

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 841**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)
A23L 33/10	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61K 35/742	(2015.01)
A61P 21/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2017 PCT/US2017/057549**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2018 WO18075867**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2017 E 17862326 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3528801**

54 Título: **Composiciones y métodos de uso de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) y probióticos**

30 Prioridad:

21.10.2016 US 201662411200 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2025

73 Titular/es:

**METABOLIC TECHNOLOGIES, LLC (100.00%)
2711 South Loop Drive, Suite 4400
Ames, IA 50010, US**

72 Inventor/es:

**HOFFMAN, JAY y
RATHMACHER, JOHN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

ES 2 996 841 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos de uso de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) y probióticos

5 Antecedentes de la invención

1. Campo

10 **[0001]** La presente divulgación se refiere a una composición que comprende β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) y a probióticos y métodos no terapéuticos de uso de la composición para atenuar los marcadores de citocinas inflamatorias y/o mantener la integridad muscular.

2. Antecedentes

15 HMB

[0002] El alfa-cetoisocaproato (KIC, por sus siglas en inglés) es el primer metabolito principal y activo de la leucina. Un producto menor del metabolismo de KIC es el β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). Se ha descubierto que el HMB es útil dentro del contexto de una diversidad de aplicaciones. Específicamente, en la Patente de EE.UU. N.º 5.360.613 (Nissen), el HMB se describe como útil para reducir los niveles en sangre de colesterol total y colesterol de lipoproteínas de baja densidad. En la Patente de EE.UU. N.º 5.348.979 (Nissen *et al.*), el HMB se describe como útil para promover la retención de nitrógeno en seres humanos. La Patente de EE.UU. N.º 5.028.440 (Nissen) analiza la utilidad del HMB para aumentar el desarrollo de tejido magro en animales. También, en la Patente de EE.UU. N.º 4.992.470 (Nissen), el HMB se describe como eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria de los mamíferos. La Patente de EE.UU. N.º 6.031.000 (Nissen *et al.*) describe el uso de HMB y al menos un aminoácido para tratar el desgaste asociado a enfermedad.

30 **[0003]** El uso de HMB para suprimir la proteólisis tiene su origen en las observaciones de que la leucina tiene características ahorradoras de proteínas. El aminoácido esencial leucina puede usarse para la síntesis de proteínas o transaminarse a α -cetoácido (α -cetoisocaproato, KIC). En una ruta, KIC puede oxidarse a HMB y esto representa aproximadamente el 5 % de la oxidación de la leucina. El HMB es superior a la leucina para aumentar la masa muscular y la fuerza. Los efectos óptimos del HMB pueden alcanzarse con 3,0 gramos al día cuando se administra como sal cálcica de HMB, o 0,038 g/kg de peso corporal al día, mientras que los de leucina requieren más de 30,0 gramos al día.

35 **[0004]** Una vez producido o ingerido, el HMB parece tener dos destinos. El primer destino es la simple excreción en la orina. Después de que se suministre el HMB, aumentan las concentraciones en orina, dando lugar a una pérdida aproximada del 20-50 % de HMB en la orina. Otro destino está relacionado con la activación de HMB a HMB-CoA. Una vez convertido en HMB-CoA, puede producirse un metabolismo adicional, ya sea la deshidratación de HMB-CoA a MC-CoA o bien una conversión directa de HMB-CoA a HMG-CoA, que proporciona sustratos para la síntesis intracelular de colesterol. Varios estudios han demostrado que el HMB se incorpora a la ruta de síntesis del colesterol y podría ser una fuente de nuevas membranas celulares que se usan para la regeneración de las membranas celulares dañadas. Los estudios en seres humanos han demostrado que el daño muscular tras un ejercicio intenso, medido por CPK (creatina fosfoquinasa) en plasma elevada, se reduce con la suplementación de HMB en las primeras 48 horas. El efecto protector del HMB dura hasta tres semanas con un uso diario continuado. Numerosos estudios han demostrado que una dosis eficaz de HMB es de 3,0 gramos al día como CaHMB (HMB cálcico) (~38 mg •kg de peso corporal⁻¹-día⁻¹). El HMB se ha probado para comprobar su seguridad, sin mostrar efectos secundarios en adultos jóvenes o mayores sanos. También se ha demostrado que el HMB en combinación con L-arginina y L-glutamina es seguro cuando se suplementa a pacientes con SIDA y cáncer.

50 **[0005]** Recientemente, se ha desarrollado ácido libre de HMB, una nueva forma de suministro de HMB. Se ha demostrado que esta nueva forma de administración se absorbe más rápidamente y tiene un mayor aclaramiento tisular que CaHMB. La nueva forma de suministro se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. con N.º de Serie 20120053240.

55 **[0006]** Se ha demostrado que el HMB mejora la recuperación y atenúa el daño muscular provocado por el ejercicio de alta intensidad. El HMB atenúa la depresión de la síntesis proteica con TNF-alfa y disminuye la degradación proteica asociada a TNF.

60 **[0007]** En estudios que examinan la actividad física intensa con una recuperación mínima, tal como la que encuentran los soldados durante las operaciones de combate sostenidas, el uso de suplementos de HMB puede mitigar los efectos negativos asociados a este estrés físico. La disminución significativa de la masa corporal, la fuerza y la potencia se han informado en los soldados durante operaciones militares sostenidas. Estas tensiones también se asocian a elevaciones significativas de los marcadores de citocinas inflamatorias. Un estudio de campo reciente demostró que cuando los soldados reciben suplementos de HMB durante tres semanas de entrenamiento intenso, incluyendo el combate simulado, la respuesta inflamatoria se atenuó y se acompañó de un mantenimiento de la

integridad muscular determinada mediante imágenes de tensor de difusión. Estos resultados fueron coherentes con otras investigaciones que informaron de que los suplementos de HMB de duración corta (por ejemplo, 4 días) y larga (por ejemplo, 12 semanas) pueden atenuar la respuesta de las citocinas a un protocolo de daño muscular.

5 Probióticos

[0008] El uso de probióticos como suplemento dietético se ha hecho muy popular en los últimos años para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Los probióticos son bacterias vivas que se sugiere que son beneficiosas para mejorar la salud digestiva y la función inmunitaria, al tiempo que disminuye la inflamación. Se cree que los probióticos, tales como *Bacillus coagulans*, pueden mejorar la digestión enzimática de los alimentos en el intestino, lo que da como resultado una mayor absorción de nutrientes.

[0009] Se ha descubierto de forma sorprendente e inesperada que el HMB en combinación con probióticos atenúa los marcadores de citocinas inflamatorias y mantiene la integridad muscular. Una reducción de la respuesta de las citocinas al entrenamiento intenso se ha usado a menudo para indicar una recuperación más favorable del entrenamiento de alta intensidad. La combinación de HMB y probióticos es sinérgica, de tal manera que la combinación produce una mayor absorción de HMB y un mayor aumento del HMB circulante en comparación con la administración de HMB solo. Este sinergismo entre el HMB y los probióticos se demuestra por una mejor atenuación de los marcadores de citocinas inflamatorias y de la integridad muscular en comparación con los efectos del HMB cuando se administra solo.

