

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 706**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/63** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2007 PCT/EP2007/008636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2008 WO08040550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07818713 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2068901**

54 Título: **Uso de hidroxitirosol para reducir la cantidad de ácido láctico en plasma**

30 Prioridad:

**05.10.2006 EP 06121809**

**05.10.2006 EP 06121812**

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

**14.05.2019**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**RIETJENS, SASKIA JOHANNES;**

**BAST, AALT;**

**HAENEN, GUIDO REMBERTUS MICHIEL MARIE y**

**HEYDEN, VAN DER LUCAS CYRIL GERARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 712 706 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**

Uso de hidroxitirosol para reducir la cantidad de ácido láctico en plasma

5 Esta invención se refiere al uso de extractos de oliva que contienen hidroxitirosol para disminuir en seres humanos sanos la cantidad de ácido láctico acumulada en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en las células musculares durante el ejercicio y para incrementar en seres humanos sanos los niveles de glutatión en los músculos asociados al ejercicio.

Antecedentes de la invención

10 Se ha descrito el hidroxitirosol (HT) para uso en una composición para mantener o restaurar la salud muscular que resulta del daño ocasionado durante el ejercicio. Véase la patente internacional WO 2006/053872 (publicada el 26 de mayo de 2006). Sin embargo, no se especificó la fuente del HT, y las acciones descritas se atribuyen generalmente a la capacidad antioxidante del HT. Por el contrario, se ha encontrado que al menos algunas de las propiedades beneficiosas del HT no son atribuibles a su capacidad antioxidante.

15 En la formulación de productos nutricionales para el consumo tanto humano como animal, con frecuencia es deseable usar ingredientes naturales. Se ha encontrado, que puede usarse un extracto de oliva totalmente natural como fuente sustituta de HT en la fabricación de productos nutricionales, que puede mejorar la salud muscular, y proteger el músculo del daño inducido por el ejercicio a través de mecanismos que no están directamente asociados a la actividad antioxidante.

20 La patente japonesa JP 2005 058115 describe un extracto de oliva para uso para condimentar productos alimenticios y bebidas. La patente japonesa JP 58 146241 describe una goma de mascar que comprende un extracto de aceite de oliva. La patente internacional WO 2006/053872 describe el uso de hidroxitirosol como antioxidante para prevenir el daño muscular debido al ejercicio. La patente internacional WO 03/020026 describe el uso de una composición que comprende extracto de artemisia opcionalmente junto con extracto de hoja de olivo para incrementar la fortaleza de las células musculares y las células musculares. La patente internacional WO 03/082259 describe el uso de extractos fenólicos de olivas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. La patente japonesa JP 2002 153238 describe el uso de un glucósido que puede extraerse de la oliva en el envejecimiento sano y en la prevención de la arterioesclerosis. La patente de EE. UU. 6,399,116 describe un extracto de *Rhodiola crenulata* que contiene diversos principios activos que se dice que bajan los niveles de ácido láctico. La patente europea EP 1 639 902 describe una proantocianidina, en particular de extracto de la corteza de pino, que puede reducir el nivel de ácido láctico en el ejercicio físico.

30 Breve descripción de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

35 Esta invención se refiere al uso de extractos de oliva según las reivindicaciones 1 y 5. Los extractos de oliva pueden usarse para preparar nutracéuticos que mejoren la salud muscular y, en particular, para proteger los músculos durante el ejercicio, mejorar la recuperación de lesiones durante el ejercicio y aliviar la mialgia relacionada con el ejercicio. Si bien el extracto de oliva se usa como alimento humano, también puede aplicarse a animales, en particular a aquellos dedicados a ejercicio o trabajo intenso, tales como los animales para carreras (perros, camellos, caballos) y animales que remolcan cargas pesadas (caballos de granja, perros de trineo y similares).

Se ha encontrado que el extracto de oliva puede proteger los músculos al menos de dos maneras que no están directamente asociadas a sus propiedades antioxidantes.

40 Primera, el extracto de oliva disminuye la cantidad de ácido láctico que se puede acumular en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en las células musculares durante el ejercicio. Esto permite que el participante haga ejercicio o entrene durante un periodo de tiempo más prolongado y que haga ejercicio con más intensidad al tiempo que se minimice la mialgia posejercicio.

45 Segunda, el extracto de oliva incrementa los niveles de glutatión en el músculo asociados al ejercicio. Esto significa que el extracto de oliva está activando los mecanismos antioxidantes propios del cuerpo, además de que actúa como antioxidante por sí solo. Así, puede usarse un extracto de oliva para aumentar la capacidad antioxidante propia del cuerpo en el mantenimiento de la salud muscular.

50 El extracto de oliva puede usarse para mejorar la salud muscular administrando un extracto de oliva a un animal (incluyendo seres humanos) antes del ejercicio, durante el ejercicio, o poco después, para mantener la salud muscular y prevenir el daño muscular ocasionado durante el ejercicio. Una composición nutracéutica que comprenda extracto de oliva es eficaz en la mejora de la salud muscular en un animal, incluyendo los seres humanos, que es objeto de mialgia, dolor muscular y lesión muscular, posejercicio.

Descripción de las figuras

La figura 1 es la programación del estudio del ejemplo 1.

La figura 2 muestra la concentración de lactato en plasma (en porcentaje de cambio de los valores de referencia) como una función del tiempo, \*  $P < 0,05$  (hidroxitirosol frente a placebo) para el grupo de 8 sujetos.

- 5 La figura 3 compara la concentración de GSH (glutatión reducido), GSSG (glutatión oxidado (dímero)) y la actividad de la GR (glutatión reductasa) en los dos grupos (valores posejercicio comparados con valores preejercicio) en el grupo de 8 sujetos.

La figura 4 muestra el incremento en GSH, GSSH y GR después de ejercicio comparado con los valores de referencia (medias  $\pm$  SEM (error estándar de la media, por sus siglas en inglés) para el grupo de 8 sujetos).

- 10 El extracto de oliva disminuye la acumulación de ácido láctico

Se ha encontrado que los extractos de oliva disminuyen la acumulación de las concentraciones de ácido láctico/lactato durante el ejercicio, y en el ejercicio, en el plasma, en el cuerpo y en el músculo. El consumo de energía de las células musculoesqueléticas puede incrementarse hasta 100 veces cuando se va del reposo a ejercicio de alta intensidad. Esta alta demanda de energía puede exceder la capacidad aeróbica de las células musculares y una gran fracción del ATP requerido tendrá que venir del metabolismo anaeróbico. El ejercicio de alta intensidad también conduce a un rápido descenso en la función contráctil conocida como fatiga musculoesquelética. Así, una consecuencia del metabolismo anaeróbico es el descenso en la función contráctil.

