

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 483**

51 Int. Cl.:

A01N 37/00 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2010 PCT/US2010/061367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11075741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010 E 10838355 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2512236**

54 Título: **Método mejorado de administración de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB)**

30 Prioridad:

18.12.2009 US 287857 P

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

11.04.2017

73 Titular/es:

**METABOLIC TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2711 South Loop Drive Suite 4400
Ames, IA 50010, US**

72 Inventor/es:

**RATHMACHER, JOHN;
FULLER, JOHN;
BAIER, SHAWN;
NISSEN, STEVE y
ABUMRAD, NAJI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 608 483 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método mejorado de administración de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB)

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente de Estados Unidos con número de serie 61/287,857 presentada el 18 de diciembre de 2009.

5 Campo de la invención

La invención se refiere en general a un sistema de suministro más eficiente y más efectivo de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) y más específicamente a la administración de ácido libre de HMB dando como resultado una forma más eficiente y más efectiva de administrar HMB durante la administración de una dosificación similar de la forma de sal de calcio de HMB (CaHMB).

10 Antecedentes de la invención

Se ha encontrado que HMB es útil dentro del contexto de una variedad de aplicaciones. Específicamente, en la Patente de Estados Unidos No. 5,360,613 (Nissen), se describe que HMB es útil para reducir los niveles sanguíneos de colesterol total y colesterol de lipoproteínas de baja densidad. En la patente de Estados Unidos No. 5,348,979 (Nissen et al.), se describe que HMB es útil para promover la retención de nitrógeno en humanos. La Patente de Estados Unidos No. 5,028,440 (Nissen) discute la utilidad de HMB para incrementar el desarrollo de tejido magro en animales. También, en la Patente de Estados Unidos No. 4,992,470 (Nissen), se describe que HMB es efectiva para potenciar la respuesta inmune de mamíferos. La Patente de Estados Unidos No. 6,031,000 (Nissen et al.) describe el uso de HMB y al menos un aminoácido para tratar la emaciación asociada a la enfermedad. En la Patente de los Estados Unidos No. 6,103,764, se describe HMB como para incrementar la capacidad aeróbica del músculo de un animal sin un incremento sustancial en la masa del músculo. Además, se ha descrito que HMB es útil para mejorar la percepción del humano de su estado emocional en la Patente de Estados Unidos No. 6,291,525.

Se ha demostrado que HMB tiene efectos positivos sobre el mantenimiento y el incremento de la masa muscular magra en la caquexia por cáncer y la emaciación por SIDA. Además, se observa un efecto positivo sobre el daño muscular y la respuesta inflamatoria resultante provocada por el ejercicio que conduce a mialgia muscular, pérdida de fuerza y un incremento de citoquinas proinflamatorias con el uso de HMB.

Se ha observado previamente que HMB solo o en combinación con otros aminoácidos es un suplemento efectivo para restaurar la fuerza muscular y la función en atletas jóvenes. Además, se ha observado que el HMB en combinación con dos aminoácidos, arginina y lisina, es efectivo para incrementar la masa muscular en personas mayores.

HMB es un metabolito activo del aminoácido leucina. El uso de HMB para suprimir la proteólisis se origina en las observaciones de que la leucina tiene características de ahorro de proteínas (18, 24). El aminoácido esencial leucina puede ser usado bien sea para la síntesis de proteínas o transaminado al α -cetoácido (α -cetoisocaproato, KIC) (24). En una ruta, HMB se forma en el hígado a través de la oxidación del producto de transaminación de leucina α -cetoisocaproato. Aproximadamente el 5% de la oxidación de la leucina procede a través de esta ruta (28). HMB es superior a la leucina en la potenciación de la masa muscular y la fuerza. Los efectos óptimos de HMB se pueden lograr a 3.0 gramos por día, o 0.038 g/kg de peso corporal por día, mientras que los de leucina requieren más de 30.0 gramos por día (29).

Una vez producido o ingerido, HMB parece tener dos destinos. El primer destino es la simple excreción en la orina. Después de que el HMB es alimentado, las concentraciones de orina se incrementan, dando como resultado una pérdida aproximada de 20-50% de HMB a la orina (26; 52). Otro destino se relaciona con la activación de HMB a HMB-CoA (4; 6; 16; 17; 20; 35; 36; 41; 43; 54). Una vez convertido en HMB-CoA, puede producirse metabolismo adicional, bien sea deshidratación de HMB-CoA a MC-CoA, o una conversión directa de HMB-CoA a HMGCoA (42), que provee sustratos para la síntesis intracelular de colesterol. Varios estudios han demostrado que el HMB se incorpora a la ruta sintética del colesterol (2-4; 16) y podría ser una fuente de colesterol para las nuevas membranas celulares que se utilizan para la regeneración de membranas celulares dañadas (29). Los estudios en humanos han demostrado que el daño muscular después del ejercicio intenso, medido por CPK plasmática elevada (creatina fosfoquinasa), se reduce con la suplementación con HMB. Se ha demostrado que el efecto protector de HMB se manifiesta por sí mismo durante al menos tres semanas con el uso diario continuado (14, 22, 23).

Estudios in vitro en músculos de rata aislada muestran que el HMB es un potente inhibidor de la proteólisis muscular (32), especialmente durante períodos de estrés. Estos hallazgos han sido confirmados en humanos; Por ejemplo, HMB inhibe la proteólisis muscular en sujetos que participan en entrenamiento de resistencia (26). Los resultados se han duplicado en muchos estudios (14; 22; 33; 46; 53) (9-11; 47; 48; 48). En células musculares C2C12, HMB atenúa el catabolismo inducido experimentalmente (por ejemplo,

Se han informado los mecanismos moleculares por los que HMB disminuye la descomposición de proteínas e incrementa la síntesis de proteínas (10, 44). En ratones que portan el tumor inductor de la caquexia MAC16, HMB atenuó la degradación de las proteínas mediante la subregulación de los activadores claves de la ruta ubiquitina-proteasoma (47). Adicionalmente, HMB atenuó la activación del factor inductor de proteólisis (PIF) y el aumento de la expresión génica de la ruta ubiquitina-proteasoma en los miotubos murínicos, reduciendo así la degradación de la proteína (48). PIF inhibe la síntesis de proteínas en los miotubos murínicos en un 50% y HMB atenúa esta depresión en la síntesis de proteínas (9). Eley et al demostraron que HMB incrementa la síntesis de proteínas por varios mecanismos, incluyendo la subregulación de la fosforilación eucariótica de factor de iniciación 2 (eIF2) a través de un efecto sobre la proteína quinasa dependiente de ARNs (PKR) y la sobreexpresión del objetivo mamífero de la ruta rapamicina/70-kDa ribosomal S6 quinasa (mTOR/p70^{S6K}). El resultado neto es una mayor fosforilación de la proteína de enlazante a 4E (4EBP1) y un incremento en el complejo eIF4G.eIF4E activo. La leucina comparte muchos de estos mecanismos con HMB, pero HMB parece ser más potente en la estimulación de la síntesis de proteínas (9).

El HMB también puede incrementar la síntesis de proteínas atenuando la ruta común que media los efectos de otros factores catabólicos como el lipopolisacárido (LPS), el factor de necrosis tumoral α /interferón- γ (TNF- α /IFN- γ) y la angiotensina II (Ang II) (10; 11). HMB actúa atenuando la activación de las caspasas-3 y -8, y la subsecuente atenuación de la activación de PKR y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la subregulación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK). Se sabe que la formación aumentada de ROS induce la degradación de la proteína a través de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. HMB realiza esta atenuación a través de la autofosforilación PKR y la subsecuente fosforilación de eIF2 α , y en parte, a través de la activación de la ruta mTOR.

Un informe reciente puso a prueba la hipótesis de que HMB, como la leucina, estimularía mTORc1 independiente de la señalización de PI3K en miotubos C2C12 (19). HMB estimuló la fosforilación de AKTSer473 (+129%), S6K1Thr389 (+50%) y 4EBP1Thr65/70 (+51%). HMB estimuló la señalización anabólica con mayor potencia que la leucina, por ejemplo S6K1Thr389 + 50% vs. +17%; respectivamente. Como se esperaba, la incubación de HMB con rapamicina (inhibidor de mTORc1) recortó los incrementos en señalización de mTORc1, pero no de fosforilación de AKT (+188%). Por el contrario, la incubación con LY290042 (inhibidor de PI3K) abolió incrementos inducidos por HMB tanto en AKT como en señalización mTORc1, lo que sugiere que HMB señala mTORc1 de una manera dependiente de PI3K. Estos datos sugieren que HMB, a pesar de ser un metabolito de leucina, señala a mTORc1 a través de mecanismos distintos de los de leucina.

Numerosos estudios han demostrado que una dosis efectiva de HMB es de 3,0 gramos al día como CaHMB (~ 38 mg/kg de peso corporal-día⁻¹). Como suplemento dietético, HMB se ha utilizado como la sal de calcio monohidratada, cuya fórmula empírica es Ca(HMB)₂·H₂O. Esta dosificación incrementa la masa muscular y las ganancias de fuerza asociadas con el entrenamiento de resistencia, mientras que minimiza el daño muscular asociado con el ejercicio extenuante (14, 26, 30, 33). HMB ha sido probado por seguridad, no mostrando efectos colaterales en jóvenes sanos o adultos mayores (15; 25). También se ha demostrado que HMB en combinación con L-arginina y L-glutamina es seguro cuando se complementa a pacientes con SIDA y cáncer (38).

Los estudios en humanos también han demostrado que la suplementación dietética con 3,0 gramos de CaHMB por día más aminoácidos atenúa la pérdida de masa muscular en diversas condiciones tal como el cáncer y el SIDA (5; 12). Un metanálisis de los suplementos para incrementar la masa magra y la fuerza con el entrenamiento con pesas mostró que HMB era uno de sólo 2 suplementos dietéticos que incrementaban la masa magra y la fuerza con el ejercicio (30). Más recientemente se demostró que el HMB y los aminoácidos arginina y lisina incrementaron la masa magra en una población de edad avanzada sin ejercicio durante un año de estudio.

La oxidación de la leucina se incrementa después del ejercicio, y los niveles óptimos de HMB durante y justo después del ejercicio se desean para la prevención óptima del daño muscular y subsecuente recuperación. Además, el proceso inflamatorio se estimula durante una lesión, que si no se controla es deletéreo y retrasa la cicatrización. La inflamación crónica y las citoquinas pro-inflamatorias han demostrado ser un factor subyacente y causante

importante en la enfermedad cardiovascular y la diabetes tipo II, así como en el asma, enfermedades autoinmunes, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y artritis reumatoide.

5 Los estudios en humanos han demostrado un efecto positivo del ejercicio de resistencia en la síntesis de proteínas musculares tan pronto como 1-2 horas después del ejercicio y duran hasta 48 horas (8, 34). Los estudios también han demostrado que el momento en que la disponibilidad de nutrientes es crítica para la estimulación máxima posterior al ejercicio de la síntesis de proteínas, así como la reducción de la ruptura de las proteínas (40). El momento más óptimo para el suministro de nutrientes parece estar dentro de las 2 horas posteriores al ejercicio. Dreyer al. (7) demostraron que la ingestión de una solución nutritiva rica en leucina en 1 h después de la recuperación posterior al ejercicio dio como resultado una mejora significativa de la ruta de señalización de mTOR y la síntesis de proteínas musculares.

10 La curva de disociación de CaHMB es idéntica a la del acetato de calcio (49), lo que da como resultado niveles pico de HMB en plasma que oscilan entre 60 y 120 minutos después de la ingestión dependiendo de la dosis dada. El tiempo hasta los niveles en plasma máximos después de una dosificación típica de 1 gramo fue de 2 horas (52), requiriendo así que el CaHMB se tomara antes del ejercicio para un beneficio máximo.

15 Por lo tanto, el momento de administración de HMB y el nivel de HMB en la sangre son importantes para la eficacia de HMB en el músculo. Existe la necesidad de un sistema de suministro más rápido y más eficiente para HMB.

Resumen de la invención

20 La invención se refiere a la administración de HMB en forma de ácido libre ("ácido HMB"). La administración usando ácido libre de HMB mejora la disponibilidad de HMB a los tejidos y por lo tanto provee un método más rápido y eficiente para obtener HMB a los tejidos que la administración de CaHMB. La toma oral o administración sublingual de un HMB de ácido libre asociado con una matriz da como resultado una absorción directa y rápida de HMB, ofreciendo un método de suministro mejorado que da como resultado una mayor disponibilidad de HMB para los tejidos.

25 En un ejemplo, el ácido libre de HMB se suministra directamente neutralizando el ácido libre de HMB en una matriz soluble tal como un gel. El ácido libre de HMB se administra oralmente o sublingualmente a una persona en una cantidad efectiva.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los niveles en plasma de CPK y LDH después de una sesión de ejercicio extenuante.

La figura 2 muestra la fuerza muscular y la mialgia subjetiva después de una sesión extenuante de ejercicio.

30 La Figura 3 muestra los niveles en plasma de HMB como se encuentran en el Ejemplo Experimental 1.

La Figura 4 muestra concentración pico de HMB en plasma y el tiempo hasta la concentración pico.

La Figura 5 muestra los niveles en plasma de HMB.

La Figura 6 muestra concentración pico de HMB en plasma y el tiempo hasta la concentración pico.