[0010] El documento WO 2014/144458 A1 describe una composición nutricional que comprende de aproximadamente 1 g a aproximadamente 3 g de HMB y al menos un probiótico. Además describe una composición tal para su uso en el aumento de la síntesis de proteínas musculares, o la disminución de la degradación de proteínas musculares, o la reducción de la necrosis o apoptosis muscular.

[0011] El documento US 2016/037815 A1 describe una composición nutricional que comprende de aproximadamente 0,2 g a aproximadamente 4 g de HMB y al menos un probiótico. Describe además una composición tal para su uso en el mantenimiento de la integridad muscular.

[0012] El documento US 2016/066610 A1 describe una composición nutricional que comprende de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 3 g de HMB y al menos un probiótico. Describe además una composición tal para su uso en el mantenimiento de la función muscular.

[0013] El documento WO 2015/105981 A2 describe una composición nutricional que comprende de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 3 g de HMB y al menos un probiótico.

[0014] El documento WO 2014/099904 A1 describe una composición nutricional que comprende de aproximadamente 0,4 g a aproximadamente 4 g de HMB y al menos un probiótico.

[0015] Jäger *et al.*, PeerJ, vol. 4, 2016, páginas 1-14 describen la utilidad del probiótico *Bacillus coagulans* para reducir el daño muscular inducido por el ejercicio.

[0016] El protocolo del estudio clínico NCT02762968, presentado el 3 de mayo de 2016 (v1), describe una combinación de cápsulas que proporcionan 3 g de HMB cálcico al día más *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 (BC30) mezclado en agua. Describe además que se evaluarán los marcadores de daño muscular, pero no divulga los resultados de ningún estudio.

50 Sumario de la invención

[0017] La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la divulgación

[0018] La composición, los usos médicos de la composición y los métodos descritos en el siguiente sumario de la divulgación no están cubiertos por la invención reivindicada.

[0019] La divulgación proporciona una composición para su uso en el mantenimiento de la integridad muscular.

[0020] La divulgación proporciona una composición para su uso en la atenuación de los marcadores de citocinas inflamatorias.

[0021] La divulgación proporciona métodos de administración de una composición para su uso en el mantenimiento de la integridad muscular.

[0022] La divulgación proporciona métodos de administración de una composición para su uso en la atenuación de

marcadores de citocinas inflamatorias.

[0023] La divulgación proporciona métodos para mejorar la absorción de HMB mediante la adición de probióticos a una composición que contiene HMB.

[0024] La divulgación proporciona métodos para aumentar el tiempo que el HMB está en el torrente sanguíneo mediante la adición de probióticos a una composición que contiene HMB.

[0025] Estos y otros aspectos de la presente divulgación resultarán evidentes para los expertos en la materia al consultar la siguiente memoria descriptiva, los dibujos y las reivindicaciones.

[0026] La presente divulgación pretende superar las dificultades encontradas hasta ahora. Con este fin, la divulgación proporciona una composición que comprende HMB y probióticos. La composición se administra a un sujeto que lo necesite. Todos los métodos comprenden administrar al animal HMB y probióticos. Los sujetos incluidos son seres humanos y mamíferos no humanos. La composición se consume por un sujeto que lo necesite.

Breve descripción de los dibujos

[0027]

La Figura 1 representa cambios en la respuesta de las citocinas inflamatorias al entrenamiento militar intenso tras cuarenta (40) días de suplementación.

La Figura 2 representa cambios en la medición de DTI tras cuarenta (40) días de suplementación.

Descripción detallada

[0028] La presente invención se refiere a un uso no terapéutico de una composición que comprende de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g de ácido β-hidroxi-β-metilbutírico (HMB) y al menos un probiótico para su uso en el mantenimiento de la integridad muscular en un animal que lo necesite, en donde la composición es para administrarse al animal, en donde el animal es un ser humano o un mamífero no humano, en donde el probiótico es *Bacillus coagulans*.

[0029] Se ha descubierto sorprendente e inesperadamente que los probióticos y el HMB tienen una relación sinérgica. El uso de composiciones que contienen HMB y probióticos da como resultado la atenuación de los marcadores de citocinas inflamatorias y el mantenimiento de la integridad muscular, y estos efectos se observan en mayor cantidad que la administración de HMB solo. La combinación de HMB y probióticos es sinérgica, de tal manera que la combinación produce una mayor absorción de HMB y un mayor aumento del HMB circulante en comparación con la administración de HMB solo.

HMB

[0030] El ácido β-hidroxi-β-metilbutírico, o ácido β-hidroxi-isovalérico, puede representarse en su forma de ácido libre como (CH₃)₂(OH)CCH₂COOH. El término "HMB" se refiere al compuesto que tiene la fórmula química anterior, tanto en su forma de ácido libre como de sal. Aunque en el contexto de la presente invención puede usarse cualquier forma de HMB, preferentemente el HMB se selecciona del grupo que comprende un ácido libre, una sal, un éster y una lactona. Los ésteres de HMB incluyen ésteres metílicos y etílicos. Las lactonas de HMB incluyen lactona isovalarílica. Las sales de HMB incluyen sal de sodio, sal de potasio, sal de cromo, sal de calcio, sal de magnesio, sales de metales alcalinos y sales de metales alcalinotérreos.

[0031] Los métodos para producir HMB son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, HMB puede sintetizarse por oxidación de alcohol de diacetona. Un procedimiento adecuado es el descrito por Coffman *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 80: 2882-2887 (1958). Como se describe en el mismo, el HMB se sintetiza mediante una oxidación alcalina con hipoclorito sódico del alcohol de diacetona. El producto se recupera en forma de ácido libre, que puede convertirse en sal. Por ejemplo, el HMB puede prepararse como su sal cálcica mediante un procedimiento similar al de Coffman *et al.* (1958) en el cual el ácido libre del HMB se neutraliza con hidróxido cálcico y se recupera por cristalización a partir de una solución acuosa de etanol. La sal cálcica del HMB está disponible en el mercado en Metabolic Technologies, Ames, Iowa.

Suplemento de β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB) cálcico

[0032] Hace más de 2 décadas, la sal cálcica del HMB se desarrolló como suplemento nutricional para los seres humanos. Los estudios han demostrado que 38 mg de CaHMB por kg de peso corporal parece ser una dosis eficaz para una persona promedio.

[0033] Se han descrito los mecanismos moleculares por los que el HMB disminuye la degradación proteica y aumenta la síntesis proteica. Eley *et al* realizaron estudios *in vitro* que han demostrado que el HMB estimula la síntesis

de proteínas a través de la fosforilación de mTOR. Otros estudios han demostrado que el HMB disminuye la proteólisis a través de la atenuación de la inducción de la vía proteolítica ubiquitina-proteosoma cuando el catabolismo de proteínas musculares es estimulado por el factor inductor de proteólisis (PIF), lipopolisacárido (LPS) y angiotensina II. Otros estudios han demostrado que el HMB también atenúa la activación de las proteasas caspasas-3 y -8.