- 15 La degradación anaerobia del glucógeno conduce a una acumulación intracelular de ácidos inorgánicos de los cuales el ácido láctico es cuantitativamente el más importante. El ácido láctico, que es un ácido fuerte, se disociará en iones lactato e iones hidrógeno; el propio lactato llega a ser una fuente de energía para las células musculares. Por lo tanto, la acidificación de los músculos baja la producción de energía muscular y produce fatiga y dolor muscular. La producción de lactato incrementada coincide con la acidosis celular y sigue siendo un buen marcador indirecto para las condiciones metabólicas celulares que inducen la acidosis metabólica.

- 20 Como los iones lactato e hidrógeno se refuerzan en las células durante el ejercicio o trabajo físico más prolongado, un sistema «cotransportador» retira iones hidrógeno de las células musculares, conservándose, así, unas condiciones de pH relativamente favorables, previniéndose la acumulación de iones hidrógeno en el músculo. El entrenamiento de enduro mejora la capacidad de este sistema de cotransporte.

- 25 El sistema de transporte de hidrógeno no es la única manera en que las células musculares pueden prevenir el refuerzo de ácido durante el ejercicio. Está también el sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que básicamente bombea iones hidrógeno fuera de las células musculares e introduce iones sodio para reemplazarlos (el lactato no participa en este procedimiento). Como sistema de transporte de hidrógeno, este intercambio consume energía y el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  parece ser críticamente importante durante el ejercicio.

- 30 Durante una actividad muscular intensa, el pH intracelular puede caer aproximadamente 0,5 unidades de pH. Hay dos líneas principales de evidencia que se han usado para relacionar este descenso en el pH con la disfunción contráctil en la fatiga. Primera, los estudios sobre fatiga muscular humana con frecuencia han demostrado una buena correlación temporal entre el descenso del pH muscular y la reducción de la producción de fuerza o energía. Segunda, los estudios sobre fibras musculoesqueléticas de piel han demostrado que la acidificación puede reducir tanto la fuerza isométrica como la velocidad de acortamiento (Hakan Westerblad *et al.* 2002 *News Physiol Sci* 17: 17-21).

- 35 Hasta ahora se conoce relativamente poco, excepto para el ejercicio, sobre cómo puede estar influida de manera positiva la presencia de iones hidrógeno en el músculo. Aunque se conoce poco sobre el mecanismo, se encuentra que el pH intracelular del músculo esquelético disminuye a medida que se acumula el ácido láctico. Una disminución de pH o la presencia de ácido láctico puede sentirse como fatiga muscular. Las posibles explicaciones para este fenómeno pueden ser que el pH bajo o la presencia de ácido láctico inhibe a las enzimas tales como la fosfofructocinasa que interviene en el mantenimiento del suministro energético muscular. Algunos artículos relacionan el pH bajo o la presencia de ácido láctico y el rendimiento reducido del músculo tal como la fuerza de salida.

- 40 Sorprendentemente se ha encontrado, de acuerdo con esta invención, que la ingesta de hidroxitirosol en forma de extracto de oliva disminuye el contenido de ácido láctico en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en las células musculares.

El extracto de oliva reduce la fatiga muscular y el dolor muscular y la mialgia posejercicio que se relacionan con un alto contenido de lactato en el músculo. Así, los extractos de oliva que contienen hidroxitirosol pueden usarse para prevenir, o disminuir la fatiga muscular, para prevenir o reducir el dolor muscular asociado al ejercicio y para permitir una recuperación más rápida de la fatiga muscular, el dolor muscular o la mialgia posejercicio.

La fatiga muscular, el dolor muscular y la mialgia posejercicio debidos al refuerzo de ácido láctico pueden estar presentes después del ejercicio físico. Para prevenir el efecto de la disminución de pH en las células musculares, el uso de extractos de oliva que contengan hidroxitirosol da como resultado una salud muscular mejor por la bajada de la fatiga muscular y permite, por lo tanto, un rendimiento muscular mejor. El último efecto es especialmente evidente en el ejercicio físico o en la práctica de deportes a largo plazo, así, preferiblemente en circunstancias en donde el ejercicio lleva entre media hora y ocho horas, preferiblemente entre media hora y dos horas.

Se observó que preferiblemente el extracto de oliva que contenía hidroxitirosol se tomaba antes del ejercicio o durante el ejercicio. Preferiblemente, el hidroxitirosol se consume por vía oral, pero no es una goma de mascar.

En una prueba, se consumió el hidroxitirosol en un tiempo entre diez minutos y una hora antes del ejercicio y se observó que el nivel de lactato en el plasma sanguíneo disminuía durante el ejercicio y después del ejercicio comparado con un experimento de referencia en donde se usó un placebo.

Se usó extracto de oliva que contenía hidroxitirosol para disminuir y prevenir los espasmos musculares y para permitir una recuperación más rápida de los espasmos musculares. Este espasmo puede resultar de estrés físico (por ejemplo, el ejercicio), estrés mental (por ejemplo, estrés en el trabajo o por exámenes) o de enfermedades relacionadas con el estrés como lesión por esfuerzo repetido (RSI, en inglés).

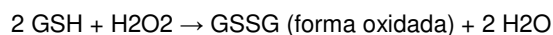
La RSI se refiere a un amplio intervalo de lesiones musculoesqueléticas tales como el síndrome del túnel carpiano, bursitis o tendinitis. También cubre trastornos de las extremidades superiores de origen laboral, lesiones por sobreuso ocupacionales o trastornos traumáticos acumulados. Estas lesiones pueden ocurrir, por ejemplo, en empleados dedicados al uso continuado del teclado de computadora. Otro término usado, a veces, para estos tipos de lesiones es el trastorno a causa de trabajo repetitivo (RMI, en inglés), un síndrome por uso excesivo asociado a la pérdida de función en una extremidad resultante del movimiento repetitivo o la carga estática sostenida.

Ventajosamente, los extractos de oliva que contienen hidroxitirosol pueden usarse para la fabricación de un nutracéutico, preferiblemente un medicamento para la disminución del nivel de lactato en el plasma sanguíneo, en el músculo o en el cuerpo y/o para prevenir o disminuir la fatiga muscular, el dolor muscular, la mialgia o los espasmos musculares o para recuperarse más rápido de la fatiga muscular, el dolor muscular, la mialgia o los espasmos musculares posejercicio. Los extractos de oliva de esta invención son útiles en el caso del rendimiento de un atleta de élite, así como después de un ejercicio o el rendimiento de una persona menos entrenada.

