8	22,8	21,3	25,9	26,1	23,8	32,2	30,2

\* = ensayo t para datos interdependientes; t<sub>n</sub> Vs t<sub>1</sub>, p < 0,05 donde n = 6, 9, 12, 15, 18

[0118] Incluso en esta serie de datos, puedo verse que los niveles de hidroperóxido (en términos de CARR. U.) como índices del estado oxidativo, aumentaban desde la comprobación de sangre después de 6 días (t<sub>6</sub>) y se mantenían tal cual hasta el día t<sub>18</sub>.

[0119] Los datos eran ligeramente diferentes de los obtenidos en el ejemplo 2 (los niveles pico para el ensayo d-ROMs eran inferiores), pero confirmaron que el EO se produce durante el pico de estrógenos en la fase de maduración del óvulo, rediciéndose únicamente durante la fase de progesterona (estrógenos y progesteronas combinados) hasta que se producía el siguiente flujo menstrual.

[0120] También se deduce de estos datos que, durante la fase de estrógenos, se desencadenó un estado de EO controlado, es decir, hubo un aumento en la producción de hidroperóxido, siendo esto un índice de una mayor oxidación, que algunas veces excedía el nivel normal de EO. De hecho, con el ensayo d-ROMs, el estado de EO se determinó como valores > 300 CARR.U. que, en las presentes condiciones experimentales, sólo se encontraron esporádicamente.

[0121] Analizando los casos individuales, pudo verse que el mayor aumento en los valores del ensayo d-ROM se obtenía entre t<sub>9</sub> y t<sub>15</sub>, es decir, tras el aumento de E<sub>2</sub> (por lo tanto, de forma general ligeramente antes de los picos fisiológicos de FSH y LH; véase la Figura 1).

[0122] El hecho de que los niveles se mantuvieran altos hasta t<sub>21</sub> significa que el aumento de progesterona asociado no podía cambiar sustancialmente el estado oxidativo, tendiendo éste a desaparecer únicamente después de que se redujeran los niveles de las dos hormonas.

[0123] Las mismas voluntarias después siguieron dos ciclos de 28 días de tratamiento anticonceptivo (TA) hormonal con etinilestradiol 50  $\mu$ g combinado con levonorgestrel 125  $\mu$ g (Microgynon®: 21 días de tratamiento y 7 sin tratamiento).

[0124] Durante el segundo ciclo (Ciclo C), se sometieron de nuevo a un ensayo en serie para los hidroperóxidos, a los mismos tiempos en que los ciclos A y B previos, usando los mismos métodos de extracción y un protocolo idéntico de salud e higiene.

[0125] Los resultados del ensayo d-ROMs se proporcionan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores del ensayo d-ROMs después del tratamiento TA con Microgynon® durante 28 días en voluntarias sanas (media  $\pm$  DT)

Ciclo C	Tiempo días	t <sub>1</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>9</sub>	t <sub>12</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>18</sub>	t <sub>21</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>27</sub>
(Terapia TA)	Ensayo d-ROMs	241	392*	398*	400*	409*	440*	434*	423*	290*	252
	U. CARR.	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		22,3	26,3	26,6	24,4	41,9	35,3	36,8	33,9	53,7	28,3

\* = ensayo t para datos interdependientes p < 0,05 t<sub>n</sub> de Ciclo A Vs t<sub>n</sub> de Ciclo B

[0126] Examinando los datos fue evidente un aumento sustancial en los valores medios de d-ROMs, estando por encima de los valores normales (indicados anteriormente como <300 U. CARR.) lo cual demuestra la presencia de EO que empieza incluso después del tercer día de terapia TA.

[0127] Todos los casos analizados entre t<sub>3</sub> y t<sub>21</sub> (tiempo de consumo de píldoras de TA) estuvieron claramente por encima de los niveles normales. Teniendo en cuenta el hecho de que la TA se sustituye por una píldora inactiva el día t<sub>21</sub>, fue lógico que después de tres días de suspensión (t<sub>24</sub>) fuera detectable una recuperación del estado de EO, y concluyó a t<sub>27</sub>. A t<sub>27</sub>, ninguna de las voluntarias realmente estaba en un estado de EO.

[0128] Si estos datos se comparan con los del Ciclo B (sin terapia TA), está claro que los valores de t<sub>3</sub> a t<sub>24</sub> eran significativamente mayores. Esto demostró claramente que el tratamiento con este fármaco anticonceptivo hormonal

era una fuente de EO.