La Figura 7 muestra el porcentaje de la dosis de HMB excretada en la orina.

35 La Figura 8 muestra un régimen de tratamiento de la presente invención.

La Figura 9 muestra los cambios en CPK después de un episodio agudo de ejercicio excéntrico.

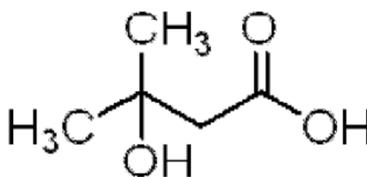
Descripción detallada de las realizaciones preferidas

40 La invención se refiere a un método de suministro de HMB a una persona, y específicamente a un método de administración de ácido HMB a una persona, de tal manera que la administración de HMB de ácido libre da como resultado un incremento en la efectividad de HMB durante la administración de otras formas de HMB, Incluyendo CaHMB. El uso de ácido HMB da como resultado la mejora de la disponibilidad de HMB a los tejidos de una persona. La administración de ácido HMB incrementa la efectividad para proteger contra el daño muscular y la

5 respuesta inflamatoria que acompaña durante la administración de HMB en sus otras formas. Además, la administración de ácido libre de HMB también puede preservar el músculo en las condiciones caquéticas y de emaciación y actuar para romper la inflamación, incluyendo la inflamación crónica que puede causar una serie de enfermedades, tal como las enfermedades cardiovasculares. El descubrimiento inesperado y sorprendente de que el ácido libre de HMB disminuye el daño muscular mejor que CaHMB indica que también puede disminuir la respuesta inflamatoria resultante del daño. La administración de ácido libre de HMB tiene aplicaciones de dispersión amplia como suplemento nutricional o médico y puede afectar a una gran parte de la población.

10 De acuerdo con la presente invención, el HMB se administra a humanos en su forma de ácido libre. El ácido libre de HMB puede estar asociado con un vehículo, tal como una matriz o un gel. En la realización preferida, el ácido libre de HMB se administra por ruta oral o sublingual, aunque cualquier medio de administración de HMB es apropiado. El ácido HMB está disponible comercialmente.

HMB en su forma ácida se denomina ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico, ácido β -hidroxi- β -metilbutírico o ácido β -hidroxiisovalárico y puede designarse "ácido HMB". La fórmula estructural es $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$ y la molécula es:



15 En la presente invención, el ácido HMB se administra a un humano en una cantidad efectiva. Una cantidad efectiva incluye un rango de aproximadamente 0.01 gramos a aproximadamente 0.2 gramos de ácido HMB por kilogramo de peso corporal en veinticuatro (24) horas. El ácido HMB también se puede administrar a un humano en una cantidad efectiva de aproximadamente 0.5 gramos a aproximadamente 30 gramos de ácido HMB por día. Una cantidad efectiva de ácido HMB dará como resultado un mayor incremento de los niveles en plasma de HMB y/o dará como resultado un tiempo más rápido para alcanzar los niveles pico en plasma de HMB en relación con la administración de una dosificación similar de CaHMB. El incremento en la efectividad con la administración de ácido HMB puede ser del 10%, 20%, 30%, 50%, 75%, 100%, 200%, 400%, 500% o mayor que la administración de una dosis similar de CaHMB. La comparación del ácido HMB con otras formas de HMB puede basarse en la efectividad o eficiencia de HMB usando índices estándar conocidos por los expertos en la técnica.

30 En los Ejemplos, el ácido HMB se administra como un gel soluble, aunque la invención no se limita al uso de un gel o matriz soluble con ácido HMB. El ácido HMB en cualquier forma farmacéuticamente aceptable, incluyendo pero no limitado a sólidos, tabletas, cápsulas y líquidos tales como soluciones intravenosas orales, está dentro del alcance de esta invención. El ácido HMB puede administrarse utilizando cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo pero no limitado a diversos almidones y soluciones salinas. En la realización preferida, una cantidad efectiva de ácido HMB se administra como dos o tres dosis diarias, aunque se entenderá que una dosis individual de una cantidad efectiva de ácido HMB por día está dentro del alcance de la invención, como sería cualquier otro número de dosis de HMB durante el día.

35 La administración de ácido HMB, más típicamente como una matriz soluble en ácido HMB tal como un gel, da como resultado una mejora significativa del efecto anabólico de HMB con reducciones marcadas en CPK sobre la administración de HMB como una sal, incluyendo CaHMB o administración de HMB en otras formas tales como un éster o lactona. En una realización, la administración de gel de ácido HMB da como resultado una duplicación del pico en plasma de HMB en aproximadamente del tiempo como la administración de una dosificación similar de CaHMB, y tiene un 25% de eficacia mejorada de suministro, medida por el aclaramiento en plasma sobre una dosificación similar de CaHMB.

45 Este método de suministro tiene aplicaciones de dispersión amplia. Los usos o beneficios conocidos de HMB incluyen, pero no se limitan a, retención de nitrógeno mejorada y ahorro de proteínas, mejorando la masa corporal magra, mejorando la función muscular y/o el rendimiento muscular, disminuyendo el daño muscular en el músculo sometido a estrés o daño, disminuyendo la respuesta inflamatoria después de que el músculo se somete a estrés o daño, mejora la respuesta inmune del cuerpo después del estrés o daño, el tratamiento de la emaciación asociada con la enfermedad (como la emaciación asociada con cáncer, enfermedad pulmonar crónica, la edad, enfermedad

renal crónica, hospitalización a largo plazo o SIDA), mejorar un perfil lipídico tal lipoproteína de baja densidad (LDL) a lipoproteína de alta densidad (HDL) y mejorar el estado emocional de una persona. Una forma más efectiva y más eficiente de administrar HMB tiene aplicaciones de dispersión amplia en todos estos usos conocidos de HMB.

5 Aunque el uso de ácido HMB se ha establecido anteriormente, se pensó que HMB en forma de ácido libre era equivalente a HMB en la sal de calcio y otras sales como formas de administración propuestas en la técnica anterior. Las diferencias en la efectividad de ácido HMB y las sales de HMB no se probaron previamente.

10 Previamente, existían numerosos obstáculos tanto para pruebas extensas como para la utilización comercial de la forma de ácido libre de HMB, y como se pensaba que no había diferencia, la sal de calcio se adoptó como una fuente comercial de HMB. Hasta hace poco tiempo, el empaque y, en particular, la distribución de suplementos dietéticos se ha adaptado mejor para manipular nutrientes en forma de polvo y por lo tanto la sal de calcio de HMB fue ampliamente aceptada. El ácido HMB es un líquido y mucho más difícil de suministrar o incorporar en los productos.

15 A diferencia de otras sales de calcio, se ha demostrado que los componentes de calcio y HMB de la molécula se disocian muy fácilmente, por lo tanto, agregando a la suposición de que no habría diferencia fisiológica entre el ácido libre de HMB y la sal de calcio de HMB. (19)..(49).

20 Adicionalmente, la formación y cristalización de la sal de calcio de HMB se había utilizado como una etapa de purificación final en el proceso de fabricación. Un compuesto en particular que la cristalización sirvió para limitar fue ácido 3,3-dimetil acrílico. Este compuesto añade un sabor muy sobresaliente lo que es difícil de enmascarar. En la actualidad, el proceso de fabricación de HMB ha permitido que el ácido libre HMB sea producido en una pureza que permita la ingestión oral del ácido libre de HMB. Además de disponer actualmente de una fuente comercial suficientemente pura para la ingestión oral, el ácido HMB necesita ser regulado para la ingestión oral, un proceso que se determinó sólo recientemente debido a los factores mencionados anteriormente que impidieron el uso previo de ácido HMB.

25 Debido a que el calcio y HMB en la sal de calcio se asociaron de forma poco clara (49), se pensó previamente que no habría diferencia en la administración oral de HMB como ácido libre o como una sal de calcio (19). Como se muestra en el Ejemplo 1, no solamente hay una sorprendente diferencia en los niveles en plasma alcanzados con la administración oral de ácido HMB, sino que hay un incremento del 25% en la eliminación plasmática lo que indica una mayor utilización de HMB por los tejidos con efectos mejorados resultantes sobre la masa y la función muscular. Cuando se da en equivalentes molares, HMB en forma de ácido libre da como resultado el doble del nivel de HMB en plasma en aproximadamente un cuarto (1/4") el tiempo en comparación con la sal de calcio de HMB. El efecto mejorado sobre el músculo se muestra claramente en el Ejemplo 2 en que el HMB administrado en forma de ácido libre es más protector que el CaHMB cuando el músculo se somete a ejercicio agudo.

35 Aunque se sabe que CaHMB es soluble en y se disocia fácilmente en soluciones acuosas de pH neutro a ácido, el experto en la técnica predeciría un corto tiempo de retraso en apariencia debido a esta etapa de disociación. CaHMB administrado en una cápsula de gelatina tiene un tiempo de disolución de entre 10 y 15 minutos en el intestino. Por lo tanto, un experto en la técnica esperaría una absorción similar y por tanto niveles pico en plasma de HMB si el HMB se administró como CaHMB o como ácido HMB, sin embargo, se retrasó ligeramente por las diferencias descritas. Contrario a estas expectativas, sin embargo, se encontró que había una diferencia significativa en plasma pico entre las dos formas. En algunos casos, la diferencia en los tiempos de plasma pico fue noventa (90) minutos, que es varias veces más largo de lo que debería ser explicado por la disolución de la cápsula y la disociación de la CaHMB.

40 Un experto en la técnica también predeciría picos y áreas plasmáticas similares bajo la curva ya que una cantidad similar del nutriente HMB se estaba liberando en el intestino con la curva de CaHMB desplazada más lejos en el tiempo. Un resultado inesperado de la administración de ácido HMB es la duplicación de los niveles pico en plasma de HMB.

45 Un resultado adicional inesperado es el mayor aclaramiento (utilización) de HMB una vez en el plasma. Muchos nutrientes tienen perfiles en plasma y urinarios similares a menos que exista un mecanismo de conservación en el riñón para ese nutriente. Ninguno se conoce actualmente para HMB y por lo tanto un experto en la técnica podría suponer que un porcentaje mucho mayor de la dosificación se excretaría en la orina con la duplicación del pico en plasma en las concentraciones de HMB. Una vez más, esto no se observó y es un hallazgo inesperado. Esto junto

con la mayor tasa de aclaramiento muestran una mejor utilización de HMB por los tejidos lo cual fue de nuevo un hallazgo sorprendente.

5 Como se muestra en los Ejemplos Experimentales, y específicamente en el Ejemplo 2, la administración de ácido HMB es efectivo más rápidamente para minimizar el daño muscular después del ejercicio que CaHMB. Este segundo ejemplo muestra un beneficio que no se pudo predecir directamente a partir de los hallazgos del Ejemplo 1.

El método de esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos experimentales.

Parte experimental

Ejemplo 1 Absorción de gel de ácido HMB en comparación con CaHMB en forma de cápsula

Materiales y métodos

10 Sujetos humanos. En el estudio 1, se estudiaron cuatro hombres y cuatro mujeres de edad universitaria. En el estudio 2, se estudiaron cuatro hombres y cuatro mujeres de edad universitaria adicionales. Los protocolos para ambos estudios fueron aprobados por el IRB de Iowa State University y cada sujeto dio su consentimiento informado para participar en el estudio. Debido a la naturaleza de los tratamientos, ni los sujetos ni los investigadores pudieron mantenerse a ciegas.

15 Tratamientos. Los mismos tratamientos se dieron a los sujetos en ambos grupos de estudio. Los tres tratamientos se dieron en orden aleatorio a cada sujeto con al menos un período de lavado de una semana entre los tratamientos. Los tratamientos fueron suministrados por Metabolic Technologies, Inc. (MTI, Ames, IA) y se prepararon con ingredientes de calidad alimentaria. Se administró a los sujetos un gramo de CaHMB o el HMB equivalente en ácido libre en forma de gel. Las cápsulas de CaHMB se obtuvieron de un fabricante comercial de suplementos (Optimum Nutrition, Aurora, IL) mientras que el gel de ácido HMB se preparó en los laboratorios MTI. En resumen, el ácido HMB se ajustó a un pH 4.5 con carbonato de potasio (K_2CO_3) y se añadieron entonces sabores y endulzantes. La cápsula de CaHMB de 1.0 g se tomó con 355 ml de agua (aproximadamente 12 onzas). La dosificación de gel de ácido libre fue de 0.80 g y fue equivalente al ácido libre contenido en el CaHMB en la cápsula. Los tratamientos con gel de ácido libre se tragaron (FASW) o se mantuvieron sublinguales durante 15 segundos y luego se tragaron (FASL). FASW consistió en expeler toda la dosis en la boca en una jeringa de 3 ml, tragar, y luego seguir esto con 355 ml de agua. Los sujetos FASL fueron instruidos para colocar toda la dosis bajo la lengua y mantener la dosis durante 15 segundos antes de tragar. Después se enjuagaron y siguieron la dosis con 355 ml de agua.