#### Niveles de glutatión

La presente invención también se refiere al uso de extractos de oliva que contienen hidroxitirosol para incrementar el nivel de glutatión presente en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en el músculo durante el ejercicio y después del ejercicio.

El glutatión es un aminoácido tripéptido producido en el hígado principalmente a partir de cisteína. Actúa como antioxidante celular por inhibición de la proliferación de radicales libres. Los antioxidantes actúan de diversas maneras para reducir los efectos de los radicales libres en las células musculares. Pueden actuar disminuyendo el daño ocasionado por los radicales libres, haciendo que dejen de formarse en un primer momento, u oxidándolos por combinación con ellos y neutralizando sus efectos perjudiciales por estabilización. La ingesta de antioxidantes puede afectar directamente a los radicales libres en el músculo. El glutatión es un antioxidante celular que se ha demostrado que reacciona en los radicales libres en el músculo y que ya está presente en el cuerpo. Está presente en su mayoría en forma reducida, glutatión (GSH). El ciclo del glutatión elimina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) en una reacción catalizada por peroxidasa GSH:



La ausencia o la función reducida de este sistema de defensa hace a la célula muscular vulnerable al estrés oxidativo.

El «ejercicio regular», es decir, el que no es tan intenso como el observado en atletas de élite o profesionales puede asociarse a un incremento compensatorio en las defensas celulares frente al daño de los radicales libres. Estas defensas implican varios mecanismos tales como una actividad enzimática antioxidante aumentada y cambios en las respuestas inmunitarias protectoras. Estas enzimas antioxidantes se sintetizan en el cuerpo e incluyen ciertos tioles, glutatión y ubiquinona. Los antioxidantes importantes, que no pueden sintetizarse en el cuerpo, deben tomarse en la dieta. Estos incluyen vitaminas C, E y betacaroteno. Estudios transversales indican que los atletas tienen mayores niveles de enzima antioxidante que los individuos sedentarios. Si esto es verdad, se podría concluir que los individuos físicamente activos pueden ser, por supuesto, más resistentes al daño por radicales libres. Los estudios de entrenamiento también han confirmado que parece ser una relación entre distancia de entrenamiento semanal y capacidad antioxidante. Cuanto más entrenados los individuos, más probable es que puedan contrarrestar un incremento en radicales libres generado por el ejercicio. El «atleta de fin de semana» que puede hacer ejercicio de

manera intensa solo en ocasiones, debe presentar más riesgo de daño oxidativo a las células. El mensaje clave que tiene que entender un nutricionista es que, puesto que el ejercicio intenso puede agotar la reserva de vitaminas antioxidantes, la densidad de nutrientes y la calidad de la dieta deben dirigirse a proporcionar cantidades adecuadas de estas vitaminas. No se puede asumir que una dieta equilibrada normal siempre vaya a ser adecuada para proporcionar suficientes niveles antioxidantes.

Se ha encontrado que la ingesta de extractos de oliva que contienen hidroxitirosol influye en el sistema del glutatión en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en el tejido muscular. Incluso más sorprendentemente, los extractos de oliva que contienen hidroxitirosol regulan hacia arriba el sistema del glutatión en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en el tejido muscular durante el ejercicio y después del ejercicio, dando como resultado un incremento del nivel de glutatión. El incremento en el nivel de glutatión conduce a un incremento del nivel de antioxidante total en el plasma sanguíneo y en el músculo. Como una posible consecuencia de esto, se reducirá la cantidad de peróxidos presente en el tejido muscular, que conducirá a un rendimiento muscular incrementado.

Los extractos de oliva que contienen hidroxitirosol pueden usarse para la fabricación de un nutraceutico, preferiblemente un medicamento para incrementar el nivel de glutatión en el plasma sanguíneo, en el músculo o en el cuerpo y/o el rendimiento muscular comparado con el nivel sin el uso de hidroxitirosol.

#### Formulaciones

Los extractos de oliva que contienen hidroxitirosol pueden usarse en cualquier forma adecuada tal como un alimento o una bebida, como alimento para usos nutricionales especiales, como suplemento dietético, como nutraceutico o incluso en piensos o alimento para mascotas.

El extracto de oliva que contiene hidroxitirosol puede añadirse en cualquier fase durante el tratamiento normal de estos productos. Los productos alimenticios adecuados incluyen, por ejemplo, barras de cereales, artículos de panadería tales como tartas y galletas y también alimentos líquidos tales como sopas y polvos para sopa. Las bebidas adecuadas incluyen bebidas alcohólicas y no alcohólicas, así como preparaciones líquidas a las que hay que añadir agua potable y alimentos líquidos. Las bebidas no alcohólicas son preferiblemente agua mineral, bebidas para deportistas, bebidas bajas en calorías, zumos de fruta, limonadas, tes y bebidas concentradas tales como inyecciones. Las bebidas para deportistas pueden ser hipotónicas, hipertónicas o isotónicas. Las bebidas para deportistas pueden estar disponibles en forma líquida, como concentrados o como polvo (para disolverse en un líquido, como por ejemplo agua). Los ejemplos de alimentos para usos nutricionales especiales incluyen las categorías de alimento deportivo, alimentos para adelgazamiento, fórmulas infantiles y alimentos para uso clínico.

El término «suplemento dietético» como se usa en la presente memoria indica un producto tomado por la boca que contiene un compuesto o una mezcla de compuestos destinados a suplementar la dieta. El compuesto o la mezcla de compuestos en estos productos pueden incluir: vitaminas, minerales, hierbas u otros ingredientes botánicos y aminoácidos. Los suplementos dietéticos pueden ser también extractos o concentrados y pueden encontrarse en muchas formas tales como comprimidos, cápsulas, geles blandos, cápsulas recubiertas de gel, líquidos o polvos.

El término nutraceutico como se usa en la presente memoria indica la utilidad en el campo de aplicación tanto nutricional como farmacéutico. El nutraceutico puede estar en cualquier forma que sea adecuada para administrar al cuerpo del animal, incluyendo el cuerpo de un ser humano, especialmente en cualquier forma que sea convencional para la administración oral, por ejemplo, en forma sólida tal como (aditivos/suplementos para) alimento o pienso, premezcla para alimento o pienso, comprimidos, píldoras, gránulos, caramelos confitados, cápsulas y formulaciones efervescentes tales como polvos y comprimidos, o en forma líquida tal como soluciones, emulsiones o suspensiones como, por ejemplo, bebidas, pastas y suspensiones oleosas. Asimismo, puede añadirse un suplemento multivitamínico y mineral a las composiciones nutraceuticas para obtener una cantidad adecuada de un nutriente esencial, que falta en algunas dietas. El suplemento multivitamínico y mineral también puede ser útil para la prevención de enfermedades y la protección contra pérdidas y deficiencias nutricionales debidas al estilo de vida. El nutraceutico puede comprender además los aditivos habituales, por ejemplo, edulcorantes, saborizantes, azúcar, grasa, emulgentes, conservantes. La nutrición también puede comprender otros componentes activos tales como proteínas (hidrolizadas) como se describe, por ejemplo, en la patente internacional WO02/45524. Puede haber también otros antioxidantes en la nutrición, por ejemplo, flavonoides, carotenoides, ubiquinonas, rutina, ácido lipoico, catalasa, glutatión(GSH) y vitaminas, tales como por ejemplo C y E o sus precursores.