[0129] En el cuarto ciclo de tratamiento consecutivo (Ciclo D), de nuevo basado en etinilestradiol 50 µg combinado con levonorgestrel 125 µg (Microgynon®: 21 días de tratamiento y 7 días inactivos), después se añadió una administración diaria de una formulación que tenía una actividad antioxidante reconocida y demostrada, conocida como AR<sub>D</sub> Stenovit® (AO<sub>St</sub>).

[0130] Esta formulación comprendía compuestos con actividad antioxidante, proporcionándose su formulación, como se usa en el presente ensayo, en la Tabla 6.

[0131] En experimentos previos, se demostró que la misma formulación poseía una acción antioxidante, determinada basándose en el ensayo d-ROMs, tanto cuando se administraba a voluntarias sanas [19] en un experimento controlado doble ciego como cuando se administraba a pacientes afectadas por una arteriopatía periférica [18].

**Tabla 6.** Composición de la formulación antioxidante (AO<sub>St</sub>).

Ingredientes	Cantidad (mg)
Levadura de selenio 0,2%	24,00
Vitamina C protegida 97,5%	30,77
Bioflavonoides de <i>Citrus</i> conc. 40%	75,00
Pidolato de zinc	25,00
Coenzima Q10	10,00
Clorhidrato de L-cisteína	12,61
Acetato de vitamina E conc. 50%	32,91
Clorhidrato de piridoxina	1,22
Acetato de vitamina A 50000 UI/g	0,7
Beta-caroteno 10%	0,5

[0132] De hecho, esta formulación antioxidante (AO<sub>St</sub>) comprendía los cuatro tipos de antioxidante, es decir, antioxidantes de membrana (Vit E y beta-caroteno), antioxidantes circulantes (Vit C L-bioflavonoides), antioxidantes celulares (coenzima Q y piridoxina) y antioxidantes sistémicos (selenio y L-cisteína) que son los componentes de GSH y GSHpx (respectivamente glutatión y glutatión peroxidasa).

[0133] En las voluntarias, AO<sub>St</sub> se administró en forma de viales bifásicos de 10 ml (a mezclar en el momento de administración) al mismo tiempo que la píldora de TA. Los métodos experimentales de este ciclo (Ciclo D) fueron idénticos a los de los Ciclos B y C anteriores.

[0134] Los resultados de los valores de hidroperóxido en sangre en serie se proporcionan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Valores del ensayo d-ROMs después del tratamiento TA (Microgynon® durante 28 días) combinado con AO<sub>St</sub> en voluntarias sanas (media ± DT).

Ciclo D	Tiempo días	t <sub>1</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>9</sub>	t <sub>12</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>18</sub>	t <sub>21</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>27</sub>
(Terapia TA + AO <sub>St</sub> )	Ensayo d-ROMs U. CARR.	241 ± 22,3	391 <sup>a</sup> ± 21,2	395 <sup>a</sup> ± 20,0	398 <sup>a</sup> ± 19,0	407 <sup>a</sup> ± 39,5	438 <sup>a</sup> ± 36,9	427 <sup>a</sup> ± 36,7	423 <sup>a</sup> ± 33,7	310 <sup>a</sup> ± 80,4	257 ± 36,1

<sup>a</sup> p < 0,05 ensayo t para datos interdependientes t<sub>1</sub> Vs t<sub>n</sub>

[0135] Como puede verse por los valores medios a los diversos tiempos de medición, el tratamiento con AO<sub>St</sub> que había demostrado ser capaz de reducir los valores del ensayo d-ROMs en voluntarios sanos de ambos sexos [19], inesperadamente no podía actuar de forma alguna sobre el EO debido al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales (TA).

[0136] Por lo tanto, pudo deducirse a partir de los resultados que el EO originado por la terapia TA se generaba por mecanismos bastante particulares, tales como para mantenerse prácticamente sin alteraciones a pesar de la administración de formulaciones antioxidantes demostradas.

[0137] Después de un ciclo de eliminación posterior, en el que las voluntarias continuaron únicamente el tratamiento con la misma TA, se sometieron a un ciclo de TA adicional (ciclo E) asociado con la composición antioxidante de la invención (AO<sub>inv</sub>), proporcionada específicamente en la Tabla 8.