30 Diseño de estudio 1. Para el estudio 1 los sujetos se reportaron al laboratorio en la mañana después de un ayuno durante la noche. Antes de la ingestión de uno de los tratamientos suplementarios, se insertó un catéter de polietileno estéril flexible en una vena del antebrazo utilizando procedimientos estériles y se extrajo una muestra de sangre de pre-ingestión. Se tomaron muestras de sangre subsecuentes a 0, 2, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la ingestión del tratamiento. Se separó el plasma y se almacenaron las muestras congeladas a $-70^\circ C$ para el análisis de la concentración de HMB. Además, se utilizó una parte de las muestras de sangre de la pre-ingestión y de 180 minutos para las mediciones (LabCorp, Kansas City, MO) de glucosa, ácido úrico, nitrógeno úrico en sangre (BUN), creatinina, sodio, potasio, cloruro, dióxido de carbono, fosforoso, proteína, albúmina, globulina, relación de albúmina:globulina, bilirrubina total, bilirrubina directa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT) TIBC), capacidad de unión a hierro, (TIBC) capacidad de unión a hierro insaturado (UIBC), hierro, saturación de hierro, colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y relación de colesterol. También se realizó un hemograma completo (CBC) antes y después del período de tratamiento de 180 min. Los sujetos también completaron un breve cuestionario para reportar cualquier síntoma físico (como náusea, dolor de cabeza, etc.) que pudieran haber experimentado durante el experimento.

45 Diseño de estudio 2. El estudio 2 se realizó similar al estudio 1 con las siguientes modificaciones. En el estudio 2, se midieron los niveles en plasma de HMB durante 1440 min (24 h) y se realizó también la recolección total de orina para medir la excreción urinaria de HMB durante este período. Después de la muestra de sangre de 180 minutos, se permitió a los sujetos abandonar el laboratorio y se les indicó que regresaran al laboratorio para muestras de sangre adicionales a 360, 720 y 1440 minutos después de la ingestión del suplemento. Como en el estudio 1, cada sujeto tomó cada uno de los tratamientos con al menos un período de lavado de una semana entre los tratamientos. Las muestras se almacenaron nuevamente congeladas a $-70^\circ C$ para el análisis de concentraciones de HMB en plasma y en orina. Las muestras de sangre de pre-ingestión, de 180 min y de 1440 min, se ensayaron nuevamente para las

5 mismas mediciones ya para el estudio 1. Los sujetos recibieron un almuerzo estandarizado después del muestreo de sangre de 180 minutos y se les indicó comer esto aproximadamente 240 minutos después de la ingestión. Después de la muestra de sangre de 720 min, a los sujetos se les indicó que comieran una comida normal de la noche antes de las 10 pm. Los sujetos se repotaron de nuevo al laboratorio a la mañana siguiente para la muestra de sangre de 1440 min en ayunas. Se proveyó un recipiente de recolección de orina y los sujetos recolectaron toda la orina producida durante el período experimental de 24 h experimental. La orina se almacenó refrigerada cuando ya no estaba siendo recogida. Se midieron los volúmenes de orina y se tomaron muestras de la recolección total de orina y se almacenaron congeladas a -70°C hasta que se analizó para HMB.

10 Análisis de HMB. HMB en plasma y orina se analizó por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) como se describió anteriormente. (27)

Cálculos y estadísticas. Las áreas bajo las curvas se calcularon para cada sujeto usando el método trapezoidal que suma el área sobre la línea base (51). Se calculó la vida media del HMB en plasma para el estudio 2. Se usaron las siguientes ecuaciones:

$$k = (\ln(C_{\text{pico}}) - \ln(C_{\text{depresión}})) / T_{\text{intervalo}}$$

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

15 Para C_{pico} se usaron concentraciones pico en plasma para cada sujeto. Las concentraciones de depresión, $C_{\text{depresión}}$ fueron las concentraciones medidas a 720 min, debido a que las concentraciones en plasma de 720 min no fueron significativamente diferentes de la línea de base. T_{pico} fue el momento en que se midió C_{pico} y $T_{\text{intervalo}}$ es el tiempo de T_{pico} hasta el tiempo en $C_{\text{depresión}}$ (720 min). Se supone que el compartimiento de fluido extracelular es 20% del peso corporal y se calcula usando la ecuación 3 a continuación (1). La depuración en plasma de HMB se calculó entonces multiplicando el compartimiento de fluido extracelular, V_d , por la constante de eliminación, K_{el} , como se muestra en la ecuación 4 {Thalhammer, 1998 9588/id}

20

$$V_d = \text{Peso corporal}(0.20)$$

$$\text{Depuración} = V_d(K_{el})(50).$$

Los datos se analizaron utilizando un diseño de cruce con Proc GLM en SAS. (45) Para el muestreo cronometrado de HMB en plasma se utilizó un modelo polinomial de medidas repetidas. El modelo incluyó sujeto, orden y efectos principales del tratamiento y el tiempo de interacción del tratamiento cuando fue apropiado. Para otros parámetros se usó también Proc GLM con sujeto, orden y efectos principales del tratamiento y se informaron los valores de p para el efecto principal del tratamiento. Se determinó la significancia estadística para $p < 0.05$ y se determinó una tendencia para $0.05 < p < 0.10$.

25

Resultados

30 Los resultados de los estudios se muestran en las Figs. 1-7. La Figura 1 muestra los niveles en plasma de CPK y LDH después de una sesión de ejercicio extenuante. La figura 2 muestra la fuerza muscular y la mialgia subjetiva después de una extenuante sesión de ejercicio. La Figura 3 muestra los niveles en plasma de HMB en el estudio 1. Los valores son medias +/- SEM, n = 4 hombres y 4 mujeres. * = p,0.05, + = p,0.001, + + = p,0.0001 para tratamientos con ácido libre versus cápsulas de CaHMB. La figura 4 muestra la concentración pico en plasma de HMB en el Estudio 1 y el tiempo hasta la concentración pico después de que se ingirió una sola dosis de ya sea CaHMB, gel de ácido HMB tragadas (FASW o gel de ácido HMB mantenido sublingual y luego se tragó (FASL) ** = p,0.0002. La Figura 5 muestra los niveles en plasma de HMB en el estudio 2. Los valores son medias +/- SEM, n = 4 hombres y 4 mujeres. * = p,0.05, + = p,0.01, + + = p,0.0001. La Figura 6 muestra la concentración pico en plasma de HMB en el Estudio 2 y el tiempo hasta la concentración pico después de una sola dosis de ya sea CaHMB, gel de ácido libre de HMB tragado (FASW, o gel de ácido libre de HMB retenido sublingual y luego tragado (FASL) ** = p < 0.0002 para concentración y p < 0.0001 para el tiempo. La Figura 7 muestra el porcentaje de la dosis de HMB excretada en la orina durante las 24 h posteriores a la ingestión y el porcentaje relativo de la dosis retenida * = p < 0.002.

35

40

Características del sujeto. La Tabla 1 muestra las características del sujeto para los estudios 1 y 2. Cada estudio fue balanceado para el género y cada grupo de tratamiento mantuvo pesos constantes durante los 3 períodos de prueba. En cada estudio, todos los sujetos completaron los 3 protocolos de prueba. No se reportaron efectos adversos en el tratamiento, tales como náuseas después de tomar los tratamientos, en ninguno de los estudios.

5 Resultados del estudio 1 (Tablas 2-4). La Tabla 2 ilustra las concentraciones pico en plasma (C_{pico}) y el tiempo para alcanzar las concentraciones pico en plasma (t_{pico}). CaHMB tomado en cápsulas dio como resultado un nivel pico de HMB en plasma de 131 ± 10 nmol/mL, mientras que el HMB tomado por vía oral por suministro FASW en gel de ácido libre o FASL dio como resultado significativamente mayor (259 ± 24 y 231 ± 21 nmol/mL respectivamente $p < 0.0001$) y picos anteriores (33.1 ± 4.6 y 36.3 ± 1.3 min, respectivamente) en los niveles en plasma de HMB en comparación con CaHMB por cápsula a 121.9 ± 15.6 h ($p < 0.0001$). A los 180 minutos, el HMB en plasma para todos los métodos de suministro seguía siendo elevado por encima de la línea base, y no hubo diferencias de tratamiento entre los tres grupos. Por consiguiente, las Áreas bajo la Curva (AUC) para los niveles en plasma de HMB después de los 3 tratamientos se muestran también en la Tabla 2. El HMB administrado en forma de gel de ácido libre dio como resultado mayores áreas bajo la curva (AUC) del 97% y 91% para FASW y FASL, respectivamente ($p < 0.0001$). No hubo diferencias entre el gel de ácido HMB suministrado por FASW o por FASL

La Tabla 3 muestra las químicas sanguíneas para el estudio 1. No hubo diferencias significativas en el tratamiento del efecto principal para ninguno de los puntos o diferencias de tiempo medidos. La Tabla 4 muestra la hematología sanguínea medida en el estudio 1. El grupo FASW tuvo una disminución significativamente mayor en el número absoluto de linfocitos durante el período de medición ($p < 0.04$), debido principalmente al hecho de que el grupo FASW tendía a tener un mayor número de linfocitos al comienzo del estudio ($p < 0.09$). No hubo diferencias significativas en el número de linfocitos al final del estudio y todos los medios estaban dentro de los límites normales para el número de linfocitos.

Resultados del estudio 2 (Tablas 2, 5-7). El estudio 2 se realizó para observar el HMB en plasma durante un período de 24 horas, así como para medir las pérdidas urinarias durante este mismo período de tiempo. Al igual que en el estudio 1, se observó un aumento rápido de HMB en plasma y significativamente mayor con HMB administrado en forma de gel de ácido libre tanto para FASW como para FASL que con CaHMB en forma de cápsula. A los 180 minutos, todos los tratamientos dieron como resultado niveles de HMB en plasmas similares (aproximadamente 110 nmol/ml). CaHMB por cápsula mantuvo un nivel ligeramente más alto de HMB plasma a 360 y 720 min ($p < 0.05$).

La Tabla 5 lista las concentraciones pico de HMB en plasma (C_{pico}), el tiempo hasta las concentraciones pico de HMB en plasma (t_{pico}) y la vida media de HMB en plasma. El nivel de HMB en plasma para CaHMB por cápsula alcanzó un pico de 131.2 ± 6.0 nmol/mL a 135.0 ± 17.0 min, mientras que FASW y FASL dieron como resultado picos de HMB en plasma mayores ($p < 0.0003$) en tiempo más corto ($p < 0.0001$), 238.6 ± 16.0 nmol/ml a $41.965,8$ min y $247.6619,8$ nmol/ml a $38.862,6$ min para FASW y FASL, respectivamente.

La vida media en plasma como se muestra en la Tabla 5 para CaHMB por cápsula fue 3.17 ± 0.22 h. La vida media de HMB FASW y HMB FASL fueron 2.50 ± 0.13 y 2.51 ± 0.14 h, respectivamente ($p < 0.004$). El área bajo la curva y el HMB urinario medido en el estudio 2 se muestran también en la Tabla 5. Durante el período de 24 horas, el AUC para HMB administrado como gel de ácido libre fue significativamente mayor en 15.4 y 14.3% para FASW y FASL, respectivamente que para CaHMB administrado en cápsulas ($p < 0.001$). A pesar del incremento pico significativo de HMB en plasma y AUC, las pérdidas urinarias de HMB no fueron significativamente mayores para los tratamientos con gel de ácido libre; las pérdidas urinarias de HMB fueron 14.7 ± 2.0 , 17.8 ± 2.9 y $17.2 \pm 2.5\%$ de la dosificación inicial perdida para CaHMB, FASW y FASL, respectivamente. Hubo un incremento de aproximadamente 25% en el aclaramiento de HMB con la forma de gel de ácido libre en comparación con la forma CaHMB ($P < 0.003$).

En la Tabla 6 se muestran las químicas sanguíneas medidas durante el estudio 2 y la hematología hemática medida en el estudio 2 se muestra en la Tabla 7. El análisis estadístico del cambio en los parámetros durante el período de medición de 24 h no mostró cambios estadísticos significativos ($p < 0.05$) para cualquiera de los valores de la química o hematología medidos. Hubo una fuerte tendencia a la diferencia con el cloruro ($p < 0.06$). FASL mostró un mayor incremento durante el período en comparación con FASW; sin embargo, ni FASW ni FASL fue significativamente diferente de CaHMB. También se observó una tendencia con el sodio donde FASW mostró un incremento mayor durante el período de medición que FASW o CaHMB ($p < 0.07$). Las medias para el cloruro y el sodio durante el período del estudio estaban bien dentro de valores normales.

Discusión

Es claro a partir de los presentes estudios que la administración oral o sublingual de HMB en forma de gel de ácido libre dio como resultado incrementos más rápidos y sostenidos de HMB en plasma que cuando se comparó HMB administrado como la sal de calcio (CaHMB) en una cápsula de gelatina dura. La administración de gel de ácido libre de HMB dio lugar a incrementos significativos (promedio + 14.8%) en el AUC para HMB en plasma sin ningún cambio mayor en la vida media de HMB en plasma o pérdidas urinarias. Combinado esto dio como resultado una depuración incrementada significativa de HMB y la utilización por los tejidos que fue un 25% mayor que la de la forma CaHMB. Los datos muestran la eficiencia mejorada de esta forma de suministro de HMB.