El hidroxitirosol está presente ventajosamente en el extracto de oliva en una cantidad eficaz. Generalmente entre 1 mg y aproximadamente 500 mg de hidroxitirosol en un extracto de oliva es eficaz para que sirva para surtir efecto. Preferiblemente, hay entre 1 mg y 250 mg de hidroxitirosol en el extracto de oliva e incluso se usa más preferiblemente entre 1 mg y 100 mg en el extracto de oliva.

El nutraceutico que comprende extracto de oliva que contiene hidroxitirosol puede consumirse antes del ejercicio, durante el ejercicio o después del ejercicio. En el caso en que se use antes del ejercicio, es preferible que se consuma aproximadamente 20 minutos antes. En el caso en que se use después del ejercicio, es preferible que se consuma dentro de una hora después, más preferiblemente inmediatamente después del ejercicio.

Además de productos nutracéuticos adecuados para el consumo de los seres humanos, también es posible usar hidroxitirosol en pienso para animales incluyendo alimento para mascotas. Entonces es especialmente adecuado para animales, que se empleen por su fuerza muscular, por ejemplo, caballos (carreras) o perros (es decir, perros para carreras o perros para trineos).

5 Los siguientes ejemplos no limitantes se presentan para ilustrar mejor la invención.

### Ejemplo 1

#### Sujetos

10 Se reclutaron para el presente estudio ocho voluntarios macho sanos sin historial de participación en ningún programa de ejercicio regular. Las características de los sujetos se muestran en la tabla 1, a continuación. Se informó por adelantado a todos los sujetos sobre la naturaleza y los posibles riesgos de los procedimientos experimentales antes de que se obtuviera su consentimiento informado por escrito. Este estudio estaba homologado por el Comité de Revisión de Ética Médica del Academic Hospital Maastricht, Países Bajos.

#### Estandarización de la dieta y actividad previa al ensayo

15 Se instruyeron a los individuos para que no consumieran olivas, aceite de oliva, productos de la oliva, zumos de fruta, zumos vegetales, vino, más de dos tazas de té, más de una pieza de fruta, más de dos cucharadas de servir de verduras, chocolate y suplementos que contuvieran antioxidantes durante tres días previos al ensayo y el propio día del ensayo. Los voluntarios consumieron una dieta estándar (baja en antioxidantes) la noche antes del día del ensayo. Se pidió a los individuos que registraran su ingesta de alimento durante todo el periodo de ensayo. Se instruyeron a todos los individuos para que evitaran cualquier tipo de ejercicio físico pesado durante todo el periodo excepto para la sesión de ejercicios de resistencia.

#### Estudios

25 Se estudiaron todos los individuos en dos ocasiones diferentes. Por un diseño cruzado aleatorizado a los sujetos se les administró o extracto de oliva o placebo. Se tomaron bebidas dos veces, la noche antes del ensayo (8:00 p. m.) y 30 minutos antes del comienzo del ejercicio (figura 1). El extracto de oliva (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos) contenía 200 mg de hidroxitirosol. El placebo era similar en sabor y color.

#### Ejercicio de resistencia

30 En el presente estudio se usó el mismo protocolo de ejercicio que el descrito por Koopman *et al.* 2005 *Eur. J. Appl. Physiol.* 94:180-187. Los sujetos llegaron al laboratorio a las 8:00 a. m., en un estado de ayuno durante la noche. Los sujetos llevaron a cabo un calentamiento general de 5 min usando un aparato escalador Stairmaster (Jimsa Benelux BV, Rotterdam, Países Bajos). Después, la sesión de ejercicios de resistencia se orientó a las extremidades inferiores, con ocho series de diez repeticiones en la prensa horizontal para extremidades inferiores (Technogym BV, Rotterdam, Países Bajos) y ocho series de diez repeticiones en la máquina de extensión para extremidades inferiores (Technogym). Se realizaron los dos ejercicios en el 75 % de 1RM (función recuperar memoria) individual de los sujetos con intervalos de descanso de dos minutos entre series y requiriéndose en total para completarlos aproximadamente 40 minutos. Se animó verbalmente a todos los sujetos durante el ensayo para completar el protocolo entero. No se midió el gasto energético durante la sesión de ejercicio. Basándose en mediciones indirectas de calorimetría durante protocolos similares de ejercicio de resistencia, otras habían mostrado unas tasas de gasto energético variando entre 14 kJ·min<sup>-1</sup> y 27 kJ·min<sup>-1</sup> (Ballor *et al. Am. J. Clin. Nutr.* (1988) 47: 19-25 and Burleson *et al. Med. Sci. Sports Exerc.* (1998) 30:518-522).

#### Muestreo de sangre

Se recogió sangre antes del comienzo del ejercicio, durante el ejercicio y hasta dos horas y media después del ejercicio (figura 1). Se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían heparina y se pusieron en hielo. Después de centrifugación a 1000 g y 4 °C durante cinco minutos, se almacenaron alícuotas de plasma a -80 °C hasta el análisis.

45 Los análisis de sangre se dirigieron a marcadores de daño e inflamación y el nivel de antioxidantes. Los marcadores del daño fueron malondialdehído y carbonilos de proteína y los marcadores de la inflamación fueron NF-κβ, IL-6, IL-10 y TNFα (después de la estimulación de la sangre con LPS). Se midieron varios niveles de antioxidantes: capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés), ácido úrico, vitamina E, vitamina C, glucatión (GSH y GSSG), superóxido dismutasa, glucatión peroxidasa e hidroxitirosol. Adicionalmente, se determinaron los niveles de lactato en plasma.