5

**Tabla 8.** Composición antioxidante de la invención (AO<sub>inv</sub>)

	Cantidad (mg)
Levadura de selenio*	24,00
Clorhidrato de piridoxina	2,44
Ácido alfa-lipoico	10,00
Coenzima Q10	10,00
Beta-caroteno 10 %	0,5
Catequinas, siendo el 40 % EGCG	90,00
* Levadura de selenio valorada en selenio orgánico al 0,2 %	

[0138] Las catequinas se suministraron en forma de extracto de té verde, constituyendo dichas catequinas un 60 % en peso.

10 [0139] La composición de AO<sub>inv</sub> se administró al mismo tiempo que la píldora de TA. Dicha composición estaba en forma de un kit, es decir, un polvo y 10 ml de solución acuosa de té verde descafeinado en el que se disolvieron las catequinas, que debían mezclarse conjuntamente en el momento de consumo. Los métodos de extracción y las sugerencias de salud e higiene para este ensayo fueron idénticas a las de los ensayos previos.

15 [0140] Los resultados del tratamiento con la composición de la invención se proporcionan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Valores del ensayo d-ROMs (media ± DT) después del tratamiento combinado de TA (Microgynon® durante 28 días) y AO<sub>inv</sub> durante 27 días.

Ciclo E	Tiempo días	t <sub>1</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>9</sub>	t <sub>12</sub>	t <sub>15</sub>	t <sub>18</sub>	t <sub>21</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>27</sub>
(Terapia TA + AO <sub>inv</sub> )	Ensayo d-ROMs U. CARR.	258 ± 18,4	352 <sup>ab</sup> ± 39,8	340 <sup>ab</sup> ± 34,1	318 <sup>ab</sup> ± 28,9	320 <sup>ab</sup> ± 34,2	314 <sup>ab</sup> ± 30,3	322 <sup>ab</sup> ± 30,8	329 <sup>ab</sup> ± 25,2	277 <sup>ab</sup> ± 15,0	244 ± 13,0
<sup>a</sup> ensayo t para datos interdependientes p<0,05 t <sub>n</sub> Vs t <sub>1</sub> <sup>b</sup> ensayo t para datos interdependientes p< 0,05 t <sub>n</sub> de Tabla 8 Vs t <sub>n</sub> de Tabla 9											

20 [0141] Con la excepción de los tiempos t<sub>1</sub> y t<sub>27</sub>, todos los valores del ensayo d-ROMs fueron significativamente menores que los obtenidos con el tratamiento anticonceptivo solo; es decir, se demostró que el tratamiento simultáneo con la composición AO<sub>inv</sub> era, inesperadamente, sorprendente y significativamente eficaz para reducir el EO durante todo el periodo del ciclo en el que se usaba el fármaco anticonceptivo hormonal.

25 [0142] Estos resultados fueron incluso más sorprendentes si se considera que se descubrió que el uso del producto antioxidante de eficacia demostrada y documentada, usando el mismo tipo de ensayo para determinar el estado de EO, era totalmente insatisfactorio.

**Ejemplo 4.**

30

*Evaluación del efecto sinérgico demostrado por el AO<sub>inv</sub> en comparación con la acción de catequinas solas*

35 [0143] Para este ensayo se seleccionaron 64 voluntarias eumenorreicas aparentemente sanas, todas con tratamiento anticonceptivo durante al menos 6 meses con una baja dosificación de C que contenía etinilestradiol 30 µg y drospironona 3 mg (Yasmin®), que después se subdividieron en dos grupos: un grupo de control y un grupo de tratamiento.

40 [0144] Los criterios de selección para todas las voluntarias excluyeron las terapias crónicas concomitantes, un estado premenopáusico, el uso de cualquier tipo de suplemento de la alimentación, el hábito de fumar y el uso de bebidas alcohólicas fuertes, el consumo excesivo de té (>750 ml/día), de chocolate (>50 g/día) y un IMC > 25. El último embarazo tenía que haberse producido no menos de dos años antes del presente ensayo.

[0145] El grupo de control estaba bajo un régimen de TA asociado con el consumo controlado de té; el grupo de tratamiento estaba bajo un régimen con el mismo TA con el consumo simultáneo de la composición de AO<sub>inv</sub> que se

proporciona en la Tabla 6.

**[0146]** El grupo de control (33 casos; edad media  $35,9 \pm 6,71$  años) que tomó la TA de acuerdo con el procedimiento estándar sugerido por el fabricante se sometió a un análisis para controlar el EO en tres momentos precisos:

- una primera determinación para la selección, que tenía el objetivo de determinar si la TA había generado EO;
- una segunda determinación para evaluar el valor basal de EO;
- una tercera evaluación después de 8 semanas de terapia con C.