5

Forma de ácido libre de HMB

[0034] En la mayoría de los casos, el HMB utilizado en estudios clínicos y comercializado como ayuda ergogénica ha sido en forma de sal de calcio. Los últimos avances han permitido fabricar el HMB en forma de ácido libre para su uso como un suplemento nutricional. Recientemente, se desarrolló una nueva forma de ácido libre de HMB, que se absorbe más rápidamente que CaHMB, dando como resultado niveles séricos máximos de HMB más rápidos y elevados y a un mejor aclaramiento del suero a los tejidos.

10

[0035] Por lo tanto, el ácido libre de HMB puede ser un método más eficaz de administrar HMB que la forma de sal cálcica, particularmente cuando se administra directamente antes de un ejercicio intenso. Un experto habitual en la técnica, sin embargo, reconocerá que la presente invención abarca el HMB en cualquier forma.

15

[0036] El HMB en cualquier forma puede incorporarse a la forma de suministro y/o administración de tal manera que dé como resultado un intervalo de dosificación típico de aproximadamente 0,5 gramos de HMB a aproximadamente 30 gramos de HMB.

20

[0037] Puede usarse cualquier dosis adecuada de HMB en el contexto de la presente divulgación. Los métodos para calcular las dosis adecuadas son bien conocidos en la técnica. La cantidad dosificada de HMB puede expresarse en términos de la correspondiente cantidad molar de Ca-HMB. El intervalo de dosis dentro del cual puede administrarse el HMB por vía oral o intravenosa está en el intervalo de 0,01 a 0,2 gramos de HMB (Ca-HMB) por kilogramo de peso corporal cada 24 horas. Para adultos, asumiendo pesos corporales de aproximadamente 100 a 200 libras, la cantidad de dosificación por vía oral o intravenosa de HMB (base Ca-HMB) puede variar de 0,5 a 30 gramos por sujeto y por 24 horas.

25

Probióticos

30

[0038] Los probióticos, tales como *Bacillus coagulans* (BC30), tienen muchos beneficios para la salud incluyendo mejorar la salud digestiva y la función inmunitaria y disminuir la inflamación. Además, estudios anteriores han sugerido que BC30 puede potenciar la absorción de proteínas. Cualquier probiótico es adecuado para su uso en la composición descrita en el presente documento. Las cantidades apropiadas de *Bacillus coagulans* se entenderán por aquellos expertos en la materia. Una composición típica de la presente divulgación contendrá en una formulación de dosificación de un gramo de 2×10^5 a 10^{10} unidades formadoras de colonias de bacterias viables o esporas bacterianas (en el caso de *Bacillus coagulans*). En otras realizaciones, la cantidad de bacterias incluye probióticos en una concentración de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^{12} bacterias viables. Las bacterias *Bacillus coagulans* están en forma de esporas, células vegetativas o una combinación de las mismas. Aunque *Bacillus coagulans* se usó en los ejemplos experimentales, la divulgación no se limita a esta especie particular de *Bacillus*. Cualquier especie de bacteria probiótica puede usarse en las composiciones y los métodos de la presente divulgación.

35

40

[0039] Cuando la composición se administra por vía oral en forma comestible, la composición está preferentemente en forma de un suplemento dietético, un producto alimentario o un medio farmacéutico, más preferentemente en forma de un suplemento dietético o un producto alimentario. En el contexto de la presente invención puede usarse cualquier suplemento dietético o producto alimentario adecuado que comprenda la composición. Un experto habitual en la materia comprenderá que la composición, independientemente de la forma (tal como un suplemento dietético, un producto alimentario o un medio farmacéutico), puede incluir aminoácidos, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, grasas, azúcares, minerales y/u oligoelementos.

45

50

[0040] Para preparar la composición como un suplemento dietético o un producto alimentario, la composición se combinará o se mezclará normalmente de tal manera que la composición se distribuya de manera sustancialmente uniforme en el suplemento dietético o producto alimentario. Como alternativa, la composición puede disolverse en un líquido, tal como agua.

55

[0041] La composición del suplemento dietético puede ser un polvo, un gel, un líquido o puede estar tabulado o encapsulado.

60

[0042] Aunque cualquier medio farmacéutico adecuado que comprenda la composición puede usarse dentro del contexto de la presente invención, preferentemente, la composición se combina con un vehículo farmacéutico adecuado, tal como dextrosa o sacarosa.

65

[0043] Adicionalmente, la composición del medio farmacéutico puede administrarse por vía intravenosa de cualquier forma adecuada. Para administración a través de perfusión intravenosa, la composición se presenta preferentemente en una forma no tóxica hidrosoluble. La administración intravenosa es particularmente adecuada para pacientes

hospitalizados que se someten a terapia intravenosa (IV). Por ejemplo, la composición puede disolverse en una solución IV (por ejemplo, una solución salina o de glucosa) que se administre al paciente. También, la composición puede añadirse a soluciones IV nutricionales, que pueden incluir aminoácidos, glucosa, péptidos, proteínas y/o lípidos. Las cantidades de la composición a administrar por vía intravenosa pueden ser similares a los niveles usados en la administración oral. La perfusión intravenosa puede ser más controlada y precisa que la administración oral.

[0044] Los métodos para calcular la frecuencia con que se administra la composición son bien conocidos en la técnica y puede usarse cualquier frecuencia de administración adecuada en el contexto de la presente invención (por ejemplo, una dosis de 6 g al día o dos dosis de 3 g al día) y durante cualquier periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, puede administrarse una dosis única durante un periodo de tiempo de cinco minutos o durante un periodo de tiempo de una hora, o, como alternativa, pueden administrarse múltiples dosis durante un periodo de tiempo prolongado). La composición puede administrarse durante un periodo de tiempo prolongado, tal como semanas, meses o años.

[0045] Puede usarse cualquier dosis adecuada de HMB y probióticos en el contexto de la presente divulgación. Los métodos para calcular las dosis adecuadas son bien conocidos en la técnica.

[0046] Se entenderá por un experto en la materia que el HMB y los probióticos no tienen que administrarse en la misma composición para realizar los métodos divulgados. Dicho de otra manera, cápsulas separadas, píldoras, mezclas, etc. de probióticos y de HMB pueden administrarse a un sujeto para llevar a cabo los métodos divulgados.

[0047] El término administrar o administración incluye proporcionar una composición a un mamífero, consumir la composición y combinaciones de los mismos.

Ejemplos experimentales

[0048] Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención en más detalle. Se entenderá fácilmente que la composición de la presente divulgación, como se describe generalmente y se ilustra en los Ejemplos en el presente documento, podrían sintetizarse en diversas formulaciones y formas de dosificación.