Los hallazgos de este estudio relacionados con la cinética en plasma del suministro de CaHMB coinciden con los informados previamente por Vukovich et al. (52) Hay congruencia de los datos relacionados con los niveles pico en plasma, el tiempo hasta el pico y la vida media en plasma, se produjeron a pesar de las diferencias significativas en el modo de suministro de CaHMB Entrega de CaHMB (cuatro cápsulas de 250 mg por Vukovich et al vs. 1 cápsula de gramo en los presentes estudios). Curiosamente, el suministro de HMB como ácido libre en forma de gel dio como resultado niveles pico más rápidos (casi 90 minutos antes con el uso de la forma de ácido libre), pero vidas medias similares a pesar de que los niveles en plasma alcanzaron casi el doble de los obtenidos con la administración oral de CaHMB. Varios estudios han apoyado el uso de HMB como suplemento nutricional durante el ejercicio. Se ha demostrado que HMB disminuye la proteína muscular y la ruptura de membrana (22, 23, 26) y para potenciar la síntesis de proteínas. (10) Por lo tanto, sería ventajoso tener altos niveles de HMB en plasma durante el período de ejercicio, y tener la retención de HMB tan buena como o incluso mejor que la informada anteriormente (26; 29; 52). En este sentido, la administración oral de CaHMB necesitaría administrarse al menos 2 horas antes de cualquier sesión estresante sería de ejercicio, mientras que el gel de ácido libre de HMB puede administrarse antes de la sesión de ejercicio y tener un efecto casi inmediato.

El suministro de la forma de ácido libre de HMB también se asoció con retención significativamente mayor de HMB. La administración de la forma de gel de ácido libre dio como resultado un incremento significativo en AUC sin incrementar significativamente la excreción urinaria lo que indicaría una mayor retención y utilización de HMB por los tejidos en comparación con la forma de CaHMB. La cantidad estimada de HMB retenida fue 25% mayor con el gel de ácido HMB en comparación con la forma de CaHMB basada en la eliminación de plasma. Estudios previos de Vukovich et al demostraron que el suministro oral de 3 gramos de CaHMB dio como resultado niveles pico en plasma 3 veces superiores a los obtenidos con una dosis de 1 gramo (52). Nissen et al demostraron una respuesta dependiente de la dosis a la administración oral de CaHMB dada dos veces al día a bien sea 1.5 o 3 gramos por día. Se demostró que la dosis óptima de CaHMB es de 3.0 gramos por día, lo que resulta en una disminución de la liberación de creatina quinasa (CK), un indicador de daño muscular y 3-metilhistina, un indicador de la ruptura de las proteínas (26). Hallazgos similares fueron informados por Gallagher quien también mostró que la administración diaria de 6 gramos por día sería más beneficiosa que 3 gramos por día (14). En conjunto, los estudios anteriores indican un beneficio de tener más HMB disponible para los músculos durante el ejercicio.

El suministro de HMB por gel de ácido libre da como resultado un pico más rápido y mayor en los niveles en sangre de HMB, así como niveles igualmente sostenidos cuando se compara con CaHMB administrado en una cápsula. Esta forma de suministro es igualmente segura como las que se encuentran actualmente y previamente (15; 25) con la administración oral de CaHMB.

Tabla 1. Descriptor de sujetos

	Tratamiento		
	Cápsula de CaHMB	Gel de ácido HMB Tragar	Gel de ácido HMB Sublingual
	Estudio 1		
Género, masculino/femenino	4/4	4/4	4/4
Edad, Peso corporal y, kg	23.8±1.3	23.8±1.3	23.8±1.3
Todos	68.5±3.9	68.5±3.8	68.6±4.0
Mujeres	63.2±4.5	63.5±4.5	63.5±4.9
Hombres	73.7±5.6	73.5±5.6	73.8±5.9

	Estudio 2			
	Género, masculino/femenino	4/4	4/4	4/4
Edad, Peso corporal y, kg	22.4±1.0	22.4±1.0	22.4±1.0	
Todos	72.0±4.2	72.4±4.1	72.3±4.1	
Mujeres	66.8±3.2	67.4±3.3	67.0±3.5	
Hombres	77.2±7.2	77.4±7.2	77.7±6.9	

Tabla 2. Estudio 1 de Área Bajo la Curva, concentración pico (C_{pico}) y tiempo para alcanzar la concentración pico (t_{pico}). Estudio 1 Tratamiento¹

	CaHMB	Gel de ácido libre Tragar	Gel de ácido libre Sublingual	Valor p
C_{pico} , nmol/mL	131.2±10.1	259.1±23.9	231.2±21.0	0.0001
t_{pico} , min	121.9±15.6	33.1±4.6	36.3±1.3	0.0001
AUC, nmol/180 min	13,997±1,534	27,532±1,742	26,778±1,980	0.0001

¹Media±SEM.

²Valor P para diferencias de tratamiento.

Tabla 3. Estudio 1.1 de Química en sangre

	CaHMB			Gel de ácido libre Tragar			Gel de ácido libre Sublingual			Valor p ²
	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	
Glucosa, mg/dL	72.6 ±1.6	76.4 ± 3.2	5.2%	70.5±1.7	73.3±4.1	3.9%	74.1±1.7	77.4±2.5	4.4%	
Ácido úrico, mg/dL	4.5±0.3	4.5±0.4	-1.4%	4.9±0.4	4.9±0.4	0.8%	4.0±0.4	4.0±0.5	-2.2%	
Nitrogeno úrico en sangre, mg/dL	12.1±1.0	11.3±0.9	-7.2 %	15.4±1.6	14.4±1.5	-6.5%	14.4±0.8	12.9±0.8	-10.4%	
Creatinine, mg/dL	0.9±0.1	0.9±0.1	0.5%	1.0±0.1	0.9±0.1	-4.7%	1.0±0.1	1.0±0.04	-1.5 %	
Sodio, mEq/L	139.1±0.5	139.4±0.8	0.2%	138.5±1.1	138.3±0.9	-0.2%	139.3±0.8	137.8±0.9	-1.1 %	
Potasio, mEq/L	4.1±0.1	4.7±0.2	13.4%	4.2±0.1	4.6±0.3	11.4%	4.0±0.03	4.5±0.1	10.6%	
Cloruro, mEq/L	103.3±0.6	103.1±0.7	-0.1%	103.6±0.8	103.3±0.5	-0.4%	102.9±0.6	102.4±1.1	-0.5%	
CO ² , mEq/L	23.4±0.6	24.8±0.5	5.9%	22.4±0.7	24.3±0.5	8.1%	24.0±0.5	24.3±0.6	1.0%	
Fósforo, mg/dL	3.9±0.2	3.5±0.3	-10.8%	4.0±0.1	3.4±0.1	-15.6%	4.1±0.05	3.5±0.2	-13.2%	
Proteína, g/dL	6.3±0.2	6.5±0.3	3.2 %	6.2±0.2	6.3±0.2	1.4%	6.3±0.2	6.4±0.2	1.6%	
Albumina, g/dL	4.0±0.1	4.1±0.1	0.3%	4.0±0.2	4.1±0.2	1.9%	4.1±0.1	4.1±0.2	1.5%	
Globulina, g/dL	2.3±0.2	2.5±0.2	8.2%	2.2±0.1	2.2±0.1	0.6%	2.3±0.2	2.3±0.1	1.6%	
Relación ² A:G	1.8±0.1	1.7±0.1	-8.9%	1.9±0.1	1.9±0.1	0.0%	1.9±0.1	1.8±0.1	-2.0%	
Bilirubina Total , mg/dL	0.5±0.07	0.5±0.08	7.9 %	0.4±0.05	0.5±0.07	23.3%	0.4±0.05	0.5±0.05	22.6%	
Bilirubina Directa, mg/dL	0.1±0.02	0.1±0.01	5.8%	0.1±0.01	0.1±0.01	7.9%	0.1±0.01	0.1±0.01	8.6%	
Alcalina Fosfatasa, IU/L	66.5±6.5	68.4±8.4	2.8%	63.9±5.8	64.4±6.7	0.8%	66.0±6.3	66.8±6.8	1.1%	
Lactato Deshidrogenasa, IU/L	160.9±9.5	165.6±10.7	3.0%	168.8±10.4	166.3±11.1	-1.5 %	164.8±12.5	167.3±12.2	1.5%	
Aspartato Aminotransferasa, IU/L	21.4±1.5	22.4±1.8	4.7 %	24.0±2.2	23.1±2.0	-3.6%	28.0±7.9	28.3±8.2	0.9%	
Alanina Aminotransferasa, IU/L	14.1±1.5	15.6±2.0	10.6%	15.9±1.5	15.6±1.3	-1.6%	17.4±2.7	17.3±2.7	-0.7%	
Gamma-glutamil	13.8±0.9	13.1±0.9	-4.5 %	14.4±1.6	13.5±1.1	-6.1 %	13.3±1.2	13.4±1.2	0.9%	
Capacidad de enlazamiento a hierro, mg/dL	330.4±32.9	342.8±35.9	3.7 %	328.6±31.0	333.4±35.2	1.4%	328.0±32.8	339.5±30.8	3.5%	
UICB, mg/dL	247.1±45.0	249.8±47.7	1.1%	243.1±47.4	237.1±49.2	-2.5%	244.8±42.3	244.9±39.5	0.1%	
Hierro, mg/dL	83.3±16.7	93.0±16.8	11.7%	85.5±19.2	96.3±17.3	12.6%	83.3±16.4	94.6±16.6	13.7%	
saturación de hierro, %	29.9±9.5	31.1±8.9	4.2 %	30.6±9.4	33.5±8.4	9.4%	29.1±9.0	30.9±8.5	6.0%	
Colesterol Total , mg/dL	153.4±9.1	153.9±9.7	0.3%	153.5±5.3	153.3±5.6	-0.2%	154.4±6.9	155.5±5.8	0.7%	
Triglicéridos, mg/dL	80.4±11.6	71.6±11.2	-10.9%	91.3±17.0	87.5±14.8	-4.1%	91.8±16.1	83.8±15.8	-8.7%	
HDL, mg/dL	51.3±3.2	53.1±3.8	3.7 %	46.9±3.4	48.5±3.7	3.5%	48.6±4.6	49.3±4.3	1.3%	
LDL, mg/dL	86.1±5.3	8±5±5.7	0.4%	88.4±3.0	85.6±4.1	-3.1 %	87.5±5.7	89.4±4.9	2.1%	
Relación de colesterol	3.0±0.1	3.0±0.1	-2.5 %	3.4±0.2	3.3±0.3	-3.3%	3.3±0.2	3.3±0.2	-0.4%	

1Mediat Error estándar de la media

2Valor P para el efecto de tratamiento de la diferencia en los valores de inicio y finalización indicados por % de cambio para cada tratamiento.

Tabla 4. Estudio 1.¹ de valores hematológicos

	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	Valor P ²
WBC, x10 ³ /µL	6.4±0.4	6.4±0.7	0.3%	6.7±0.5	6.1±0.3	-10.2%	6.6±0.4	6.3±0.4	-4.2%	0.39
RBC, x10 ³ /µL	4.3±0.2	4.3±0.2	1.0%	4.2±0.2	4.2±0.2	0.1%	4.2±0.2	4.3±0.2	1.7%	0.51
Hemoglobina, g/dL	13.3±0.4	13.4±0.5	1.2%	13.1±0.5	13.0±0.5	-0.4%	13.1±0.6	13.3±0.6	1.4%	0.54
Hematocritos, %	38.3±1.1	38.7±1.3	1.2%	37.6±1.6	37.8±1.5	-0.1%	37.8±1.6	38.5±1.7	2.0%	0.44
MCV, fL	90.0±1.5	90.4±1.5	0.4%	90.1±1.3	90.0±1.5	-0.1%	89.6±1.6	89.9±1.7	0.3%	0.57
MCH, pg	31.2±0.6	31.3±0.6	0.3%	31.2±0.7	31.4±0.8	0.7%	31.0±0.5	31.0±0.5	0.0%	0.76
MCHC, g/dL	34.7±0.1	34.7±0.2	0.1%	34.7±0.3	34.6±0.3	-0.3%	34.7±0.2	34.5±0.2	-0.6%	0.64
RDW, %	13.1±0.2	13.1±0.2	0.1%	13.2±0.2	13.2±0.3	0.4%	13.2±0.2	13.3±0.2	0.9%	0.73
Plaquetas, x10 ³ /µL	209.0±14	202.9±16	-2.9%	195.0±31.5	202.4±25.	3.8%	221.3±20.8	213.9±19.1	-3.3%	0.31
Neutrófilos, %	50.3±3.3	56.1±3.8	11.7%	46.0±2.8	52.9±2.2	14.9%	47.4±2.2	55.4±2.9	16.9%	0.78
Linfocitos, %	39.6±2.8	34.0±3.4	-14.2%	43.8±2.8	37.4±1.9	-14.6%	43.0±1.4	35.5±2.1	-17.4%	0.55
Monocitos, %	7.1±0.9	7.4±0.7	3.5%	7.6±0.7	7.0±0.6	-8.2%	7.0±1.0	7.1±0.7	1.8%	0.85
Eosinófilos, %	2.5±0.4	2.1±0.6	-15.0%	2.5±0.3	2.4±0.4	-5.0%	2.4±0.4	1.8±0.3	-26.3%	0.41
Basófilos, %	0.5±0.2	0.4±0.2	-25.0%	0.1±0.1 ^a	0.4±0.2	200.0%	0.3±0.2	0.3±0.2	0.0%	0.14
Neutrófilos, x10 ³ /µL	3.3±0.4	3.8±0.7	14.5%	3.0±0.2	3.3±0.2	10.9%	3.1±0.3	3.5±0.3	11.6%	0.85
Linfocitos, x10 ³ /µL	2.5±0.1	2.1±0.2	-15.6%	3.1±0.3	2.2±0.1	-29.1%	2.8±0.2	2.2±0.2	-22.1%	0.04
Monocitos, x10 ³ /µL	0.5±0.1	0.5±0.1	8.3%	0.5±0.1	0.5±0.04	-7.7%	0.5±0.1	0.5±0.05	0.0%	0.98
Eosinófilos, x10 ³ /µL	0.2±0.04	0.1±0.04	-21.4%	0.2±0.04	0.1±0.02	-41.2%	0.2±0.03	0.1±0.02	-28.6%	0.47
Basófilos, x10 ³ /µL	0.05±0.0	0.04±0.0	-25.0%	0.01±0.01 ^a	0.04±0.02	200.0%	0.03±0.02	0.03±0.02	0.0%	0.14

¹Media± Error estándar de la media

²Valor P para el efecto de tratamiento de la diferencia en los valores de inicio y finalización indicados por % de cambio para cada tratamiento.