**[0147]** Como parte integral del protocolo experimental, se pidió a dicho grupo de control que consumiera dos tazas de té de 150 ml por la mañana; una de ellas en el desayuno y la otra durante la mañana. Además, se pidió que no se consumiera más té durante el día.

**[0148]** El tipo de té era idéntico para todas las voluntarias ya que se suministró a propósito para el uso en la investigación experimental (3 cajas con 50 bolsas de té cada una).

**[0149]** El contenido de catequinas del té [21,23, 24] se proporciona en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Contenido de catequinas en el té administrado al grupo de control

Tipo de catequina	mg/taza	mg/día total
EGCG	21,9	43,8
EGC	9,3	18,6
ECG	28,7	57,4
EC	10,0	20,0
Total	69,9	139,8

**[0150]** La petición de consumir al menos dos tazas de té se debía a la elección de administrar una cantidad de catequinas que fuera definitivamente mayor que la de las voluntarias tratadas con la composición  $AO_{inv}$ . La administración de té en las cantidades propuestas permitió aumentar los niveles de catequinas en sangre y el poder antioxidante relativo [21].

**[0151]** Las voluntarias del grupo de tratamiento (31 casos; edad media  $36 \pm 8,22$  años) siguieron el mismo esquema de terapia TA y supervisión de EO, pero después de la comprobación basal (después de la de la selección), además recibieron un tratamiento continuo con  $AO_{inv}$  también durante 8 semanas consecutivas, después de lo cual se comprobó de nuevo el EO. Se pidió a este grupo que evitara el consumo de té, o como máximo lo limitaran a una cantidad que no superara una taza/día (150 ml), y que además evitaran el consumo de chocolate durante el periodo de investigación de 8 semanas.

**[0152]** La acción antioxidante *in vitro* del té distribuido a las voluntarias de los dos grupos se determinó después de una evaluación del poder de AO con el método de BAP (potencia antioxidante biológica) [25]. Para realizar el ensayo, se preparó una infusión de té sumergiendo una bolsa de té durante 5 minutos en 150 ml de agua hirviendo. El vial de  $AO_{inv}$  reconstituido (polvo disuelto en 10 ml de solución acuosa) también se llevó a 150 ml con agua hirviendo. La BAP se determinó 10 minutos después de su preparación. Se compararon seis preparaciones de té, realizadas en tiempos diferentes, y se evaluaron por duplicado con seis preparaciones de  $AO_{inv}$  también evaluadas por duplicado.

**[0153]** Los resultados *in vitro* demostraron que el poder antioxidante del té era más eficiente que el de la composición de  $AO_{inv}$ ; es decir,  $3702 \pm 347,3 \mu\text{mol/l}$  respectivamente de vitamina C para la infusión de té y  $3121 \pm 136,8 \mu\text{mol/l}$  de vitamina C para  $AO_{inv}$  ( $p < 0,05$  ensayo t para datos independientes).

**[0154]** Durante el periodo experimental, se permitió a todas las voluntarias que bebieran café durante el día de acuerdo con sus hábitos. Todas las voluntarias se presentaron para el ensayo por la mañana, entre las 8:00 y las 9:30, habiendo permanecido en ayunas desde la tarde previa. Se les aconsejó que evitaran comer en exceso la tarde anterior al análisis de sangre que se realizó de acuerdo con los métodos proporcionados en el Ejemplo 2.

**[0155]** El esquema para evaluar el EO consistía, como se ha indicado, en tres controles; el control para la selección, la medición inicial y la medición después de 8 semanas.

**[0156]** Las mediciones se cronometraron de tal forma que no se produjeran, en ninguno de los casos, en los días inmediatamente anteriores al flujo menstrual. Los resultados de medición se proporcionan en la Tabla 11.

[0157] Como puede verse a partir de los datos presentados, todas las voluntarias (tanto del grupo de control como del grupo de tratamiento) al principio del periodo de observación estaban en situación de EO. Ninguna voluntaria realmente tenía valores del ensayo d-ROMs considerados normales, es decir, < 300 Carr. U., como confirmación adicional de que los fármacos anticonceptivos hormonales con baja dosis de estrógenos también producen EO.