MÉTODOS

Participantes

[0049] Veintiséis soldados varones de una unidad de combate de élite de las Fuerzas de Defensa de Israel (IDF) se ofrecieron voluntarios para participar en este estudio de doble enmascaramiento, de diseño paralelo. Después de una explicación de todos los procedimientos, riesgos y beneficios, cada participante dio su consentimiento informado para participar en el estudio. Este estudio de investigación fue aprobado por el IDF Medical Corp y por el Medical Ethics Board y por el Helsinki Committee of Soroka Medical Center. A los participantes no se les permitió usar ningún suplemento dietético adicional ni consumir ningún andrógeno ni otras drogas para mejorar el rendimiento. La detección del consumo de drogas para mejorar el rendimiento y de suplementos adicionales se realizó mediante un cuestionario de salud cumplimentado durante el reclutamiento de los participantes. Los soldados pertenecían a la misma unidad y fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos: CaHMB con BC30 (CaHMBBC30; n = 9; 20,5 ± 0,8 años; 1,75 ± 0,09 m; 75,4 ± 9,6 kg) o CaHMB con placebo (CaHMBPL; n = 9; 19,1 ± 3,4 años; 1,73 ± 0,05 m; 71,4 ± 6,4 kg). Un tercer grupo de participantes de la misma unidad, que estaban interesados en participar en el estudio, pero no estaban interesados en consumir un suplemento aceptaron servir como grupo de control (CTL; n = 8; 20,4 ± 0,7 años; 1,73 ± 0,05 m; 68,6 ± 5,3 kg).

Protocolo del estudio

[0050] Durante el periodo de intervención de 40 días, todos los participantes realizaron el mismo protocolo diario. Durante los primeros 28 días los soldados fueron acuartelados en la base y participaron en las mismas tareas de entrenamiento militar avanzado que incluían el desarrollo de habilidades de combate y el acondicionamiento incluyendo 90 minutos de intenso entrenamiento de combate cuerpo a cuerpo (krav-maga) cinco veces por semana. El entrenamiento físico incluía en promedio de dos carreras de 5 km por semana. Durante las semanas 5 y 6 los soldados estuvieron sobre el terreno y recorrieron entre 25 km - 30 km por noche en terreno difícil llevando aproximadamente 35 kg de equipo a la espalda (lo que equivale aproximadamente al 40 % de la masa corporal del participante). La duración del ejercicio de navegación duró entre 5 - 8 horas por tarde. Durante la última tarde de entrenamiento (día 40), los soldados también realizaron un transporte en camilla adicional de 5 km tras el entrenamiento de navegación. Durante las dos últimas semanas de entrenamiento los soldados durmieron entre 5 - 8 horas por noche. Todas las evaluaciones (extracciones de sangre y resonancia magnética [MRI]) se realizaron en un solo día antes (PRE) y aproximadamente 12 horas después del consumo final del suplemento (el día 40) (POST). Todas las evaluaciones se realizaron en el mismo orden tanto en PRE como en POST.

Protocolo de suplementación

[0051] Los participantes tanto en CaHMBBC30 como en CaHMBPL ingirieron 1,0 g de CaHMB tres veces al día para un consumo diario total de 3 g. Cada ración consistió en 4 cápsulas (250 mg de CaHMB) consumidas durante las comidas de la mañana, la tarde y la noche. CaHMB se obtuvo en Metabolic Technologies Inc. (Ames, IA, EE.UU.). El suplemento probiótico (*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086) fue proporcionado por Geneden Biotech, Inc (Mayfield Hts, OH, EE.UU.). Cada porción contenía $2,0 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colonias. Los participantes consumieron una ración al día (comida de la mañana). El placebo fue proporcionado por el fabricante y tenía el mismo aspecto, peso y sabor que el producto activo. Tanto el placebo como el producto activo se suministraron en forma de polvo y se mezclaron en agua (~250 ml) antes de su ingestión. Los participantes en CaHMBBC30 y CaHMBPL recibieron dos suministros de 20 días de HMB y PL. Los participantes debían devolver todos los paquetes usados y no usados al final de cada periodo de 20 días.

Mediciones de sangre

[0052] Se obtuvieron muestras de sangre en reposo antes de cada sesión de pruebas. Todas las muestras de sangre se obtuvieron tras un periodo de equilibrio de 15 minutos. Estas muestras de sangre se obtuvieron de una vena antecubital del brazo usando una aguja desechable de calibre 20 equipada con un soporte para tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las muestras de sangre de cada participante se obtuvieron a la misma hora del día durante cada sesión tras un ayuno nocturno. Todas las muestras de sangre se recogieron en dos tubos Vacutainer®, uno sin agente anticoagulante y el segundo con K₂EDTA. La sangre del primer tubo se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 3.000×g durante 15 min junto con la sangre entera restante del segundo tubo. El plasma y el suero resultantes se colocaron en tubos de microcentrífuga separados de 1,8 ml y se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

Análisis bioquímico

[0053] Las concentraciones en suero de creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) se analizaron usando un ensayo cinético disponible en el mercado (Sekisui Diagnostics, Charlottetown, PE, Canadá; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones plasmáticas de citocinas y quimiocinas incluyeron el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), fractalquina (CX3CL1), interferón-gamma (INF- γ), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) se analizaron a través de ensayo múltiple, usando el panel uno de citocinas/quimiocinas humanas (EMD Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Además, las concentraciones plasmáticas de HMB fueron analizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas y realizadas por Metabolic Technologies Inc. usando métodos previamente descritos. Todas las muestras se descongelaron una vez y fueron analizadas por duplicado por el mismo técnico usando un espectrofotómetro BioTek Eon para las concentraciones de CK y LDH (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.) y MagPix para las concentraciones de citocinas y quimiocinas (EMD Millipore). La variabilidad media intraensayo para todos los ensayos estuvo por debajo del 10 %.

Formación de imágenes por resonancia magnética (MRI)

[0054] Los cambios en la integridad muscular del recto femoral (RF) y el vasto lateral (VL) se evaluaron usando MRI. Debido a consideraciones logísticas (elemento de tiempo), se determinó *a priori* que el objetivo principal del estudio era comparar el efecto de BC30 coadministrado con CaHMB o CaHMB solamente, por lo que solo se evaluaron con MRI los soldados en CaHMBBC30 y CaHMBPL. La integridad muscular se determinó mediante imágenes de tensor de difusión (DTI). DTI es una técnica de MRI sensible para evaluar signos subclínicos de lesión muscular. La evaluación por DTI se basa en las membranas celulares y otras estructuras que limitan la difusión del agua. El movimiento del agua puede evaluarse determinando las tres direcciones ortogonales de difusión del agua, llamados vectores propios, y sus intensidades, llamados valores propios. A partir de los tres valores propios (λ_1 , λ_2 y λ_3), pueden calcularse parámetros tales como anisotropía fraccional (FA) y los coeficientes de difusión aparente (CDA) para evaluar el carácter de la difusión del agua en un vóxel. Se ha demostrado que estas medidas proporcionan información sobre la integridad del músculo esquelético.

[0055] Los datos de MRI se obtuvieron con un generador de imágenes de cuerpo entero de 3,0 Teslas (Ingenia, Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). Durante cada medición, se colocó a los participantes en decúbito supino en el escáner y se les tomaron imágenes usando bobinas de superficie de matriz en fase. Se eligió una posición 20 cm por encima de la rótula como el centro de la imagen y se marcó usando una cápsula de aceite. Todas las exploraciones se planificaron axialmente y consistieron en 40 cortes de 4 mm de anchura para una cobertura pie-cabeza de 160 mm y un campo de visión de 290 × 280 mm (RL×AP). Se realizaron tres adquisiciones de imágenes. Se usó un T1w DIXON como referencia anatómica, un eco de espín turbo T2w para evaluar cualquier daño estructural en el músculo y una secuencia de imágenes con tensor de difusión (DTI) para el seguimiento de las fibras musculares. Los parámetros de secuencia usados se han publicado anteriormente.