Tabla 5. Estudio 2 de Área Bajo la Curva de HMB en plasma, concentración pico (C_{pico}), tiempo hasta la de concentración pico (t_{pico}), vida media, pérdida de HMB en orina y retención de HMB.

Estudio 2 Tratamiento¹

	CaHMB	Gel de ácido HMB Tragado	Gel de ácido HMB Sublingual	Valor P ²
C_{pico} , nmol/mL	131.2±6.0	238.6±16.0	247.6±19.8	0.0003
t_{pico} , h	135.0±17.0	41.9±5.8	38.8±2.6	0.0001
Vida media, h	3.17±0.22	2.50±0.13	2.51±0.14	0.004
AUC, nmol/1440 min	46,281±2,717	53,395±2,862	52,886±2,729	0.001
24 h HMB en orina, mmol	1.00±0.13	1.21±0.19	1.16±0.17	0.18
24 h HMB en orina, % de dosis inicial	14.7±2.0	17.8±2.9	17.2±2.5	0.18
Aclaramiento (mL/min)	53.9±4.2	67.3±3.2	66.9±1.6	0.003

¹Media ± SEM

² Valor P para diferencias de tratamiento

³ En C_{pico} HMB extracelular total se estimó utilizando 20% del peso corporal como el volumen extracelular. Se asumió para este cálculo que las concentraciones de HMB en plasma y y extracelulares se igualaron.

- 5 La cantidad retenida se calculó restando la cantidad total de HMB excretado en la orina. El porcentaje de retención relativa indicado en la tabla debe permanecer sin cambios, incluso si este supuesto no se cumple.

Tabla 6. Estudio 2.1 de la química de la sangre

	CaHMB			Gel de ácido HMB Tragaado			Gel de ácido HMB Sublingual			Valor P ²
	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	
Glucosa, mg/dL	70.8±0.8	80.362.4	13.4%	74.162.0	79.961.9	7.8%	73.061.8	80.862.1	10.6%	0.62
Acido úrico, mg/dL	4.8±0.3	4.2±0.5	-12.0%	4.7±0.1	4.8±0.3	1.9%	4.7±0.3	4.7±0.3	0.8%	0.50
Nitrogeno úrico en sangre, mg/dL	14.8±1.4	13.4±1.0	-9.3%	14.5±1.4	13.9±1.4	-4.3%	15.3±1.7	15.4±1.1	0.8%	0.55
Creatinina, mg/dL	1.0±0.1	1.0±0.1	-1.5 %	1.0±0.1	1.0±0.1	-0.6%	1.0±0.1	1.0±0.1	7.9%	0.12
Sodio, mEq/L	139.5±0.8	141.4±0.5	1.3%	139.9±0.7	141.5±0.9	1.2%	138.5±0.6	142.1±1.1	2.6%	0.07
Potasio, mEq/L	4.1±0.1	4.7±0.1	14.8%	4.1±0.1	4.7±0.2	14.0%	4.0±0.1	4.9±0.1	21.7%	0.51
Cloruro, mEq/L	102.4±0.5	103.0±0.5	0.6%	103.1±0.8	102.8±0.7	-0.4%	102.1±0.5	104.3±0.9	2.1%	0.06
CO ₂ , mEq/L	24.9±0.6	27.3±0.6	9.5%	24.8±1.0	27.8±0.9	12.1%	25.3±0.8	27.9±0.4	10.4%	0.85
Fósforo, mg/dL	4.0±0.1	4.4±0.1	10.6%	4.2±0.2	4.5±0.2	6.2%	4.1±0.1	4.6±0.2	11.5%	0.44
Proteína, g/dL	6.4±0.2	6.5±0.2	2.8%	6.4±0.1	6.7±0.2	5.1%	6.5±0.2	6.6±0.2	2.9%	0.62
Albumina, g/dL	4.1±0.1	4.2±0.1	0.6%	4.1±0.1	4.3±0.1	4.5%	4.1±0.1	4.2±0.1	2.7%	0.08
Globulina, g/dL	2.2±0.1	2.4±0.1	6.7%	2.3±0.2	2.4±0.2	6.0%	2.3±0.1	2.4±0.1	3.2%	0.93
Relación ² A/G	1.9±0.1	1.8±0.1	-3.4%	1.9±0.2	1.8±0.1	-2.6%	1.8±0.1	1.8±0.1	-1.4%	0.83
Bilirrubina total, mg/dL	0.6±0.1	0.5±0.2	-17.8%	0.5±0.1	0.5±0.1	2.6%	0.6±0.1	0.5±0.1	-13.3%	0.10
Bilirrubina Directa, mg/dL	0.2±0.1	0.1±0.04	-37.4%	0.1±0.03	0.1±0.04	6.0%	0.1±0.03	0.1±0.04	-12.8%	0.21
Alcalina fosfatasa, IU/L	65.5±7.3	66.8±6.9	1.9%	64.8±7.3	74.1±7.6	14.5%	66.5±7.3	62.8±6.7	-5.6%	0.18
Lactato Deshidrogenasa IU/L	161.8±12.6	142.4±10.5	-12.0%	155.9±13.9	136.6±11.6	-12.3%	163.8±11.9	151.8±5.2	-7.3%	0.86
Aspartato Aminotransferasa,	22.6±1.4	20.0±1.1	-11.6%	23.3±0.9	21.3±0.7	-8.6%	23.9±3.2	24.8±2.3	3.7%	0.23
Alanina Aminotransferasa,	15.4±1.8	14.9±2.2	-3.3%	16.4±1.6	16.4±1.7	0.0%	15.3±1.5	16.6±1.8	9.0%	0.18
Gamma-glutamil	14.0±1.9	14.3±1.4	1.8%	13.3±1.2	14.0±1.0	5.7%	13.9±1.2	13.9±1.0	0.0%	0.50
Capacidad de enlazamiento a hierro, µg/dL	371.8±28.6	377.5±30.3	1.5%	378.6±32.1	395.1±34.7	4.4%	371.9±31.4	385.0±29.8	3.5%	0.68
UIBC, µg/dL	272.8±39.5	317.6±38.3	16.5%	310.6±42.4	335.1±42.1	7.9%	264.3±33.3	312.0±35.9	18.1%	0.44
Hierro, µg/dL	99.0±20.0	59.9±12.2	-39.5%	68.0±13.4	53.8±10.8	-21.0%	107.6±13.7	65.0±12.1	-39.6%	0.37
Saturación de hierro, %	28.4±5.8	17.5±4.2	-38.3%	20.3±5.0	16.9±4.6	-16.7%	30.1±5.1	20.1±4.2	-33.2%	0.38
Colesterol Total, mg/dL	160.4±8.0	162.9±7.1	1.6%	164.6±10.5	176.9±11.8	7.4%	161.6±9.4	163.3±9.3	1.0%	0.25
Triglicéridos, mg/dL	97.4±12.5	106.9±17.6	9.8%	112.6±18.4	121.4±22.7	7.8%	93.1±10.6	107.6±16.6	15.6%	0.52
HDL, mg/dL	52.3±2.7	54.0±3.5	3.3%	51.4±2.8	56.4±2.9	9.7%	52.3±3.1	51.3±2.8	-1.9%	0.24
LDL, mg/dL	88.6±7.2	88.6±5.9	0.0%	90.8±7.0	96.1±8.1	5.9%	91.3±5.9	90.4±6.8	-1.0%	0.18
Relación de Colesterol	3.1±0.2	3.1±0.2	-0.8%	3.2±0.2	3.2±0.2	-2.3%	3.1±0.2	3.2±0.2	3.6%	0.53

¹Media ±Error estándar de la media.

²Valor P Para el efecto de tratamiento de la diferencia en los valores de inicio y finalización indicados por % de cambio para cada tratamiento.

Tabla 7. Estudio 2.1 de Valores de hematología

	CaHMB				Gel de ácido HMB Tragado				Gel de ácido HMB Sublingual				Valor P ²
	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	Antes	Después	% de cambio	
	WBC, x10 ³ /μL	7.3±0.3	6.5±0.3	-10.5%	6.4±0.3	7.1±0.3	9.7%	7.1±0.4	6.8±0.3	-3.5%	7.1±0.4	6.8±0.3	
RBC, x10 ³ /μL	4.3±0.2	4.3±0.2	0.7%	4.2±0.1	4.4±0.1	3.5%	4.3±0.1	4.3±0.1	0.1%	4.3±0.1	4.3±0.1	0.1%	0.27
Hemoglobina, g/dL	13.2±0.7	13.3±0.6	0.7%	13.0±0.4	13.4±0.4	3.2%	13.2±0.5	13.2±0.5	0.4%	13.2±0.5	13.2±0.5	0.4%	0.31
Hematocritos, %	38.1±1.8	38.3±1.7	0.7%	37.4±1.0	38.9±1.1	4.2%	37.5±1.4	38.6±1.3	2.9%	37.5±1.4	38.6±1.3	2.9%	0.42
MCV, fL	88.4±1.5	88.5±1.4	0.1%	88.1±1.5	88.6±1.5	0.6%	88.4±1.5	89.3±1.4	1.0%	88.4±1.5	89.3±1.4	1.0%	0.21
MCH, pg	30.6±0.5	30.7±0.6	0.2%	30.6±0.6	30.5±0.6	-0.3%	30.4±0.5	30.5±0.5	0.3%	30.4±0.5	30.5±0.5	0.3%	0.52
MCHC, g/dL	34.7±0.2	34.7±0.2	0.0%	34.8±0.2	34.5±0.2	-0.8%	34.5±0.2	34.5±0.2	0.1%	34.5±0.2	34.5±0.2	0.1%	0.14
RDW, %	13.4±0.2	13.4±0.1	-0.1%	13.3±0.2	13.2±0.2	-0.5%	13.3±0.2	13.4±0.2	0.7%	13.3±0.2	13.4±0.2	0.7%	0.66
Plaquetas, x10 ³ /μL	228.0±17.6	235.9±10.9	3.5%	229.0±12.9	242.4±12.2	5.8%	233.8±14.2	244.3±17.5	4.5%	233.8±14.2	244.3±17.5	4.5%	0.92
Neutrófilos, %	44.9±3.8	45.6±3.3	1.7%	45.6±2.7	46.0±4.4	0.8%	45.3±5.2	42.4±3.5	-6.4%	45.3±5.2	42.4±3.5	-6.4%	0.90
Linfocitos, %	44.8±3.2	42.5±3.5	-5.0%	43.6±2.4	43.3±3.9	-0.9%	43.1±4.2	45.6±3.4	5.8%	43.1±4.2	45.6±3.4	5.8%	0.68
Monocitos, %	6.9±0.9	8.5±1.5	23.6%	7.5±1.1	6.9±0.8	-8.3%	8.3±1.0	8.4±0.9	1.5%	8.3±1.0	8.4±0.9	1.5%	0.24
Eosinófilos, %	2.9±0.5	2.6±0.4	-8.7%	2.8±0.5	3.0±0.5	9.1%	2.5±0.5	3.3±0.5	30.0%	2.5±0.5	3.3±0.5	30.0%	0.57
Basófilos, %	0.6±0.2	0.8±0.2	20.0%	0.5±0.2	0.9±0.3	75.0%	0.6±0.2	0.4±0.2	-40.0%	0.6±0.2	0.4±0.2	-40.0%	0.36
Neutrófilos, x10 ³ /μL	3.3±0.3	3.0±0.2	-9.9%	2.9±0.2	3.3±0.4	10.6%	3.3±0.5	2.9±0.3	-12.1%	3.3±0.5	2.9±0.3	-12.1%	0.49
Linfocitos, x10 ³ /μL	3.3±0.3	2.8±0.3	-13.5%	2.8±0.2	3.1±0.3	9.4%	3.0±0.3	3.1±0.3	5.0%	3.0±0.3	3.1±0.3	5.0%	0.06
Monocitos, x10 ³ /μL	0.5±0.1	0.5±0.1	5.0%	0.5±0.1	0.5±0.04	2.6%	0.6±0.05	0.6±0.05	0.0%	0.6±0.05	0.6±0.05	0.0%	0.71
Eosinófilos, x10 ³ /μL	0.2±0.04	0.2±0.03	-12.5%	0.2±0.03	0.2±0.04	13.3%	0.2±0.04	0.2±0.03	35.7%	0.2±0.04	0.2±0.03	35.7%	0.42
Basófilos, x10 ³ /μL	0.06±0.02	0.06±0.02	0.0%	0.05±0.02	0.09±0.03	75.0%	0.06±0.02	0.04±0.0	-40.0%	0.06±0.02	0.04±0.0	-40.0%	0.29

Ejemplo 2

En este ejemplo, el efecto de la administración de gel de ácido HMB se compara con el de HMB de calcio en el daño muscular después de una sesión excéntrica de ejercicio. Como se muestra en el Ejemplo 1, los niveles pico de HMB en plasma y la tasa de eliminación de HMB se incrementan con la administración de gel de ácido libre de HMB en comparación con CaHMB (13). Este ejemplo muestra que la respuesta más rápida de HMB administrado como gel de ácido libre antes y después de una sesión de ejercicio extremo protege al músculo de daño mejor que el HMB administrado como la sal de HMB de calcio.