5

**Tabla 11.** Valores del ensayo d-ROMs en voluntarias sanas, antes y después del tratamiento combinado de anticonceptivo (Yasmin®) y té y/o AO<sub>inv</sub>, antes y después de un periodo de 8 semanas (valores medios ± DT)

Tratamiento	Valores de ensayo d-ROMs (U. CARR.)	
	basal	Después de 8 semanas
Grupo de control [TA + té]	385 ± 38,2	394 ± 46,9
Grupo de tratamiento [TA + AO <sub>inv</sub> ]	389 ± 44,2	305 ± 23,3
P < 0,05 ensayo t para datos interdependientes Controles Vs tratados		

10 [0158] Al final del periodo de 8 semanas, se observó que los valores del ensayo d-ROMs para el grupo tratado con AO<sub>inv</sub> eran significativamente menores que los del grupo de control, estando un alto porcentaje de casos dentro de los valores normales (75 %).

15 [0159] Esto no ocurría en el grupo de control, a pesar de que las voluntarias habían consumido una mayor cantidad de catequinas (con un cumplimiento del 98 % calculado contando las bolsas de té usadas).

[0160] Además, se observó que el consumo de café en los dos grupos de estudio era prácticamente el mismo: la media era 1,1 tazas/día para el grupo de control y 1,2 tazas/día para el grupo de tratamiento. El consumo de té por las voluntarias del grupo tratado con AO<sub>inv</sub> fue insignificante en promedio (0,1 tazas/día).

20 [0161] Estos resultados fueron sorprendentes, ya que demostraron que no eran las catequinas las que ejercían una acción limitante del EO durante el régimen de tratamiento con la TA de fármaco anticonceptivo hormonal, incluso a bajas dosificaciones, ya que se observó que las catequinas, aunque se habían administrado en mayores cantidades que las contenidas en AO<sub>inv</sub>, no podían actuar sobre el EO.

25 [0162] Se dedujo que los resultados sorprendentes eran atribuibles a la composición antioxidante de la invención que, mediante componentes específicos asociados de forma adecuada con la acción de la catequina, daban como resultado un efecto sinérgico inesperado que permitía reducir significativamente el EO. Estos resultados eran incluso más sorprendentes e inesperados cuando se consideraba que la evaluación del poder antioxidante *in vitro*, como se ha indicado anteriormente, no recomendaba el uso de la composición de la invención en comparación con el té verde solo.

30 [0163] También debe indicarse que esta reducción significativa conduce ventajosamente, por lo tanto, a una frecuencia reducida de episodios trombóticos superficiales, así como de todos los acontecimientos cardiovasculares atribuibles al uso de fármacos anticonceptivos hormonales como fuente de EO.

35

**Ejemplo 5.**

*Evaluación del efecto sinérgico demostrado por AO<sub>inv</sub> con respecto a la acción de los componentes solos, es decir, sin catequinas.*

40

[0164] Este ensayo se realizó con 18 voluntarias (una parte de los casos del Ejemplo 3).

45 [0165] El objetivo del ensayo era verificar si los antioxidantes contenidos en el AO<sub>inv</sub>, sin extracto de té verde, eran sin embargo eficaces para reducir el EO producido por los fármacos anticonceptivos hormonales en uso (Yasmin®).

[0166] Por lo tanto, se formaron tres grupos de voluntarias [A, B, C], cada uno compuesto de seis sujetos seleccionados basándose en la edad, peso corporal y altura de tal forma que los tres grupos fueran tan homogéneos como fuera posible. Todas las voluntarias se sometieron a un mes de eliminación de todos los tratamientos excepto el anticonceptivo. Las características de las voluntarias se muestran a continuación:

50

Características*	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Edad (Años)	30,8 ± 3,43	32,7 ± 4,27	31,8 ± 5,81
Peso (kg)	63,3 ± 5,39	62,5 ± 2,66	63,3 ± 2,25

Características*	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Altura (m)	1,69 ± 0,06	1,68 ± 0,03	1,66 ± 0,04
Índice de masa corporal IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23,4 ± 1,40	22,1 ± 1,52	23,0 ± 1,30
* Todas las variables generales se analizaron por ANOVA y se descubrió que los grupos no eran significativamente diferentes (p > 0,05).			

[0167] Los tres grupos de voluntarias se trataron como se indica a continuación:

- El Grupo A se sometió a un tratamiento diario con AO<sub>inv</sub>;
- 5 - El Grupo B se trató diariamente con té verde de acuerdo con los métodos proporcionados en el Ejemplo 4 (consumo por la mañana de dos tazas de té, de 150 ml cada una; de nuevo, una en el desayuno y la otra durante la mañana; además, se pidió que evitaran el consumo de cualquier otro té durante el día);
- El Grupo C se trató con la composición antioxidante proporcionada en la Tabla 12, que correspondía a la composición AO<sub>inv</sub> sin catequinas. Se pidió que este último grupo no tomara té a lo largo de la duración del ensayo.