[0056] Se usó supresión de grasa (SPAIR: *spectrally selective adiabatic inversion recovery*, recuperación de inversión adiabática espectralmente selectiva) para las exploraciones T2-TSE y DTI. La secuencia DTI fue una secuencia 2D-EPI obtenida en dos paquetes. El valor b fue de 400 s/mm² y se obtuvieron imágenes en 15 direcciones

únicas. El análisis de rastreo de las fibras musculares se calculó usando el software "FiberTrak" de Philips. Se dibujó a mano una ROI (región de interés) para RF y VL en los cortes 15 y 25. A continuación, se permitió al software delinear las fibras musculares mediante un algoritmo que eliminaba las pistas si la FA era menor de 0,1, si el cambio de ángulo era superior a 27° o si la longitud de la fibra era inferior a 10 mm. El mismo investigador realizó todas las evaluaciones.

5

Análisis estadísticos

[0057] Se usaron análisis de covarianza (ANCOVA) para analizar todas las variables dependientes de MRI y de la sangre (marcadores de daño muscular y citocinas). Los valores PRE y POST se usaron como la covariable y la variable dependiente, respectivamente. En caso de una relación significativa, se usaron comparaciones LSD post hoc por pares para examinar las diferencias entre los grupos. Los resultados del ANCOVA también se convirtieron para cambiar desde PRE. Un nivel alfa de $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo para todas las comparaciones. Todos los datos se expresan como media \pm DE salvo que se indique lo contrario. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (IBM Statistics para Windows, versión 23.0); Armonk, NY: IBM Corp).

10

15

RESULTADOS

[0058] De los 26 soldados que participaron en esta prueba, 25 completaron la intervención. El único participante que se retiró del estudio se lesionó durante el entrenamiento. Durante el estudio no se notificaron efectos secundarios asociados a la suplementación. Basándose en el consumo de CaHMB y BC30 (determinado por el número de cápsulas y paquetes de BC-30 devueltos) el cumplimiento de la suplementación fue del $95,0 \pm 3,0$ % entre los dos grupos de CaHMB. Se realizó una medición adicional del cumplimiento del estudio mediante el análisis de las concentraciones plasmáticas de HMB antes y después de la administración de los suplementos a los participantes de ambos grupos. Se observaron aumentos significativos ($p = 0,010$) en las concentraciones plasmáticas de HMB entre las evaluaciones PRE ($3,28 \pm 0,73$ nmol \cdot l $^{-1}$) y POST ($34,1 \pm 43,9$ nmol \cdot l $^{-1}$).

20

25

Datos sanguíneos

[0059] Las concentraciones circulantes de citocinas inflamatorias pueden observarse en la Tabla 1. Además, las comparaciones del cambio de PRE entre grupos se representan en la Figura 1. Una interacción significativa ($F = 6,48$, $p = 0,006$) se observó para los cambios en las concentraciones circulantes de TNF- α . Las concentraciones en plasma de TNF- α en POST fueron significativamente menores para CaHMBBC30 y CaHMBPL que para CTL ($p = 0,019$ y $p = 0,002$, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias entre CaHMBBC30 y CaHMBPL ($p = 0,290$). Una interacción significativa ($F = 4,70$, $p = 0,025$) también se vio entre los grupos para los cambios en las concentraciones en plasma de CX3CL1. Los cambios en las concentraciones de CX3CL1 fueron significativamente menores para CaHMBBC30 y CaHMBPL que para CTL ($p = 0,044$ y $p = 0,011$, respectivamente). No se observaron diferencias en las concentraciones de CX3CL1 ($P = 0,687$) entre CaHMBBC30 y CaHMBPL. Una interacción significativa ($F = 6,93$, $p = 0,006$) se vio para cambios en las concentraciones en plasma de IL-1 β . Las concentraciones de IL-1 β se atenuaron significativamente tanto para CaHMBBC30 como para CaHMBPL en comparación con CTL ($p = 0,005$ y $p = 0,004$, respectivamente). No se observaron diferencias ($p = 0,878$) entre CaHMBBC30 y CaHMBPL. Una interacción significativa ($F = 4,96$, $p = 0,019$) también se encontró para las concentraciones en plasma de IL-2. Las concentraciones circulantes de IL-2 para CaHMBBC30 y CaHMBPL se atenuaron significativamente en POST en comparación con CTL ($p = 0,007$ y $p = 0,029$, respectivamente). No se observó diferencia ($p = 0,584$) entre CaHMBBC30 y CaHMBPL. Una interacción significativa ($F=7,99$, $p = 0,005$) también se observó en los cambios en las concentraciones en plasma de IL-6. Las concentraciones en plasma de IL-6 se atenuaron significativamente en CaHMBBC30 y CaHMBPL en comparación con CTL ($p = 0,002$ y $p = 0,018$, respectivamente). No se observaron diferencias ($p = 0,467$) en la respuesta de IL-6 en POST entre CaHMBBC30 y CaHMBPL. Una interacción significativa ($F=3,72$, $p = 0,041$) también se observó en los cambios en las concentraciones en plasma de IL-10. Se vio una diferencia significativa ($p = 0,013$) entre CaHMBBC30 y CTL. No se observaron otras diferencias significativas. No se observaron interacciones significativas para los cambios en las concentraciones de INF- γ ($F=1,25$, $p = 0,31$), IL-8 ($F = 1,49$, $p = 0,25$) o GM-CSF ($F = 0,71$, $p = 0,50$).

30

35

40

45

50

Tabla 1. El efecto de 40 días de entrenamiento militar intenso sobre las concentraciones de citocinas a través de los grupos de estudio.

		CaHMBBC30 n=9	CaHMBPL n=9	CTL n=8	valor de p
TNF- α	Pre	2,48 \pm 1,95	2,33 \pm 1,31	3,08 \pm 2,30	0,006
	Post	1,67 \pm 2,01	0,81 \pm 0,36	3,86 \pm 2,21	
CX3CL1	Pre	106 \pm 63,2	81,6 \pm 52,3	115 \pm 64,1	0,025
	Post	65,1 \pm 42,9	70,7 \pm 29,9	118 \pm 63,1	
IL-1 β	Pre	0,95 \pm 1,09	0,89 \pm 0,85	1,20 \pm 1,03	0,006
	Post	0,40 \pm 0,41	0,42 \pm 0,37	1,21 \pm 0,81	
IL-2	Pre	1,58 \pm 0,93	1,35 \pm 1,34	2,21 \pm 1,81	0,019
	Post	0,66 \pm 0,34	0,80 \pm 0,87	2,21 \pm 1,82	
IL-6	Pre	1,87 \pm 0,89	7,63 \pm 17,85	2,48 \pm 1,42	0,005
	Post	0,51 \pm 0,24	5,20 \pm 10,68	2,34 \pm 1,60	