Efectos de la HMB y el ejercicio sobre los marcadores de daño muscular y factores inflamatorios: El ejercicio extenuante, tal como el entrenamiento de resistencia o ejercicio de esfuerzo máximo, provoca un incremento en la fuga de la enzima creatina fosfoquinasa (CPK) de las células musculares (21, 31). Los estudios en humanos han demostrado que el daño muscular después de un ejercicio intenso, medido por CPK en plasma elevado se reduce con la suplementación con HMB de calcio (14, 22, 26, 33). Un estudio sobre los daños musculares después de una carrera prolongada de 20 km en un campo colegial a campo traviesa con pendientes y declives también mostró que la administración crónica de HMB de calcio es efectiva para disminuir el aumento de la CPK en plasma durante un período de 4 días después de la carrera. Nissen et al. (26) demostraron un efecto de la dosificación del HMB de calcio (con 3.0 gramos por día que es más efectivo que 1.5 gramos por día) en CPK decreciente así como dando por resultado reducciones significativas en 3-metilhistidina urinario (3-MH, un indicador bien establecido de degradación de proteínas miofibrilares (39)). Gallagher et al. suplementó dosificaciones de HMB a 37 estudiantes universitarios hombres que realizan entrenamiento de ejercicio de resistencia (38 mg/kg de peso corporal-d⁻¹) y 6.0 g (76 mg/kg de peso corporal-d⁻¹) de HMB de calcio por día. Ambas dosis tuvieron efectos similares en la mejora de la masa magra y ganancias de fuerza, sin embargo, la dosis más alta dio como resultado mejoras significativas en la minimización de la fuga de CPK lo que sugiere una mejora significativa en el daño muscular después del ejercicio. Estas observaciones indican que los niveles en plasma más altos de HMB parecen ser más protectores del daño muscular después del ejercicio.

Como se muestra en el Ejemplo 1, el HMB como un ácido libre (en un gel) se absorbe más rápidamente que el HMB de calcio, dando como resultado niveles en plasma mayores de HMB, y se elimina más fácilmente por el músculo.

Métodos:

Sujetos: Se realizó un estudio en la Iowa State University Health and Human Performance Laboratory; este estudio fue aprobado por la Iowa State University Institutional Review Board, y fue registrado en ClinicalTrials.gov (NCT01150526). Se reclutaron a 12 hombres y 13 mujeres entre las edades de 20 y 36 de la comunidad de la Iowa State University y sus alrededores.

Tratamientos: El diseño experimental se ilustra en la Figura 8.

Se administraron cinco tratamientos de la siguiente manera:

Tratamiento 1: Placebo. Este grupo recibió una cápsula de placebo y una dosificación en jeringa de placebo en cada administración de dosificación.

Tratamiento 2: CaHMB pre-ejercicio. Este grupo recibió una cápsula de CaHMB y una dosificación en jeringa de placebo 30 min antes de la sesión de ejercicio agudo. Las dosificaciones adicionales restantes durante el estudio consistieron en una dosificación de cápsula de placebo y una dosificación en jeringa de placebo.

Tratamiento 3: gel de ácido HMB pre-ejercicio. Este grupo recibió una cápsula de placebo y una dosificación en jeringa de gel de ácido HMB 30 min antes de la sesión de ejercicio agudo. Las dosificaciones adicionales restantes durante el estudio consistieron en una dosificación de una cápsula de placebo y una dosificación en jeringa de placebo.

Tratamiento 4: CaHMB pre-y post-ejercicio. Este grupo recibió una cápsula de CaHMB y una dosificación en jeringa de placebo en todos los tiempos de administración durante el estudio.

Tratamiento 5: gel de ácido HMB pre- y post-ejercicio. Este grupo recibió una dosificación en jeringa de gel de ácido HMB y una cápsula de placebo en todos los tiempos de administración durante el estudio.

Para mantener a ciegas los tratamientos tanto a los investigadores como a los sujetos cada sujeto tomó una dosificación en cápsula y en jeringa de suplemento en cada administración. Las cápsulas contenían un gramo de lactato de calcio (Placebo) o un gramo de β -hidroxi- β -metilbutirato de calcio (CaHMB). Las dosificaciones de la jeringa se formularon para que tuvieran un sabor y una apariencia similares y contenían 0.8 g de jarabe de maíz (Placebo) o 0.8 g de ácido libre β -hidroxi- β -metilbutirato, la misma cantidad de HMB que en la dosificación de la cápsula. Las 3 dosis diarias proveyeron la misma dosificación total de HMB (2.4 g de HMB de calcio en las cápsulas o 2.4 g de ácido libre de HMB en las jeringas).

Sesión de ejercicio excéntrico: Los sujetos se abstuvieron de ejercicio vigoroso durante tres días antes de informar al laboratorio. Todos los sujetos fueron estudiados después de un ayuno nocturno. Los sujetos tomaron una muestra de sangre en ayunas y se recogió una muestra de orina puntual. Los sujetos consumieron entonces su suplemento asignado y 30 minutos más tarde se realizó la sesión de ejercicio excéntrico. El ejercicio consistió en 50 contracciones de esfuerzo máximo de los extensores de la rodilla al intentar resistir el brazo de palanca Biodex, en tanto mueve la articulación de la rodilla de la extensión completa a 90 grados de flexión; Esto es similar a dejar un peso pesado abajo lentamente mientras se está en una posición asentada. Cada contracción duró aproximadamente 2 segundos y se permitieron 12 segundos entre las contracciones. Este protocolo se realizó en la pierna derecha seguido por la pierna izquierda. Los sujetos recibieron 2 dosificaciones diarias más de tratamiento (placebo o HMB) con instrucciones para tomar las dosificaciones al almuerzo y la cena. Durante los siguientes 4 días los sujetos regresaron al laboratorio en ayunas cada mañana, se tomó sangre y se recogió orina y luego se consumió la dosificación matutina de su suplemento. A los sujetos se les dio de nuevo las dos dosificaciones de suplemento diarias restantes con instrucciones para tomarlas en el almuerzo y la cena.

Muestras de suero y orina: Se tomó una muestra de sangre en ayunas de una vena superficial del antebrazo cada mañana cuando los sujetos se reportaron al laboratorio para someterse a pruebas. Adicionalmente, se recogió una muestra de orina de captura limpia en este momento. La CPK en suero fue analizada por un laboratorio comercial (Quest Diagnostics, Madison, NJ). La 3-Metilhistidina de orina (3MH) se analizó mediante un método GC/MS previamente publicado (9). La creatinina urinaria se analizó por ensayo colorimétrico (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Los datos urinarios de 3MH se normalizaron a la creatinina urinaria y se expresaron como la relación 3MH: creatinina, μmol : mg.

Estadísticas: Los datos se analizaron utilizando el procedimiento de modelo mixto en Statistical Analysis System para Windows (versión 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC). El cambio en cada variable se analizó en cada punto de tiempo de medición. El modelo incluyó el valor de línea base o tiempo 0 como covariable e incluyó el género y el tratamiento como efectos principales. Los datos de CPK se transformaron usando el procedimiento de Rank en SAS antes del análisis. Se utilizaron contrastes para comparar la media de gel de ácido HMB pre- y post-ejercicio con los otros medios de tratamiento.

Resultados:

La demografía de los sujetos se muestra en la Tabla 8. La edad, altura y peso de los sujetos por tratamiento fueron similares.

Tabla 8. Características del sujeto

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
N	5	4	5	5	6
M/F	3/2	2/2	2/3	2/3	3/3
Edad (y)	25.2 \pm 2.5	21.0 \pm 0.4	24.0 \pm 1.4	25.8 \pm 2.5	22.2 \pm 1.0
Altura (cm)	173 \pm 2.7	173 \pm 5.5	170 \pm 6.0	173 \pm 6.0	171 \pm 3.1
Peso (kg)	67.0 \pm 2.3	68.9 \pm 9.8	68.1 \pm 5.8	69.7 \pm 6.9	65.2 \pm 5.1

^aLos datos se presentan como Media \pm SEM

Los tratamientos fueron: (Tratamiento 1): dosificaciones de cápsulas de placebo y jeringa placebo; (Tratamiento 2) Dosificación de la cápsula de HMB y de la jeringa de placebo antes del ejercicio, seguida de la dosificación de la cápsula placebo y de la jeringa placebo después del ejercicio; (Tratamiento 3): dosificación de la cápsula de placebo y jeringa de gel de ácido HMB administrada antes del ejercicio seguida de una dosificación de la cápsula placebo y

de una jeringa placebo después del ejercicio; (Tratamiento 4): Dosificación de la cápsula de HMB de calcio y de jeringa placebo antes y después del ejercicio; y (tratamiento 5): dosificación de la cápsula de placebo y de la jeringa de gel ácido HMB antes y después del ejercicio. Los tratamientos se administraron 3 veces al día, 30 min antes de la prueba de la mañana y luego otra vez aproximadamente a mediodía y 6 PM.

- 5 La CPK en suero y las relaciones de 3MH urinaria:creatinina urinaria se muestran en la Tabla 9. No hubo diferencias en los valores de línea base (tiempo 0). El ejercicio excéntrico causó hasta un incremento de cuatro veces en la CPK en suero, lo que indica daño a la membrana muscular. Sin embargo, el gel de ácido HMB administrado tanto antes como después del ejercicio (Tratamiento 5), atenuó este incremento en hasta 64% ($P < 0.03$) a las 24 h después del ejercicio y al 86% 48 h después del ejercicio ($P < 0.005$). Continuando a las 72 h, el incremento en CPK todavía
- 10 tiende a ser menor con el tratamiento con gel de ácido HMB. La Figura 9 ilustra el aumento y la caída de los valores de CPK a lo largo del estudio. También se muestra en la Tabla 2 el efecto de los tratamientos sobre la relación 3MH:Cr, una medida de la degradación de la proteína en el músculo. Aunque estos datos sólo son indicativos de una tendencia, los datos no muestran ningún incremento e incluso una disminución en la degradación de proteínas en el tratamiento con gel de ácido HMB antes y después del ejercicio. Esto indicaría una disminución en la
- 15 degradación de proteínas que da como resultado la rotación de proteínas y la acumulación de proteínas más favorable en el músculo.

Tabla 9. Creatinina fosfoquinasa en suero (CPK) y relación de 3-Metilhistidina urinaria a creatinina urinaria (3MH: Cr) después de una sesión aguda de ejercicio

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Valor P ^b
Línea base	132±35	95±12	107±17	127±38	146±43	
a 24 h	356±108	375±68	434±126	416±157	264±75	0.03
a 48 h	253±73	246±38	275±69	228±73	170±41	0.005
a 72 h	197±48	231±59	209±54	223±52	180±34	0.09
a 96 h	169±36	281±105	181±33	214±52	187±46	0.51
3MH:Cr, µmol/mg						
Línea base	0.233±0.066	0.164±0.037	0.173±0.028	0.205±0.025	0.225±0.034	
a 24 h	0.211±0.035	0.190±0.027	0.213±0.037	0.203±0.039	0.213±0.025	0.88
a 48 h	0.238±0.033	0.240±0.052	0.190±0.014	0.220±0.027	0.208±0.012	0.62
a 72 h	0.251±0.046	0.204±0.058	0.172±0.013	0.231±0.037	0.175±0.013	0.14
a 96 h	0.231±0.044	0.187±0.029	0.202±0.020	0.269±0.038	0.186±0.043	0.27

^aLos datos se presentan como Media ±SEM

- 20 Los tratamientos fueron: (Tratamiento 1): dosificaciones de cápsulas de placebo y jeringa placebo; (Tratamiento 2) dosificación de la cápsula de HMB de calcio y de jeringa de placebo antes del ejercicio, seguida de la dosificación de la cápsula placebo y de la jeringa placebo después del ejercicio; (Tratamiento 3): dosificación de la cápsula placebo y de jeringa de gel de ácido libre de HMB administrada antes del ejercicio, seguida de la dosificación de cápsula placebo y de jeringa placebo después del ejercicio; (Tratamiento 4): Dosificación de la cápsula de HMB de calcio y de jeringa placebo antes y después del ejercicio; y (Tratamiento 5): dosificación de la cápsula placebo y de la jeringa de gel de ácido libre de HMB suministrada antes y después del ejercicio. Los tratamientos se administraron 3 veces al día, 30 min antes de la prueba de la mañana y luego otra vez aproximadamente a mediodía y 6 PM.

^bValor P gel de ácido libre de HMB gel (Tratamiento 5) contrastado con los otros tratamientos.