**Tabla 12.** Composición de AO administrada durante 8 semanas al Grupo C.

Ingredientes	Cantidad (mg)
Levadura de selenio conc. 0,2 %	24,00
Clorhidrato de piridoxina	2,44
Ácido alfa-lipoico	10,00
Coenzima Q10	10,00
Beta-caroteno 10 %	0,5

[0168] Los tratamientos se iniciaron con la terapia anticonceptiva en curso y se continuaron sin interrupción durante 8 semanas. Durante el periodo de ensayo, se dejó que todas las voluntarias bebieran café durante el día de acuerdo con sus hábitos. También se permitió que las voluntarias del Grupo C bebieran café si lo tenían como costumbre (siempre que no fuera un sustituto del té).

[0169] Antes de empezar a tomar las formulaciones antioxidantes y durante 8 semanas posteriormente, se adquirieron los valores del ensayo d-ROMs.

[0170] Todas las voluntarias se presentaron para las comprobaciones de sangre entre las 8:00 y las 9:30 por la mañana, en ayunas desde la tarde previa. Se les aconsejó que evitaran comer en exceso la tarde previa al análisis de sangre que se realizó de acuerdo con los métodos indicados en el Ejemplo 2.

[0171] Los resultados se proporcionan en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Valores del ensayo d-ROMs para las voluntarias de los Grupos A, B y C antes y después del tratamiento con formulaciones antioxidantes. Valores medios ± DT.

Periodo	Grupos			Contrastes ortogonales ANOVA
	A	B	C	
basal	397 ± 9,9	389 ± 22,7	391 ± 13,5	A = B = C
después de 8 semanas	315 ± 27,8	391 ± 29,2	401 ± 7,9	B = C > A p < 0,05

[0172] El examen de los datos demostró claramente que el tratamiento con formulaciones de antioxidantes solos (Grupo C) o catequinas solas (Grupo B, Ejemplo 4) no podía afectar en absoluto al EO. Por lo tanto, se demostró que la eficacia significativa de la composición AO<sub>inv</sub> para reducir el EO debido al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales era el resultado de la combinación de catequinas con componentes antioxidantes adecuados para proporcionar un efecto sinérgico inesperado y sorprendente.

## Referencias bibliográficas

[0173]

- 5 1) De Groote D, Perrier d'Hauterive S, Pintiaux A *et al.* Effect of oral contraception with ethinylestradiol and drospirenone on oxidative stress in women 18-35 years old. *Contraception* 2009; 80:187-193.
- 2) Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U *et al.* Effect of different contraceptive methods on the oxidative status in women aged 40-48 years from ELAN study in the province of Liege- Belgium. *Human Reprod* 2007; 22:2335-2343.
- 10 3) Loose D, Stancel G. Estrogens and progestins in: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics 11th Ed 2006:1541-1553.
- 4) Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W, Zbroz. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochin Pol* 2006; 53:663-677.
- 15 5) Serviddio G, Loverro G, Vicino M *et al.* Modulation of endometrial balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2843-2848.
- 6) Massafra C, Gioia D, De Felice C *et al.* Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol* 2000; 167:447-452.
- 20 7) Santanan N, Shern-Brewer, McClatchey R *et al.* Estradiol as an antioxidant: incompatible with its physiological concentrations and function. *J Lipid Res* 1998; 39:2111-2118.
- 8) Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A *et al.* Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Soc Acad Sci USA* 2001; 98:2604-2609.
- 25 9) Cameron IT, Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Human Repr Update* 1998; 4:565-589.
- 10) Bani D. Relaxin as a natural agent for vascular health. *Vase Health Risk Manag* 2008; 4:515-524.
- 11) Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS* 1987; 210:37-39.
- 30 12) Sack MN, Rader DJ, O Cannon R. Oestrogens and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343:269-270.
- 13) Chiang K, Parthasarathy S, Santanan N. Estrogen, neutrophils oxidation. *Life Sci* 2004; 75:2425-2438.
- 14) Lerner JM, Pahuja SL, Shackleton CH *et al.* The isolation and characterization of estradiol-fatty acid esters in human ovarian follicular fluid. *J Biol Chem* 1993; 268:13893-13899.
- 35 15) Tikkanen MJ, VihmaV, Jauhiainen M *et al.* Lipoprotein-associated estrogens. *Cardiovasc Res* 2001; 56:184-188.
- 16) Lerner JM, Shackleton CH, Roitman E *et al.* Measurement of estradiol-17-fatty acid esters in human tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:195-200.
- 17) Shern-Brewer R, Santanam N, Wetzstein C *et al.* Exercise and cardiovascular disease a new perspective. *Arteriosc Thromb Vase Biol* 1998; 18:1181-1187.
- 40 18) Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M *et al.* A simple test to monitor oxidative stress, *Int Angiol* 1999; 18:127-130.
- 19) Cornelli U, Terranova R, Luca S, *et al.* Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J Nutr* 2001; 131:3208-3211.
- 45 20) Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr* 2007; 26:373S- 388S.
- 21) Warden BA, Smith LS, Beecher GR *et al.* Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 2001; 131:1731-1737.
- 22) Saganuma M, Okabe S, Oniyama M *et al.* Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 1998; 19:1771-1776.
- 50 23) Schwedhelm E, Maas R, Troost R, Boger RH. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:437-459.
- 24) Fernandez-Pancho MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Crit Rev Food Sci* 2008; 48:649-671.
- 55 25) Nakayama K, Terawaki H, Nakayama M *et al.* Reduction of serum antioxidative capacity during hemodialysis *Clin Exp Nephrol* 2007; 11:218-225.