Biopsias de músculo

5 Se tomaron muestras de biopsias de los músculos 30 minutos antes del comienzo del ejercicio y 30 minutos después del ejercicio. Se tomó la segunda biopsia de músculo de la extremidad inferior contralateral. Se obtuvieron biopsias de músculo de la región media del músculo vasto lateral (15 cm por encima de la rótula) y aproximadamente 3 cm por debajo de la entrada por la fascia usando la técnica de la biopsia percutánea con aguja (Bergstrom 1975, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 35: 518-522). Se diseccionaron cuidadosamente las muestras de músculo, se liberaron de todo material no muscular visible y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Una parte pequeña de la biopsia de músculo se embebió en Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Países Bajos) y se congeló rápidamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Las biopsias de músculo se almacenaron a -80 °C hasta el análisis.

10 Los siguientes parámetros se midieron en las biopsias de músculo: glutatión (GSH y GSSG), ácido úrico, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa (Gosker *et al.* 2005, *Respir. Med.* 99(1):118-125).

Recogida de orina

15 Se recogió la orina de la mañana el día del ensayo y el día después del día del ensayo. Las alícuotas de orina se congelaron a -80 °C hasta el análisis de 8-isoprostanos y creatinina.

Estadística

Todos los datos se expresan como medias ± SEM. Se usaron ensayos t pareados para comparar las diferencias entre suplemento previo con extracto de oliva y placebo. El significado estadístico se fijó para P < 0,05.

Tabla 1. Características de los sujetos

	Media ± SEM
Edad (años)	22,0 ± 1,9
Peso (kg)	75,4 ± 3,3
Altura (m)	1,82 ± 0,02
IMC (índice de masa corporal) (kg·m <sup>-2</sup> )	22,7 ± 0,8
Prensa extremidades inferiores 1RM (kg)	197 ± 10
Extensión extremidades inferiores 1RM (kg)	117 ± 6

20

**Ejemplo 2**

Acumulación de lactato

25 Se produjo lactato por producción de energía anaeróbica en el músculo. El lactato se acumula en el músculo y la sangre durante el ejercicio intenso, que disminuye el rendimiento del ejercicio. Se demostró en nuestro estudio que la concentración de lactato en plasma se incrementa considerablemente durante el ejercicio (figura 2). La concentración de lactato en plasma subió 14,8 veces durante el ejercicio, cuando se midió a los 30 y a los 60 minutos después del comienzo del ejercicio, respectivamente. Después de la ingesta de hidroxitirosol, la concentración de lactato en plasma se incrementó solo 12,8 veces durante el ejercicio (figura 2). El hidroxitirosol disminuyó la concentración máxima en plasma de lactato durante el ejercicio (figura 2).

30 **Ejemplo 3**

Sistema del glutatión en el músculo

El glutatión un elemento importante en la red antioxidante. El glutatión está presente mayoritariamente en su forma reducida (GSH). La enzima glutatión reductasa puede convertir el glutatión oxidado (GSSG) en GSH.

El hidroxitirosol aumenta el sistema antioxidante del glutatión en el músculo, es decir, el hidroxitirosol ayuda a mantener la función óptima del músculo y a proteger el músculo de daños a partir de ejercicio exhaustivo por incremento en los niveles de GSH, que conducen de ese modo una mayor relación GSH/GSSG.

- 5 La concentración de GSH en el músculo después del ejercicio se incrementó en individuos a los que se administró hidroxitirosol, comparado con aquellos a los que se administró placebo (figuras 3 y 4). La concentración de GSSG en el músculo se incrementó menos en el grupo de hidroxitirosol, comparado con el grupo de placebo (figura 3). El hidroxitirosol incrementó la actividad de la enzima glutatión reductasa después del ejercicio (figuras 3 y 4). La actividad de la glutatión reductasa se incrementó menos después de la ingesta de placebo.



**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un extracto de oliva que contiene hidroxitirosol para disminuir en seres humanos sanos la cantidad de ácido láctico acumulada en el plasma sanguíneo, en el cuerpo y en las células musculares durante el ejercicio.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la cantidad de hidroxitirosol en el extracto de oliva está entre 1 mg y 250 mg y preferiblemente entre 1 mg y 100 mg.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el extracto de oliva está comprendido en una composición nutracéutica.
4. El uso según la reivindicación 3, caracterizado por que el extracto de oliva se consume aproximadamente 20 minutos antes del ejercicio.
- 10 5. Uso de un extracto de oliva que contiene hidroxitirosol para incrementar en seres humanos sanos los niveles de glutatión en los músculos asociados al ejercicio.
6. El uso según la reivindicación 5, en donde la cantidad de hidroxitirosol en el extracto de oliva está entre 1 mg y 250 mg y preferiblemente entre 1 mg y 100 mg.
- 15 7. El uso según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que el extracto de oliva está comprendido en una composición nutracéutica.
8. El uso según la reivindicación 7, caracterizado por que el extracto de oliva se consume aproximadamente 20 minutos antes del ejercicio.