Implicaciones:

- 30 Basándose en las observaciones en el Ejemplo 1, el tejido muscular se expuso a niveles mucho más altos de HMB en suero cuando se administró ácido libre de HMB. Adicionalmente, en el Ejemplo 1 se demostró que la eliminación de HMB del suero a músculo y tejidos fue también mucho mayor cuando se administró ácido HMB en comparación con la administración de CaHMB. Por lo tanto, en el Ejemplo 2 se muestra que esta utilización adicional de HMB por
- 35 músculo en la forma de ácido libre es más protectora del tejido muscular después de una sesión aguda de ejercicio que la HMB administrada en la forma de calcio.

La descripción anterior y los dibujos comprenden realizaciones ilustrativas de la presente invención. Las realizaciones anteriores y los métodos descritos aquí pueden variar en función de la capacidad, experiencia y preferencia de los expertos en la técnica. La simple enumeración de las etapas del método en un cierto orden no constituye ninguna limitación en el orden de las etapas del método.

- 5 Los expertos en la técnica que tengan la divulgación ante ellos podrán hacer modificaciones y variaciones en ella sin apartarse del alcance de la invención. La administración de la composición de la presente invención estará en una cantidad suficiente para conseguir un efecto deseado como reconoce un experto en la técnica.

Lista de referencia

- 10 1. The Body Fluid Compartments: Extracellular and Intracellular Fluids; Interstitial Fluid and Edema. In: Textbook of Medical Physiology, edited by Guyton AC and Hall JE. Philadelphia: W B Saunders Company, 2007.
2. Adamson LF and Greenberg DM. The significance of certain carboxylic acids as intermediates in the biosynthesis of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 23: 472-479, 1957.
- 15 3. Bachhawat BK, Robinson WG and Coon MJ. The enzymatic cleavage of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme a to aceto-acetate and acetyl coenzyme A. *J Biol Chem* 216: 727-736, 1955.
4. Bloch K, Clark LC and Haray I. Utilization of branched chain acids in cholesterol synthesis. *J Biol Chem* 211: 687-699, 1954.
5. Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan F and Rathmacher JA. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using β -hydroxy- β -methylbutyrate, glutamine and arginine: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 24(3): 133-139, 2000.
- 20 6. Coon MJ. Enzymatic synthesis of branched chain acids from amino acids. *Fed Proc* 14: 762-764, 1955.
7. Dreyer HC, Drummond MJ, Pennings B, Fujita S, Glynn EL, Chinkes DL, Dhanani S, Volpi E and Rasmussen BB. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E392-E400, 2008.
- 25 8. Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E and Rasmussen BB. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol* 576: 613-624, 2006.
9. Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukherji P and Tisdale MJ. Signaling pathways initiated by β -hydroxy- β -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E923-E931, 2007.
- 30 10. Eley HL, Russell ST and Tisdale MJ. Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and angiotensin II by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1409-E1416, 2008.
11. Eley HL, Russell ST and Tisdale MJ. Mechanism of Attenuation of Muscle Protein Degradation Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha and Angiotensin II by beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1417-E1426, 2008.
- 35 12. Eubanks May P, Barber A, Hourihane A, D'Olimpio JT and Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg* 183: 471-479, 2002.
- 40 13. Fuller, J. C., Jr., Sharp, R. L., Angus, H. F., Baier, S. M., and Rathmacher, J. A. Free acid gel form of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) improves HMB clearance from plasma in humans compared to the calcium HMB salt. *Br.J.Nutr.* 2010. Tipo de referencia: En prensa

14. Gallagher PM, Carrithers JA, Godard MP, Schulze KE and Trappe SW. β -Hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part I: Effects on strength and fat free mass. *Med Sci Sports Exerc* 32(12): 2109-2115, 2000.
15. Gallagher PM, Carrithers JA, Godard MP, Schutze KE and Trappe SW. β -Hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part II: Effects on hematology, hepatic, and renal function. *Med Sci Sports Exerc* 32(12): 2116-2119, 2000.
- 5 16. Gey KF, Pletsher A, Isler O, Ruegg R and Wursch J. Influence of isoprenoid C5 and C6 compounds on the incorporation of acetate in cholesterol. *Helvetica Chim Acta* 40: 2354-2368, 1957.
17. Gey, K. F., Pletsher, A., Isler, O., Ruegg, R., and Wursch, J. The influence of isoprenic C5 and C6 compounds upon the acetate incorporation into cholesterol. *Helvetica Chim. Acta* 40, 2369. 1957. B
- Tipo de referencia: Resumen
- 10 18. Harper AE, Benevenga NJ and Wohlhueter RM. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol Rev* 53: 428-558, 1970.
19. Hill, D. S., Szewczyk, N., Brookfield, R., Loughna, P., Rathmacher, J., Rennie, M. J., and Atherton, P. J. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) stimulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORc1) signaling via a phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-dependent pathway. *FASEB J*. 2011.
- 15 Tipo de referencia: Resumen
20. Isler, O., Ruegg, R., Wursch, J., Gey, K. F., and Pletsher, A. Biosynthesis of cholesterol from β , γ -dihydroxy- β -methylvaleric acid. *Helvetica Chim. Acta* 40, 2369. 1957.
- Tipo de referencia: Resumen
- 20 21. Janssen GME, Kuipers H, Willems GM, Does RJMM, Janssen MPE and Geurten P. Plasma activity of muscle enzymes: quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables. *Int J Sport* 10: S160-S168, 1989.
22. Jówko E, Ostaszewski P, Jank M, Sacharuk J, Zieniewicz A, Wilczak J and Nissen S. Creatine and β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) additively increases lean body mass and muscle strength during a weight training program. *Nutr* 17: 558-566, 2001.
- 25 23. Knitter AE, Panton L, Rathmacher JA, Petersen A and Sharp R. Effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle damage following a prolonged run. *J Appl Physiol* 89(4): 1340-1344, 2000.
24. Krebs HA and Lund P. Aspects of the regulation of the metabolism of branched-chain amino acids. *Advan Enzyme Regul* 15: 375-394, 1977.
- 30 25. Nissen S, Panton L, Sharp RL, Vukovich M, Trappe SW and Fuller JC, Jr. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr* 130: 1937-1945, 2000.
26. Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher JA, Rice J, Fuller JC, Jr., Connelly AS and Abumrad NN. Effect of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *JAppl Physiol* 81(5): 2095-2104, 1996.
- 35 27. Nissen S, Van Koeveering M and Webb D. Analysis of β -Hydroxy- β -methyl Butyrate in Plasma by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Anal Biochem* 188(1): 17-19, 1990.
28. Nissen S, Van Koeveering M and Webb D. Analysis of β -hydroxy- β -methyl butyrate in plasma by gas chromatography and mass spectrometry. *Anal Biochem* 188: 17-19, 1990.
29. Nissen SL and Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem* 8: 300-311, 1997.
- 40 30. Nissen SL and Sharp RL. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *J Appl Physiol* 94: 651-659, 2003.

31. Nuviala RJ, Roda L, Lapieza MG, Boned B and Giner A. Serum enzymes activities at rest and after a marathon race. *J Sports Med Phys Fitness* 32: 180-186, 1992.
32. Ostaszewski P, Kostiuk S, Balasinska B, Jank M, Papet I and Glomot F. The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of the laboratory rats and domestic chicken in vitro. *J Anim Physiol Anim Nutr (Swiss)* 84: 1-8, 2000.
33. Panton LB, Rathmacher JA, Baier S and Nissen S. Nutritional supplementation of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) during resistance training. *Nutr* 16(9): 734-739, 2000.
34. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE and Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 273: E99-107, 1997.
35. Plaut GWE and Lardy HA. Enzymatic incorporation of C14-bicarbonate into acetoacetate in the presence of various substrates. *J Biol Chem* 192: 435-445, 1951.
36. Rabinowitz JL, Dituri F, Cobey F and Gurin S. Branched chain acids in the biosynthesis of squalene and cholesterol. *Fed Proc* 14: 760-761, 1955.
37. Rathmacher JA, Link GA, Flakoll PJ and Nissen SL. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of stable isotopes of 3-methylhistidine in biological fluids: application to plasma kinetics in vivo. *Biol Mass Spectrom* 21: 560-566, 1992.
38. Rathmacher JA, Nissen S, Panton L, Clark RH, Eubanks MP, Barber AE, D'Olimpio J and Abumrad NN. Supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), arginine, and glutamine is safe and could improve hematological parameters. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28: 65-75, 2004.
39. Rathmacher JA and Nissen SL. Development and application of a compartmental model of 3-methylhistidine metabolism in humans and domestic animals. *Adv Exp Med Biol* 445: 303-324, 1998.
40. Rennie MJ. Exercise- and nutrient-controlled mechanisms involved in maintenance of the musculoskeletal mass. *Biochem Soc Trans* 35: 1302-1305, 2007.
41. Robinson WG, Bachhawat BK and Coon MJ. Enzymatic carbon dioxide fixation by senecioid coenzyme A. *Fed Proc* 13: 281, 1954.
42. Rudney H. The synthesis of β -hydroxy- β -methylglutaric acid in rat liver homogenates. *J Am Chem Soc* 76: 2595, 1954.
43. Rudney H and Farkas TG. Biosynthesis of branched chain acids. *Fed Proc* September: 757-759, 1955.
44. Russell ST and Tisdale MJ. Mechanism of attenuation by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate of muscle protein degradation induced by lipopolysaccharide. *Mol Cell Biochem* 330(1-2): 171-179, 2009.
45. SAS Institute Inc. *SAS User's Guide: Statistics*. Cary,NC: SAS Institute Inc., 1985.
46. Slater G, Jenkins D, Logan P, Lee H, Vukovich MD, Rathmacher JA and Hahn AG. b-hydroxy b-methylbutyrate (HMB) supplementation does not affect changes in strength or body composition during resistance training in trained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11: 384-396, 2001.
47. Smith HJ, Mukerji P and Tisdale Mj. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res* 65: 277-283, 2005.
48. Smith HJ, Wyke SM and Tisdale MJ. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer Res* 64: 8731-8735, 2004.
49. Sousa MF, Abumrad NN, Martins C, Nissen S and Riella MC. Calcium β -hydroxy- β -methylbutyrate. Potential role as a phosphate binder in uremia: In vitro study. *Nephron* 72: 391-394, 1996.

50. Thalhammer F, Schenk P, Burgmann H, El M, I, Hollenstein UM, Rosenkranz AR, Sunder-Plassmann G, Breyer S and Ratheiser K. Single-dose pharmacokinetics of meropenem during continuous venovenous hemofiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2417-2420, 1998.
51. Urso R, Bardi P and Giorgi G. A short introduction to pharmacokinetics. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 6: 33-44, 2002.
52. Vukovich MD, Slater G, Macchi MB, turner MJ, Fallon K, Boston T and Rathmacher J. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. *J Nutr Biochem* 12: 631-639, 2001.
53. Vukovich MD, Stubbs NB and Bohlken RM. Body composition in 70-year old adults responds to dietary β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) similar to that of young adults. *J Nutr* 131(7): 2049-2052, 2001.
54. Zabin I and Bloch K. The utilization of butyric acid for the synthesis of cholesterol and fatty acids. *J Biol Chem* 192: 261-266, 1951.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende ácido beta-hidroxi-beta-metilbutírico (HMB) en forma de ácido libre (ácido HMB) para uso en la mejora de la efectividad de HMB tras la administración, en comparación con la administración de una dosificación similar de una composición HMB de sal de calcio en la disminución del daño muscular en el músculo sometido a estrés, la disminución del daño muscular en el músculo sometido a daño, mejorando la respuesta inmune de una persona o disminuyendo la emaciación asociada a la enfermedad.
2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido HMB se formula como un gel o un líquido.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en forma de una composición oral.
- 10 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en forma de una composición sublingual.
5. Una composición para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el ácido HMB está presente en una cantidad de 0.5 gramos a 30 gramos.
- 15 6. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el ácido HMB se administra una vez por período de veinticuatro horas.
7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el ácido HMB se administra en una cantidad de 0.01 a 0.2 gramos de ácido HMB por kilogramo de peso corporal por veinticuatro horas.
- 20 8. Un método no terapéutico para mejorar la retención de nitrógeno, mejorar el ahorro de proteínas, mejorar la masa corporal magra, mejorar la función muscular, mejorar el rendimiento muscular, mejorar el perfil lipídico de una persona o mejorar el estado emocional de una persona, incluyendo administrar ácido beta-hidroxi-beta metilbutírico) en forma de ácido libre (ácido HMB)
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ácido HMB se formula como un gel o un líquido.
- 25 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el ácido HMB está en forma de una composición oral o sublingual.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el ácido HMB está presente en una cantidad de 0.5 gramos a 30 gramos.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ácido HMB se administra una vez por período de veinticuatro horas.
- 30 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde el ácido HMB se administra en una cantidad de 0.01 a 0.2 gramos de ácido HMB por kilogramo de peso corporal por veinticuatro horas.
14. Una composición que comprende ácido beta-hidroxi-beta-metilbutírico (HMB) en forma de ácido libre (ácido HMB) como una formulación en gel.
- 35 15. Una composición que comprende ácido beta-hidroxi-beta-metilbutírico (HMB) en forma de ácido libre (ácido HMB) como una formulación líquida
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14 o 15 en forma de una composición oral o una composición sublingual.