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Composición antioxidante que comprende levadura de selenio, vitamina B6, ácido alfa-lipoico, coenzima Q10, beta-caroteno y catequinas.
- 2.** La composición antioxidante de la reivindicación 1, que comprende un 8-16 % en peso de levadura de selenio, un 0,5-5 % en peso de vitamina B6, un 1-10 % en peso de ácido alfa-lipoico, un 1-10 % en peso de coenzima Q10, un 0,05-0,5 % en peso de beta-caroteno y un 40-60 % en peso de catequinas.
- 10 **3.** La composición antioxidante de la reivindicación 2, que comprende un 10-14 % en peso de levadura de selenio, un 1-3 % en peso de vitamina B6, un 3,5-6 % en peso de ácido alfa-lipoico, un 3,5-6 % en peso de coenzima Q10, un 0,1-0,3 % en peso de beta-caroteno y un 42-51 % en peso de catequinas.
- 15 **4.** La composición antioxidante de la reivindicación 3, que comprende un 12-13 % en peso de levadura de selenio, un 1,1-2 % en peso de vitamina B6, un 4-5,5 % en peso de ácido alfa-lipoico, un 4-5,5 % en peso de coenzima Q10, un 0,2-0,3 % en peso de beta-caroteno y un 45-48 % en peso de catequinas.
- 5.** La composición antioxidante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dichas catequinas son galato de epigalocatequina (EGCG), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) y epicatequina (EC).
- 20 **6.** La composición antioxidante de la reivindicación 5, en la que al menos un 35 % en peso es EGCG con respecto al peso de catequina.
- 7.** La composición antioxidante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichas catequinas están en forma de extracto de té verde.
- 25 **8.** La composición antioxidante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha vitamina B6 es piridoxina o una sal de la misma.
- 9.** La composición antioxidante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso como un medicamento.
- 30 **10.** La composición antioxidante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para reducir el estrés oxidativo atribuible al tratamiento con fármacos anticonceptivos hormonales.
- 11.** La composición antioxidante para uso de la reivindicación 9 o 10, en la que una dosis unitaria de dicha composición comprende 15,8-31,5 mg de levadura de selenio, 1-9,5 mg de vitamina B6, 2-19 mg de ácido alfa-lipoico, 2-19 mg de coenzima Q10, 0,1-0,95 mg de beta-caroteno y 80-110 mg de catequinas.
- 35 **12.** La composición antioxidante para uso de la reivindicación 11, en la que una dosis unitaria de dicha composición comprende 20-27,5 mg de levadura de selenio, 2-5,5 mg de vitamina B6, 7-11,8 mg de ácido alfa-lipoico, 7-11,8 mg de coenzima Q10, 0,2-0,59 mg de beta-caroteno y 85-95 mg de catequinas.
- 40 **13.** La composición antioxidante para uso de la reivindicación 12, en la que una dosis unitaria de dicha composición comprende 24 mg de levadura de selenio, 2,44 mg de vitamina B6, 10 mg de ácido alfa-lipoico, 10 mg de coenzima Q10, 0,5 mg de beta-caroteno y 90 mg de catequinas, en la que aproximadamente un 40 % es EGCG.
- 45 **14.** Un kit que comprende:
- 50 i) al menos una composición que comprende levadura de selenio, vitamina B6, ácido alfa-lipoico, coenzima Q10 y betacaroteno; y
- ii) al menos una solución acuosa que comprende catequinas,
- para la administración simultánea de los antioxidantes de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 55 **15.** El kit de la reivindicación 14, en el que dicha composición i) está en forma de polvo.