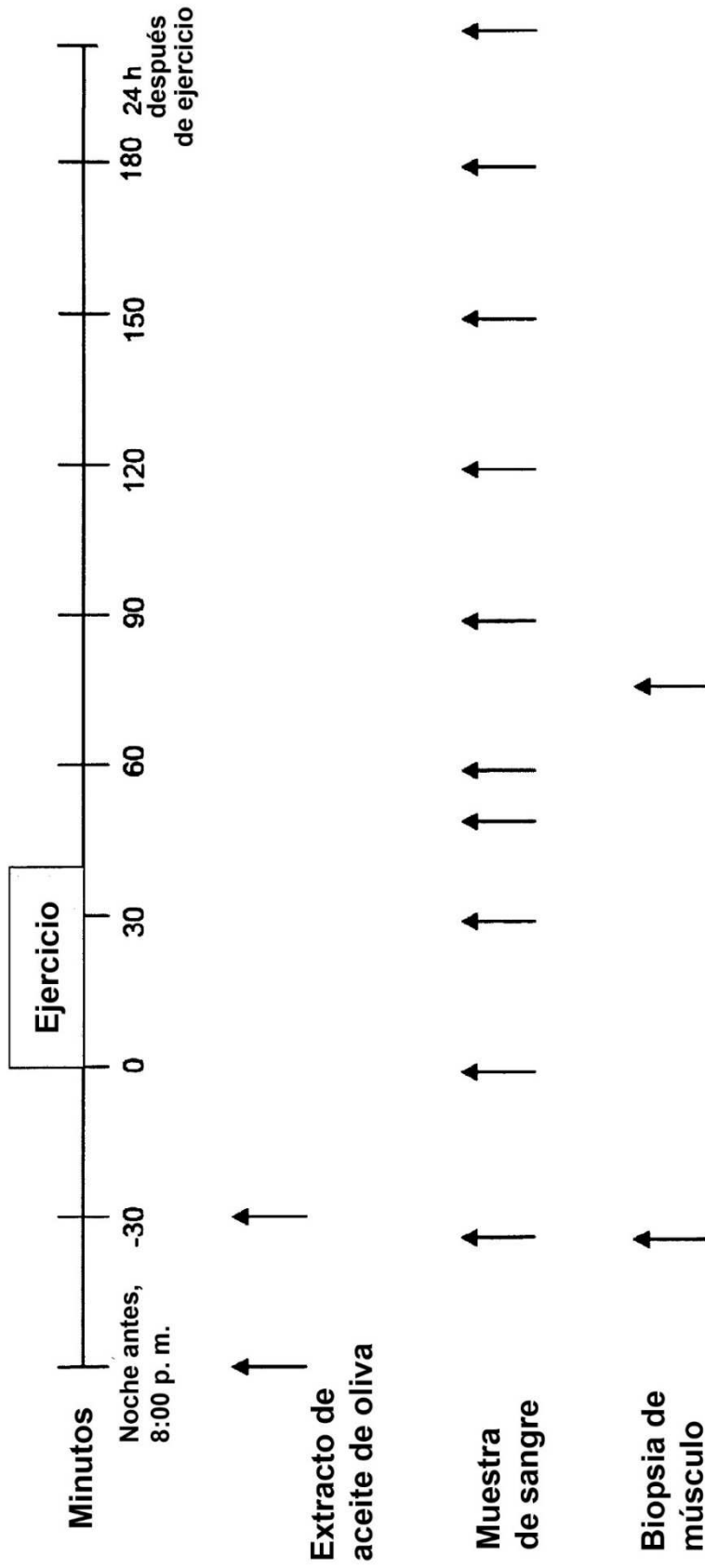
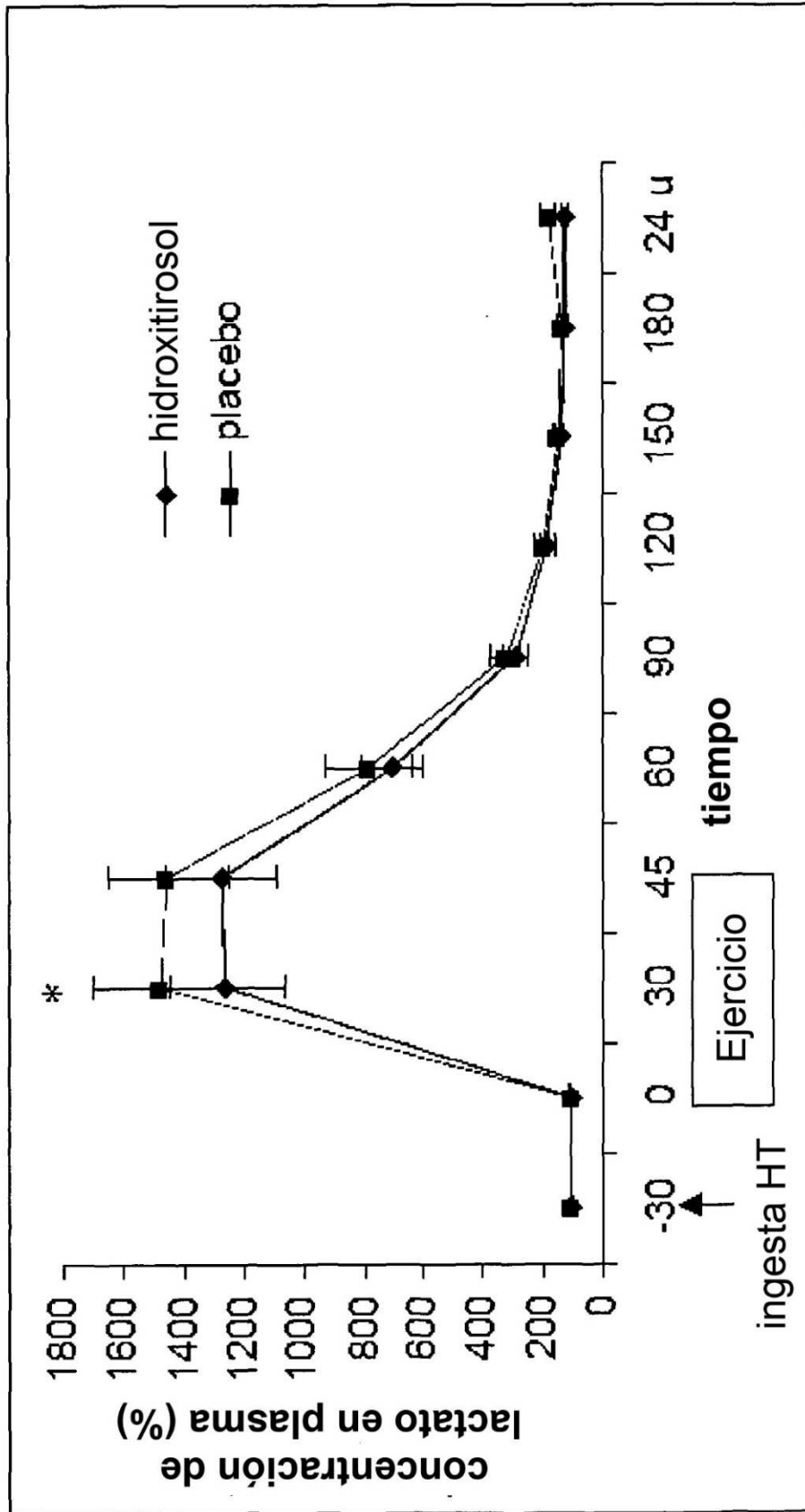


Figura 1



\* P < 0,05 (hidroxitirosol frente a placebo)