55

(continuación)

		CaHMBBC30 n=9	CaHMBPL n=9	CTL n=8	valor de p
IL-10	Pre	6,85±4,85	4,96±4,01	9,92±9,77	0,041
	Post	3,89±2,82	3,62±2,64	9,37±8,79	
IFN-γ	Pre	9,45±6,73	11,3±8,31	18,2±13,5	0,31
	Post	5,81±4,75	8,11±6,75	15,4±11,2	
IL-8	Pre	4,14±6,28	2,58±1,05	2,53±1,82	0,25
	Post	3,84±4,11	2,27±0,92	3,83±2,86	
GM-CSF	Pre	232±323	170±148,9	217±236	0,50
	Post	173±338	75,6±81,6	156±144	

CaHMBBC30 = HMB cálcico y *Bacillus coagulans*; CaHMBPL = HMB cálcico y placebo; CTL = control. Todos los datos se informan como media ± SD. Se usó la prueba ANCOVA para evaluar las diferencias entre grupos.

[0060] El análisis de los marcadores de daño muscular no reveló interacciones significativas entre los grupos para las concentraciones en plasma de LDH ($F = 0,15$, $p = 0,86$) o CK ($F = 0,17$, $p = 0,84$). No se observaron cambios en las concentraciones de LDH de PRE ($537,7 \pm 86,1$ UI·l⁻¹) a POST ($567,5 \pm 87,4$ UI·l⁻¹) en los grupos combinados. Además, no se observaron cambios en las concentraciones de CK de PRE ($225,4 \pm 79,8$ UI·l⁻¹) a POST ($377,6 \pm 230,2$ UI·l⁻¹) en los grupos combinados.

DTI

[0061] Las comparaciones de las evaluaciones de FA y CDA entre CaHMBBC30 y CaHMBPL pueden observarse en la Tabla 2.

Tabla 2: Mediciones de MRI y DTI en β-Hidroxi-β-metilbutirato con y sin probióticos (BC30) en respuesta a un entrenamiento militar intenso

		Pre	Post	Efecto en el tiempo de P	Valor de P
Rector femoral					
Anisotropía fraccional	CaHMBBC30	0,24±0,05	0,20±0,02	0,014	
	CaHMBPL	0,23±0,02	0,19±0,02		
Coeficiente de difusión aparente ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	CaHMBBC30	1,79±0,09	1,72±0,09	0,69	
	CaHMBPL	1,68±0,06	1,77±0,04		
Vasto lateral					
Anisotropía fraccional	CaHMBBC30	0,20±0,03	0,21±0,02	0,23	
	CaHMBPL	0,20±0,01	0,19±0,01		
Coeficiente de difusión aparente ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	CaHMBBC30	1,73±0,05	1,71±0,05	0,86	
	CaHMBPL	1,73±0,06	1,75±0,12		

Todos los datos de la tabla se informan como media±DS. Se usó la prueba de la T para datos emparejados para evaluar los cambios a lo largo del tiempo para ambos grupos. CaHMBBC30 = HMB cálcico y *Bacillus coagulans*; CaHMBPL = HMB cálcico y placebo; CTL = control.

[0062] Además, las comparaciones del cambio de PRE entre grupos se representan en la Figura 2. No se observó diferencia significativa ($F = 0,315$, $p = 0,587$) en FA entre CaHMBBC30 y CaHMBPL en RF, sin embargo, cuando se colapsó a través de los grupos se observó un descenso significativo de PRE a POST. Una diferencia significativa ($F = 7,198$, $p = 0,023$) en CDA se observó entre los grupos en RF. Los participantes en el estudio CaHMBBC30 experimentaron una disminución en CDA, mientras que los participantes en CaHMBPL experimentaron un aumento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la VL para ninguno de FA ($F = 2,95$, $p = 0,117$) o CDA ($F = 1,886$, $p = 0,200$).

[0063] Los resultados de este estudio indican que 40 días de suplementación con HMB con y sin *Bacillus coagulans* pueden atenuar los marcadores de citocinas inflamatorias durante el entrenamiento militar de alta intensidad. Esta combinación pareció atenuar la respuesta de IL-10 en comparación con el control. Además, la combinación de CaHMB y BC30 proporcionó un beneficio significativo en comparación con CaHMB solo en el mantenimiento de la integridad muscular, como indica la disminución del coeficiente de difusión aparente (CDA) del recto femoral (RF).

[0064] HMB en plasma para CaHMBPC30, CaHMBPL y CTL fueron $50,6 \pm 15,6$ nmol·l⁻¹, $15,6 \pm 28,0$ nmol·l⁻¹ y $3,3 \pm 0,9$ nmol·l⁻¹, respectivamente. Las mayores concentraciones de HMB observadas para el CaHMBBC30 indican que el BC30 tiene una capacidad de absorción mejorada.

[0065] Las mediciones de integridad muscular se realizaron usando DTI, que se considera un método sensible para evaluar los signos subclínicos de lesión muscular. DTI mide la difusión de las moléculas de agua y la dirección de su movimiento en una microestructura muscular tridimensional. En los tejidos sanos la integridad de la estructura

constituye una barrera a la difusión. La anisotropía fraccional (AF) representa el aumento de la difusividad en el tejido tras un traumatismo, mientras que el coeficiente de difusión aparente (CDA) refleja el grado de difusión en cada dirección del músculo por la longitud de su eje. Una disminución en FA y un aumento en CDA, representan una alteración de la integridad del músculo que indica una mayor difusión. Anteriormente, los presentes inventores informaron disminuciones significativas de la FA tanto en RF como en semitendinoso solo para el grupo placebo, y un probable aumento de CDA del VL en el grupo suplementado, lo que indica que el HMB suministrado en su forma de ácido libre puede mejorar la integridad muscular durante el entrenamiento militar intenso. Sin embargo, los datos demuestran que la adición de BC30 al CaHMB proporcionó un efecto sinérgico para mantener la integridad muscular que dio lugar a un mayor grado de protección muscular que el ofrecido por el CaHMB por sí solo.

[0066] La descripción y los dibujos anteriores comprenden realizaciones ilustrativas de la presente invención. Las realizaciones anteriores y los métodos descritos en el presente documento pueden variar basándose en la habilidad, la experiencia y la preferencia de aquellos expertos en la materia. La mera enumeración de las etapas del método en un determinado orden no constituye ninguna limitación del orden de las etapas del método.