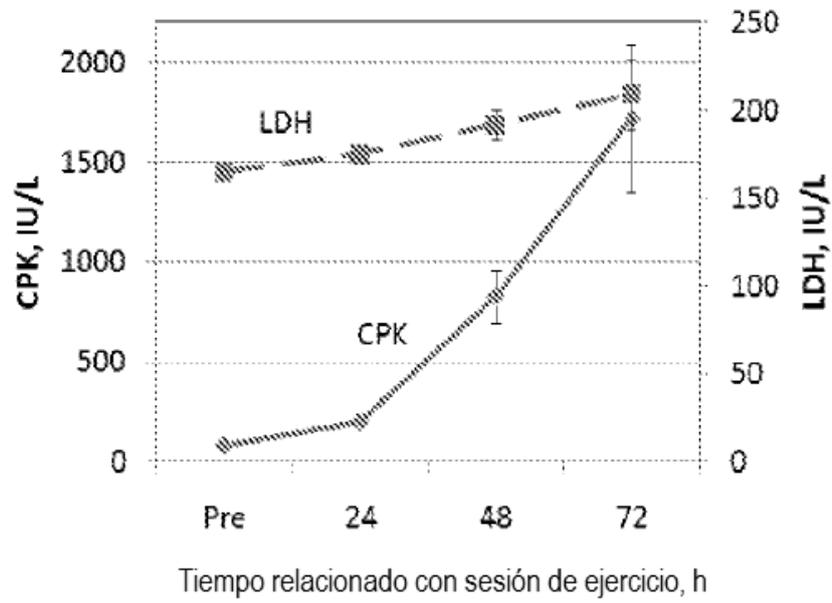


FIG. 1

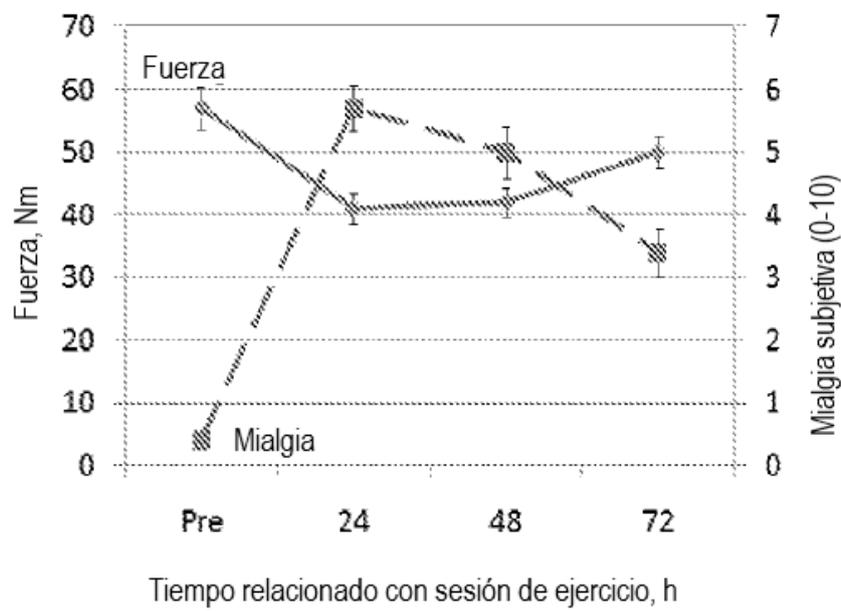


FIG. 2

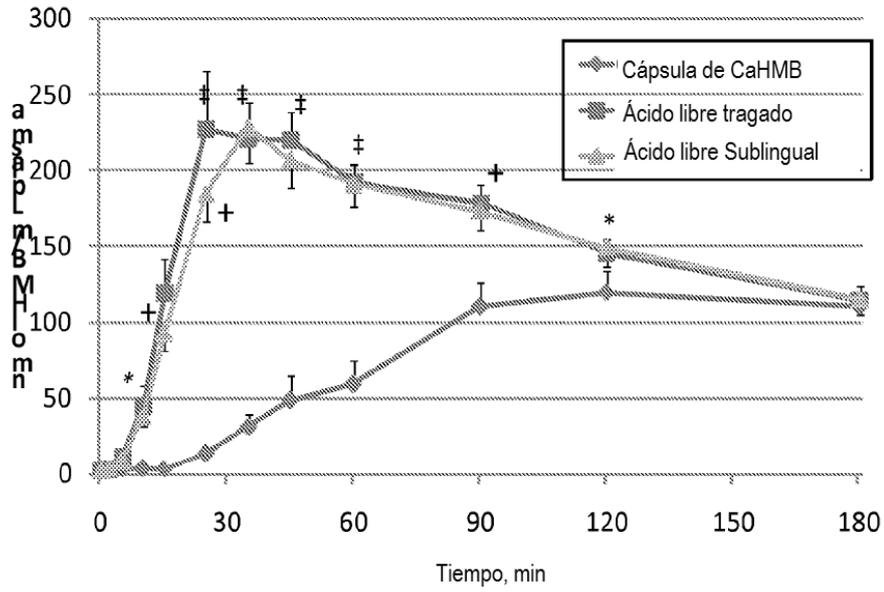


FIG. 3

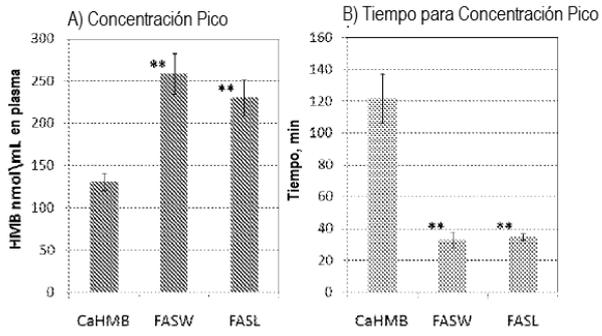


FIG. 4

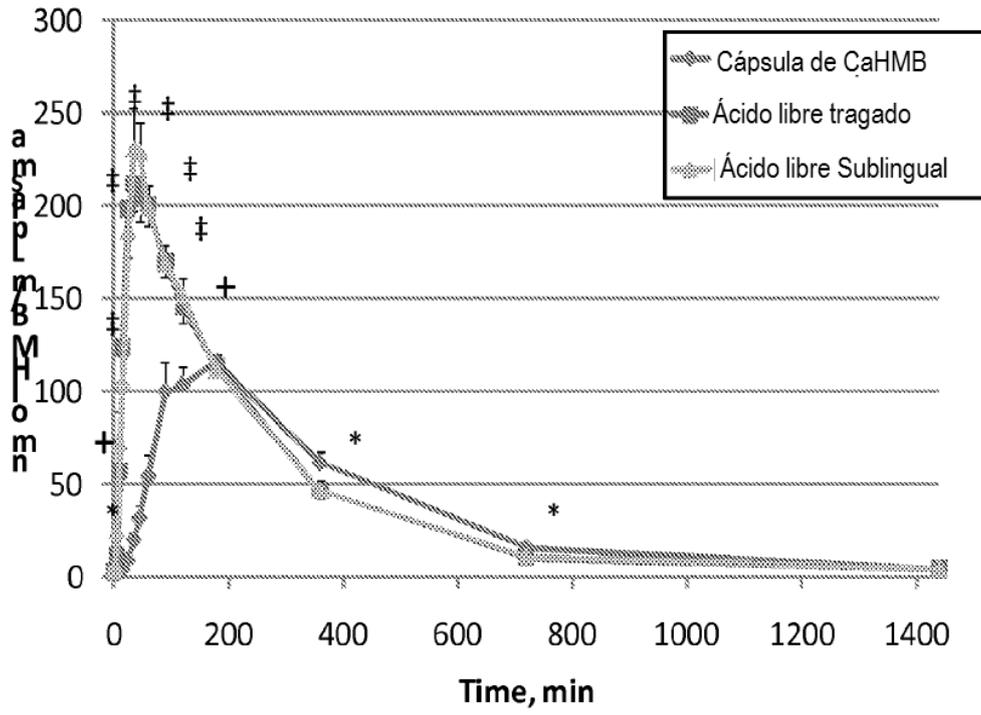


FIG. 5

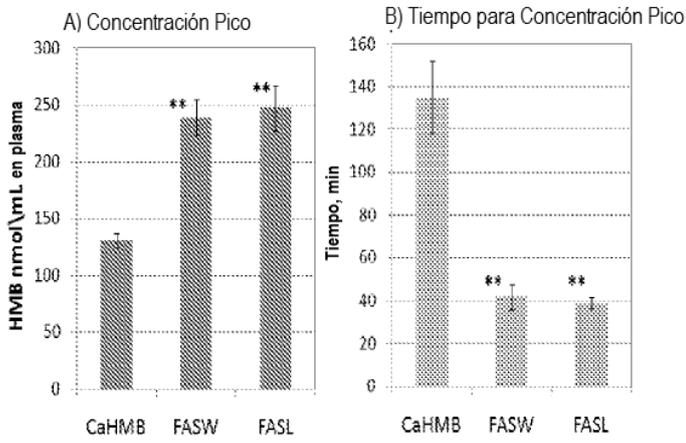


FIG. 6

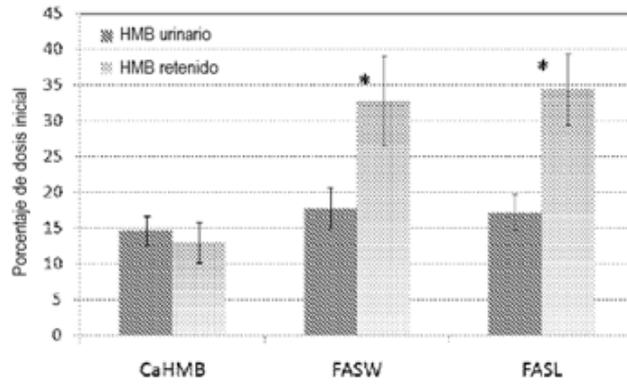


FIG. 7

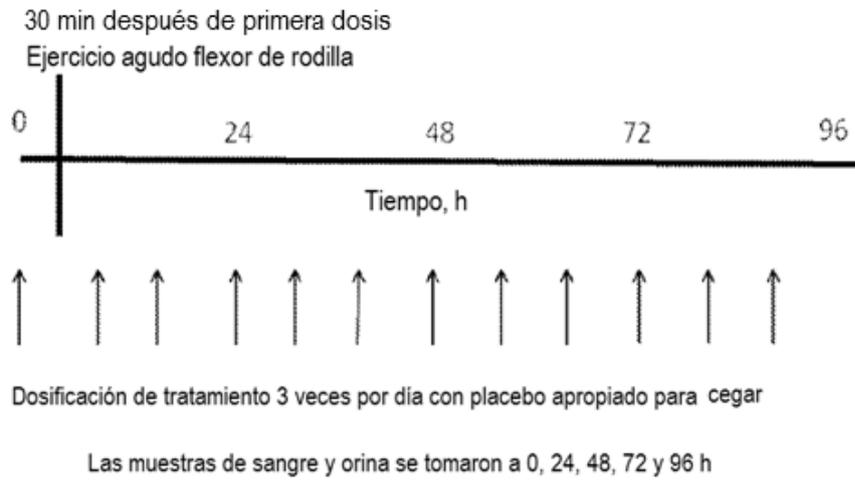


FIG. 8

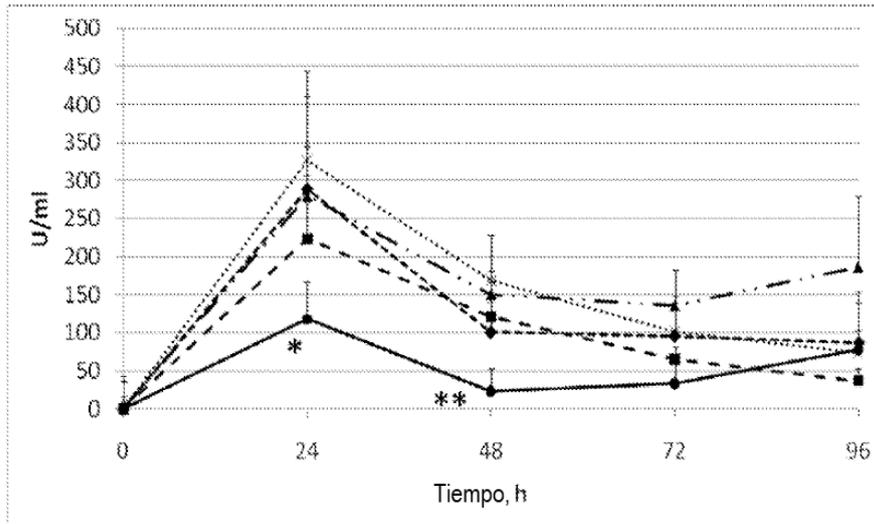


FIG 9. Cambio de creatinina fosfoquinasa en suero (CPK) después de una sesión de ejercicio excéntrico. -- ■ -- placebo, -▲- HMB de calcio pre-, -X- gel de ácido libre de HMB pre-, -◆- HMB de calcio pre- y post ejercicio, and -●- gel de ácido libre de HMB pre- y post ejercicio. * P < 0.03 contrastó con todos los otros tratamientos; ** P < 0.005 contrastó con todos los otros tratamientos y P < 0.06 contrastó con CaHMB solo y Placebo solo.