Figura 2

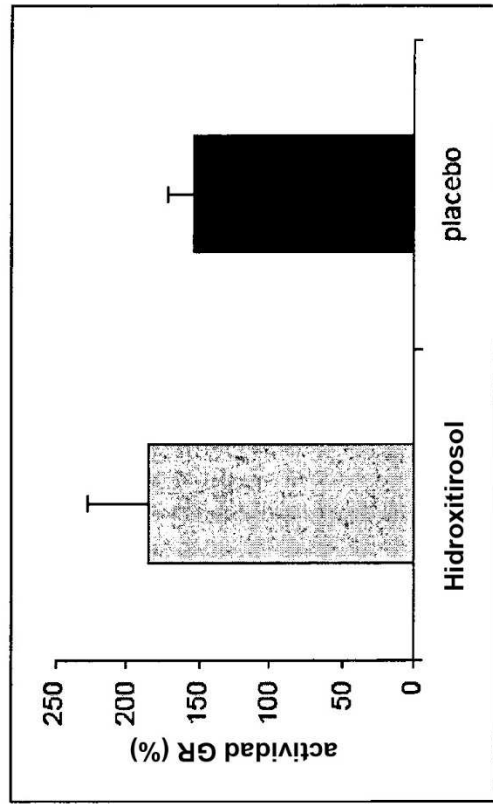
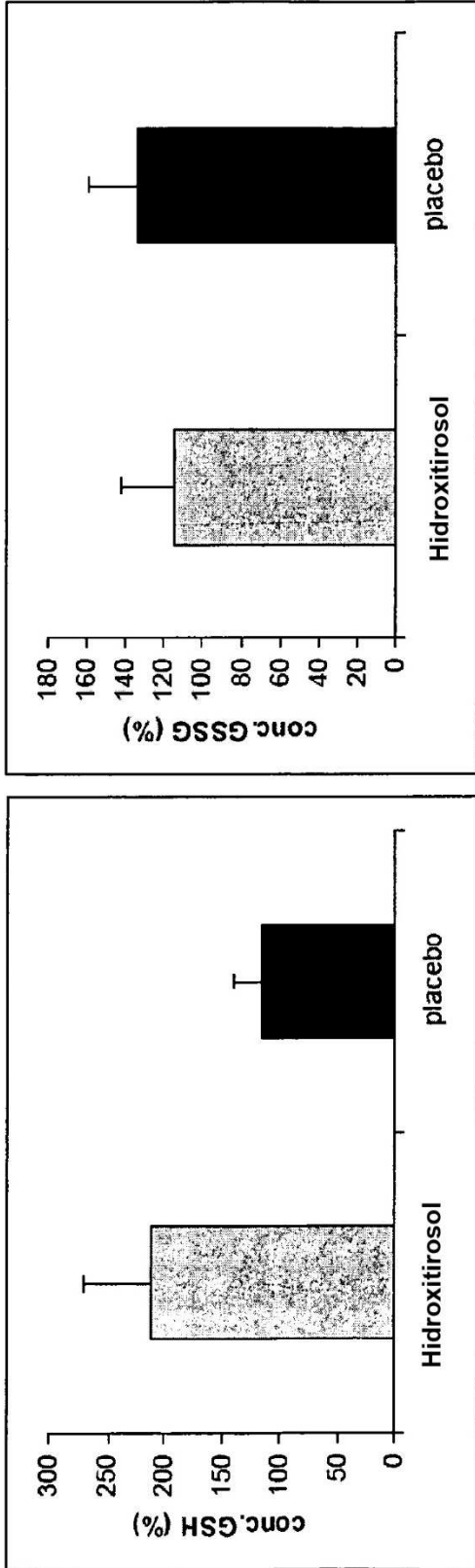