Bibliografía

[0067]

1. Gonzalez AM, Fragala MS, Jajtner AR, *et al.* Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate free acid and cold water immersion on expression of CR3 and MIP-1beta following resistance exercise. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2014; 306: R483-9.
2. Gonzalez AM, Stout JR, Jajtner AR, *et al.* Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate free acid and cold water immersion on post-exercise markers of muscle damage. *Amino acids.* 2014; 46: 1501-11.
3. Kraemer WJ, Hatfield DL, Volek JS, *et al.* Effects of amino acids supplement on physiological adaptations to resistance training. *Medicine and science in sports and exercise.* 2009; 41: 1111-21.
4. Townsend JR, Fragala MS, Jajtner AR, *et al.* beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB)-free acid attenuates circulating TNF-alpha and TNFR1 expression postresistance exercise. *Journal of applied physiology.* 2013; 115: 1173-82.
5. van Someren KA, Edwards AJ, Howatson G. Supplementation with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and alpha-ketoisocaproic acid (KIC) reduces signs and symptoms of exercise-induced muscle damage in man. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism.* 2005; 15: 413-24.
6. Alway SE, Pereira SL, Edens NK, *et al.* beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) enhances the proliferation of satellite cells in fast muscles of aged rats during recovery from disuse atrophy. *Experimental gerontology.* 2013; 48: 973-84.
7. Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, *et al.* Effects of leucine and its metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *The Journal of physiology.* 2013; 591: 2911-23.
8. Giron MD, Vilchez JD, Shreeram S, *et al.* beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. *PloS one.* 2015; 10: e0117520.
9. Kimura K, Cheng XW, Inoue A, *et al.* beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mammalian target of rapamycin and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates tumor necrosis factor alpha/interferon gamma-induced MuRF-1 expression in C2C12 cells. *Nutrition research.* 2014; 34: 368-74.
10. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2008; 295: E1409-16.
11. Eley HL, Russell ST, Baxter JH, *et al.* Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2007; 293: E923-31.
12. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2008; 295: E1417-26.
13. Pimentel GD, Rosa JC, Lira FS, *et al.* beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway. *Nutrition & metabolism.* 2011; 8: 11.
14. Lieberman HR, Bathalon GP, Falco CM, *et al.* Severe decrements in cognition function and mood induced by sleep loss, heat, dehydration, and undernutrition during simulated combat. *Biological psychiatry.* 2005; 57: 422-9.
15. Nindl BC, Leone CD, Tharion WJ, *et al.* Physical performance responses during 72 h of military operational stress. *Medicine and science in sports and exercise.* 2002; 34: 1814-22.
16. McClung JP, Martini S, Murphy NE, *et al.* Effects of a 7-day military training exercise on inflammatory biomarkers, serum hepcidin, and iron status. *Nutrition journal.* 2013; 12: 141.
17. Nindl BC, Scofield DE, Strohbach CA, *et al.* IGF-I, IGF-BPs, and inflammatory cytokine responses during gender-integrated Israeli Army basic combat training. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association.* 2012; 26 Supl 2: S73-81.
18. Hoffman JR, Gepner Y, Stout JR, *et al.* beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate attenuates cytokine response during sustained military training. *Nutrition research.* 2016; 36: 553-63.
19. Kraemer WJ, Hatfield DL, Comstock BA, *et al.* Influence of HMB supplementation and resistance training on cytokine responses to resistance exercise. *Journal of the American College of Nutrition.* 2014; 33: 247-55.

20. Fuller JC, Sharp RL, Angus HF, *et al.* Comparison of availability and plasma clearance rates of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate delivery in the free acid and calcium salt forms. *The British journal of nutrition.* 2015; 114: 1403-9.
- 5 21. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2010; 7: 503-14.
22. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2008; 46 Supl 2: S58-61; análisis S144-51.
23. Wang Y, Gu Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in veterinary science.* 2010; 89: 163-7.
- 10 24. Nissen S, Van Koeveering M, Webb D. Analysis of beta-hydroxy-beta-methyl butyrate in plasma by gas chromatography and mass spectrometry. *Analytical biochemistry.* 1990; 188: 17-9.
25. Froeling M, Oudeman J, Strijkers GJ, *et al.* Muscle changes detected with diffusion-tensor imaging after long-distance running. *Radiology.* 2015; 274: 548-62.
26. Deux JF, Malzy P, Paragios N, *et al.* Assessment of calf muscle contraction by diffusion tensor imaging. *European radiology.* 2008; 18: 2303-10.
- 15 27. Damon BM, Ding Z, Anderson AW, *et al.* Validation of diffusion tensor MRI-based muscle fiber tracking. *Magnetic resonance in medicine.* 2002; 48: 97-104.
28. Vickers AJ. The use of percentage change from baseline as an outcome in a controlled trial is statistically inefficient: a simulation study. *BMC medical research methodology.* 2001; 1: 6.
- 20 29. Fuller JC, Jr., Sharp RL, Angus HF, *et al.* Free acid gel form of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) improves HMB clearance from plasma in human subjects compared with the calcium HMB salt. *The British journal of nutrition.* 2011; 105: 367-72.
30. Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *Journal of cellular biochemistry.* 2003; 88: 332-9.
- 25 31. Honda H, Gibson GR, Farmer S, *et al.* Use of a continuous culture fermentation system to investigate the effect of GanedenBC30 (*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086) supplementation on pathogen survival in the human gut microbiota. *Anaerobe.* 2011; 17: 36-42.
32. Portal S, Zadik Z, Rabinowitz J, *et al.* The effect of HMB supplementation on body composition, fitness, hormonal and inflammatory mediators in elite adolescent volleyball players: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study. *European journal of applied physiology.* 2011; 111: 2261-9.
- 30 33. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review.* 2006; 12: 6-33.
34. Welc SS, Clanton TL. The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Experimental physiology.* 2013; 98: 359-71.
- 35 35. Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, *et al.* Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *The Journal of physiology.* 2003; 549: 607-12.
36. Lundeland B, Gundersen Y, Opstad PK, *et al.* One week of multifactorial high-stress military ranger training affects Gram-negative signalling. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 2012; 72: 547-54.
37. Henning PC, Scofield DE, Spiering BA, *et al.* Recovery of endocrine and inflammatory mediators following an extended energy deficit. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2014; 99: 956-64.
- 40 38. Peterson JM, Feeback KD, Baas JH, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *Journal of applied physiology.* 2006; 101: 1394-9.
39. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Kotela A, *et al.* The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: occurrence and potential role in osteoarthritis. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis.* 2014; 62: 395-403.
- 45 40. van Zuiden M, Kavelaars A, Amarouchi K, *et al.* IL-1beta reactivity and the development of severe fatigue after military deployment: a longitudinal study. *Journal of neuroinflammation.* 2012; 9: 205.
41. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, *et al.* Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics. Exercise immunology review.* 2002; 8: 6-48.
- 50 42. Nyangale EP, Farmer S, Cash HA, *et al.* *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Modulates *Faecalibacterium prausnitzii* in Older Men and Women. *The Journal of nutrition.* 2015; 145: 1446-52.
43. Reikeras O. Immune depression in musculoskeletal trauma. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society [et al].* 2010; 59: 409-14.
44. Lazarus JJ, Kay MA, McCarter AL, *et al.* Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages. *Infection and immunity.* 2008; 76: 1153-62.
- 55 45. Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, *et al.* Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise immunology review.* 2015; 21: 8-25.
46. Tidball JG, Vialta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2010; 298: R1173-87.
- 60 47. Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, *et al.* Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise immunology review.* 2012; 18: 42-97.
48. Kanda K, Sugama K, Hayashida H, *et al.* Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. *Exercise immunology review.* 2013; 19: 72-85.
- 65 49. Cermak NM, Noseworthy MD, Bourgeois JM, *et al.* Diffusion tensor MRI to assess skeletal muscle disruption following eccentric exercise. *Muscle & nerve.* 2012; 46: 42-50.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método no terapéutico para mantener la integridad muscular en un animal que lo necesite, comprendiendo el método administrar una composición que comprende de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g de ácido β -hidroxi- β -metilbutírico (HMB) y al menos un probiótico al animal, en donde el animal es un ser humano o un mamífero no humano, en donde el probiótico es *Bacillus coagulans*.
- 10 2. El método no terapéutico de la reivindicación 1, en donde dicho HMB es una sal cálcica o en donde el HMB está en la forma de ácido libre.
- 15 3. Uso no terapéutico de una composición para su uso en el mantenimiento de la integridad muscular en un animal que lo necesite, comprendiendo la composición de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g de ácido β -hidroxi- β -metilbutírico (HMB) y al menos un probiótico, en donde la composición es para administrarse al animal, en donde el animal es un ser humano o un mamífero no humano, en donde el probiótico es *Bacillus coagulans*.
4. El uso no terapéutico de la reivindicación 3, en donde dicho HMB es una sal cálcica o en donde el HMB está en la forma de ácido libre.