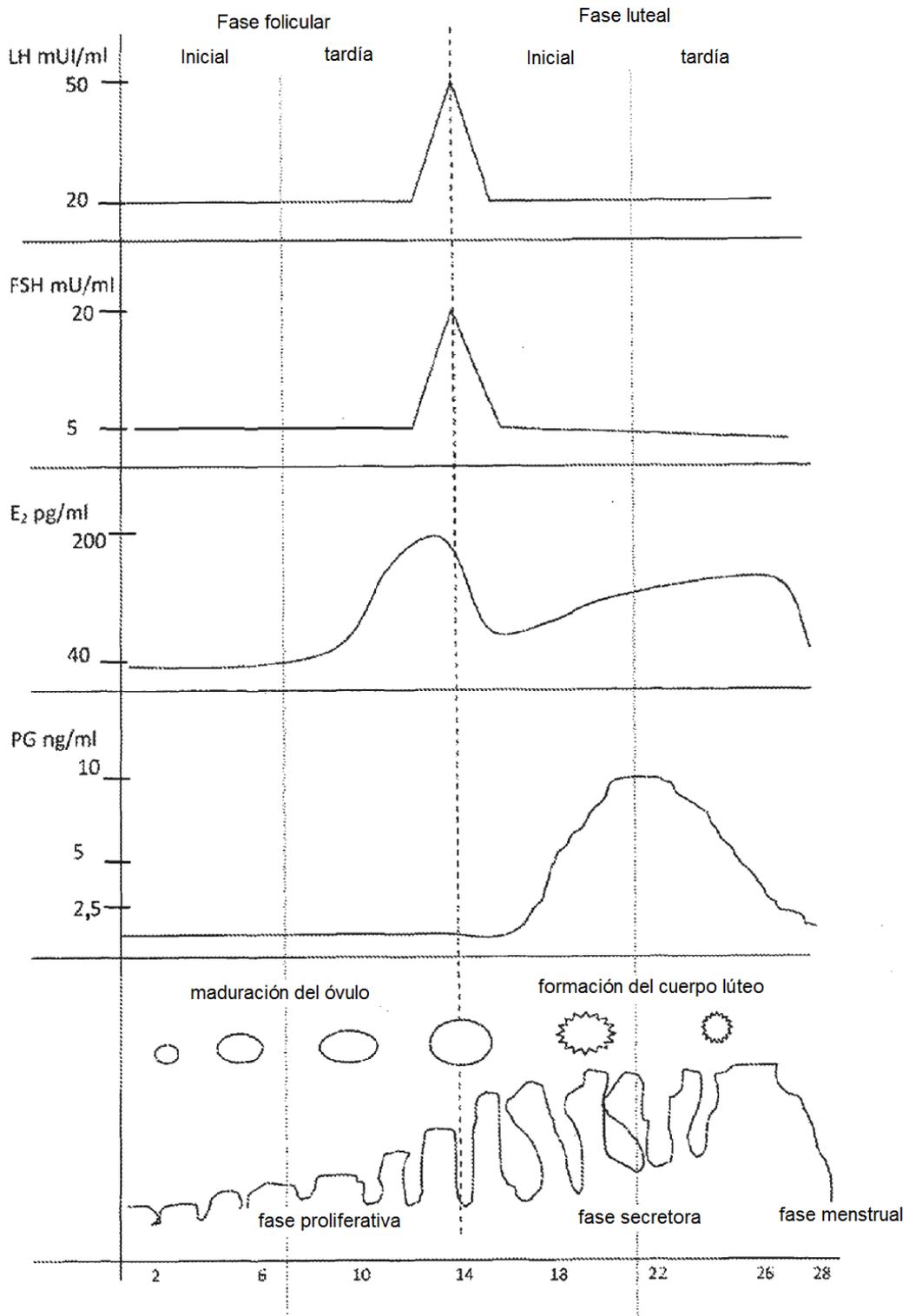


Figura 1