Figura 3

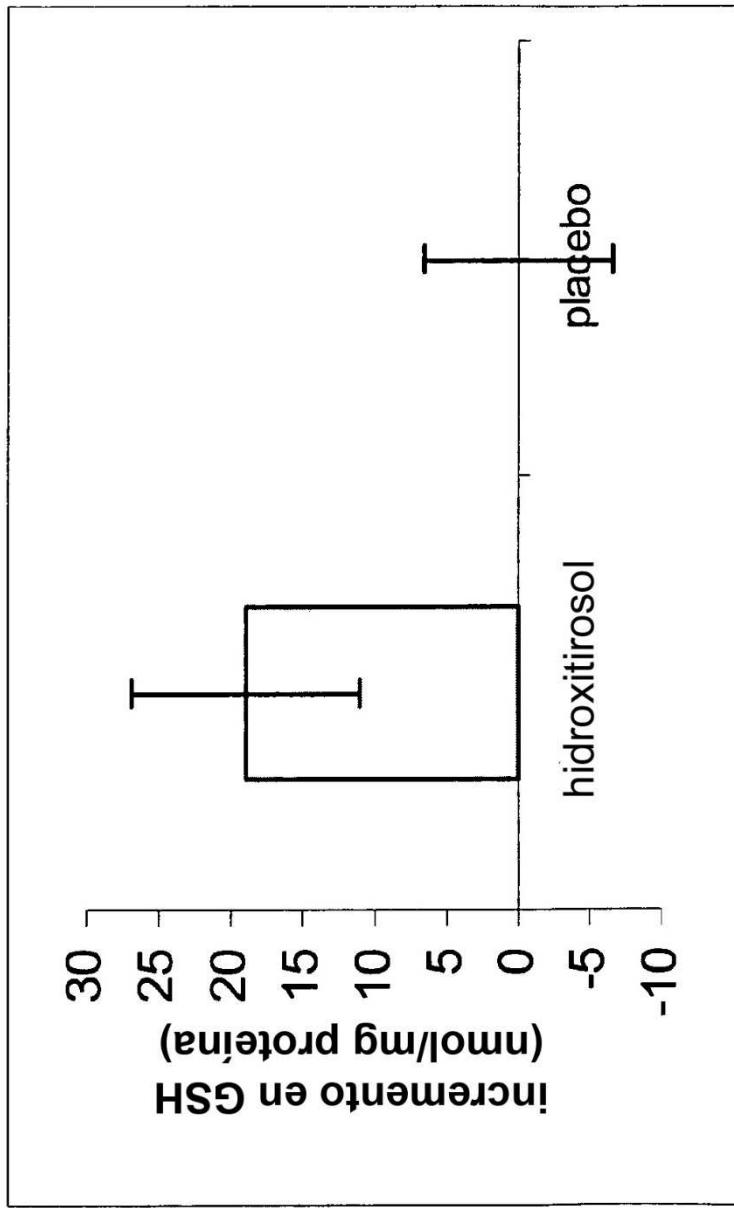


Figura 4A

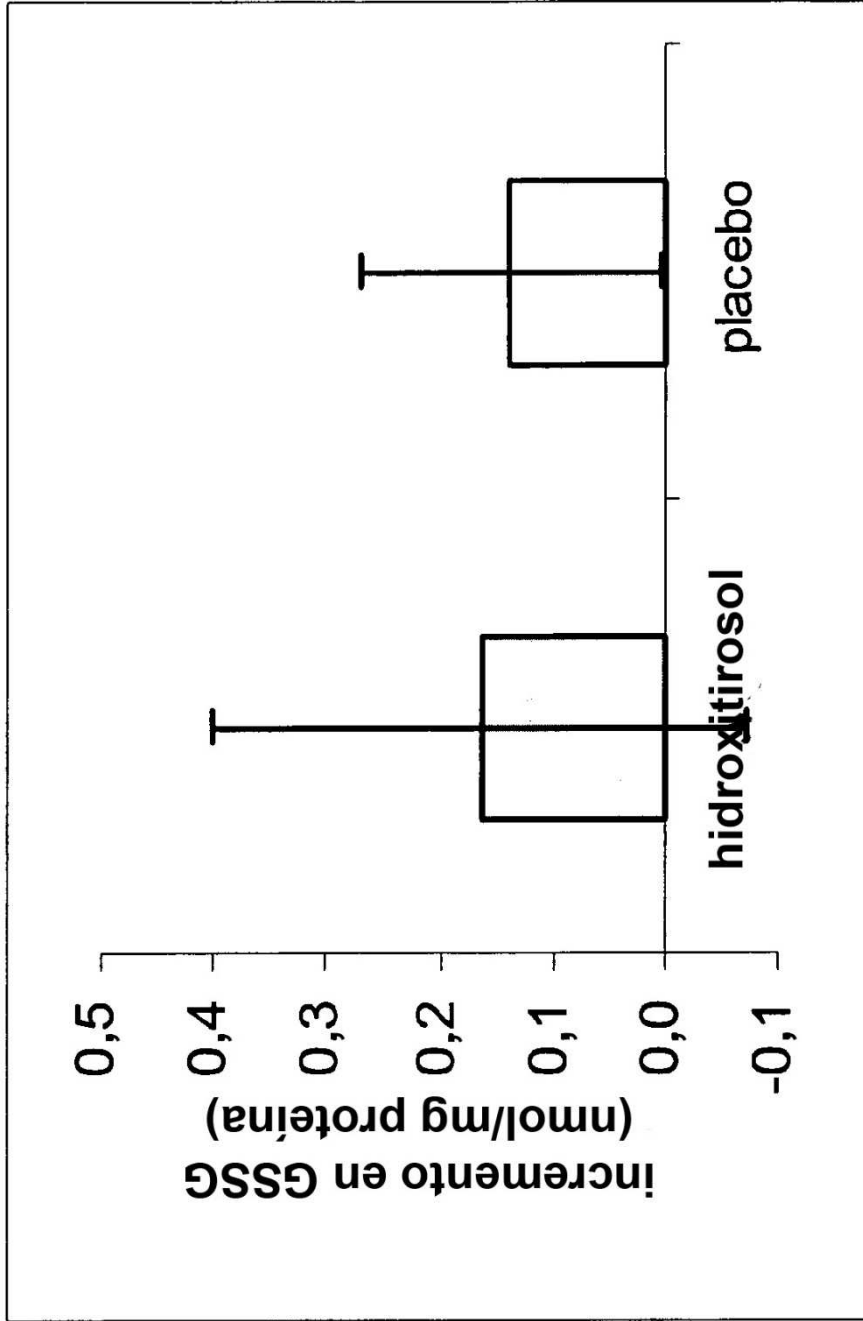


Figura 4B

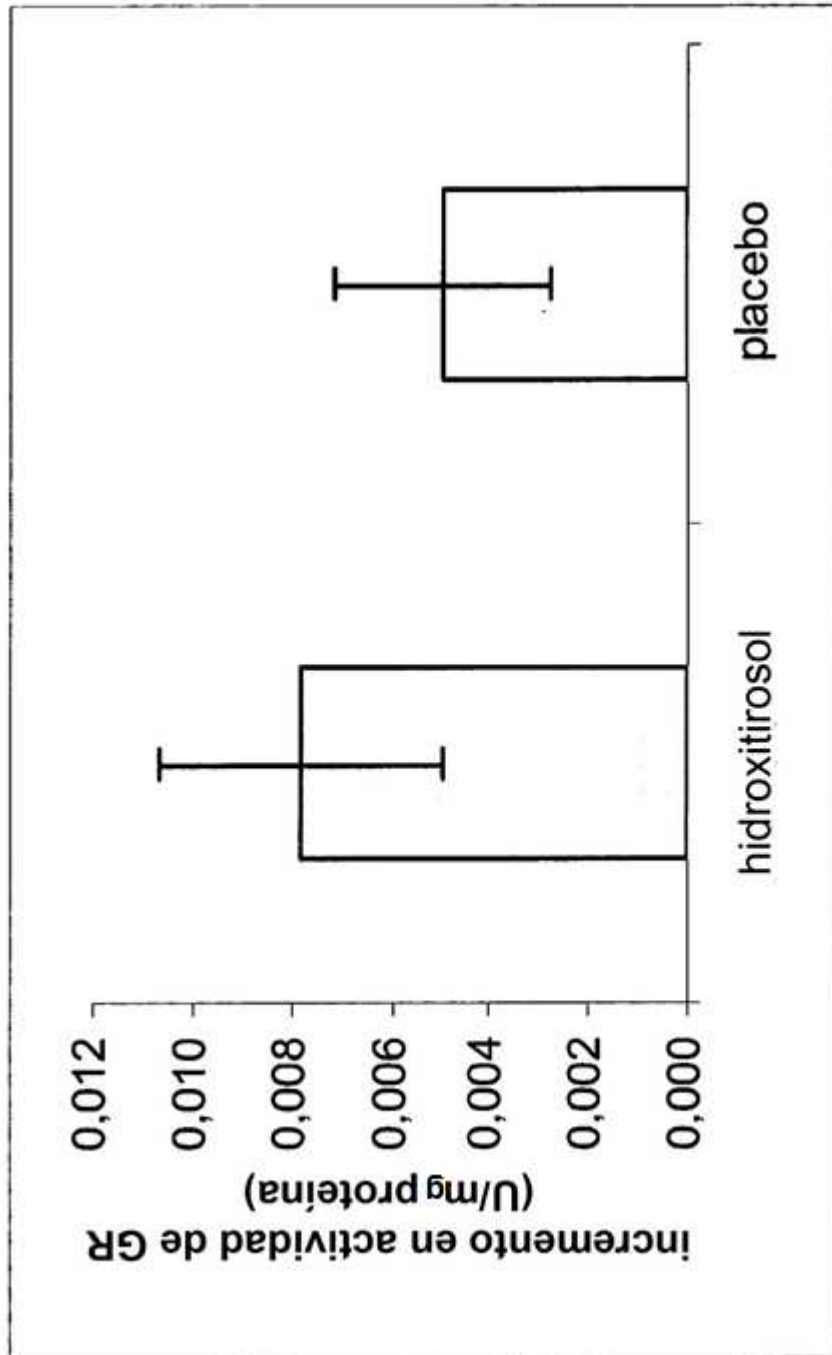


Figura 4C