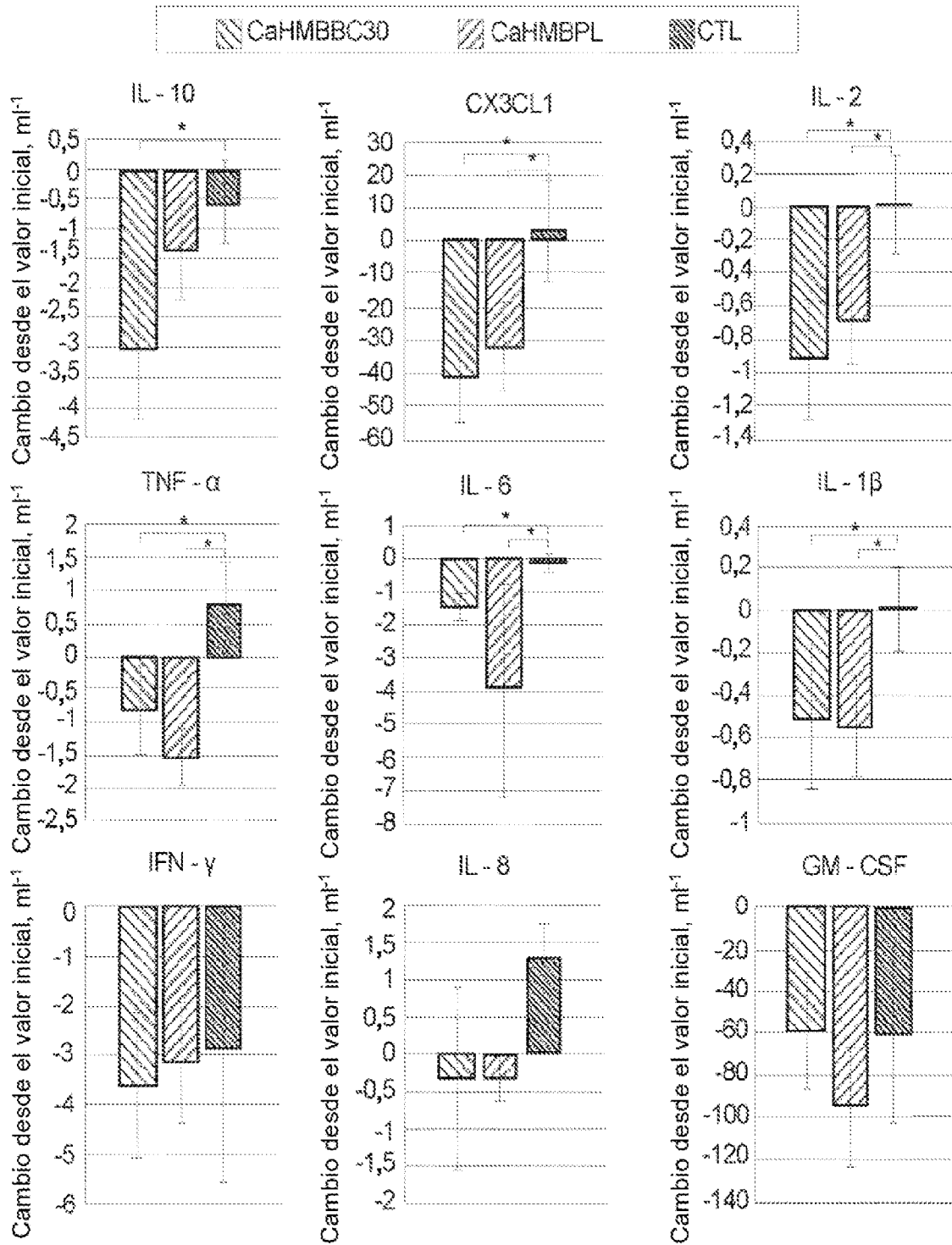


Figura 1: Cambios post-pre en la respuesta de citocinas inflamatorias a entrenamiento militar intenso después de 40 días de suplementación. CaHMBBC30 = HMB cálcico y *Bacillus coagulans*; CaHMBPL = HMB cálcico y placebo; CTL = control; * = $p < 0,05$. Los resultados se informan como media \pm SD

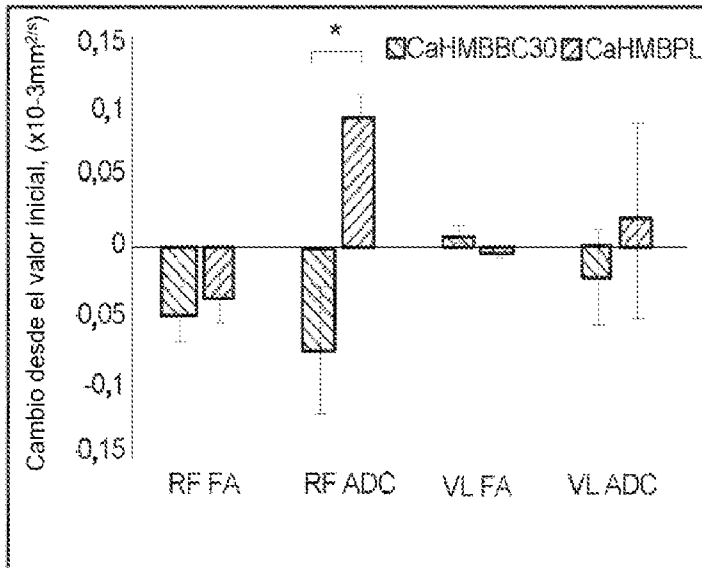


Figura 2: Cambios post-pre en mediciones de DTI después de 40 días de suplementación y entrenamiento militar intenso. DTI = Imágenes por tensor de difusión; CaHMBBCC30 = HMB cálcico y *Bacillus coagulans*; CaHMBPL = HMB cálcico. Los resultados se informan como media ± SD.