(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 835 306**

(51) Int. CI.:

A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
A61K 36/8905 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2015 PCT/US2015/065441**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16178716**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015 E 15891398 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 3291805**

(54) Título: **Composición que comprende escirpusina a y escirpusina b y potencial contra la obesidad de la misma**

(30) Prioridad:

06.05.2015 US 201514705111

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2021

(73) Titular/es:

SAMI LABS LIMITED (100.0%)
19/1& 19/2 1 Main, II Phase Peenya Industrial Area
Bangalore 560 058, IN

(72) Inventor/es:

MAJEED, MUHAMMED;
NAGABHUSHANAM, KALYANAM;
KALMAN, DOUGLAS;
BHAT, BEENA;
VAIDYANATHAN, PRITI;
BANI, SARANG;
PANDEY, ANJALI y
KARRI, SURESH

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Composición que comprende escirpusina a y escirpusina b y potencial contra la obesidad de la misma

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

La presente invención es una solicitud PCT de la solicitud de EE.UU 14705111 presentada el 6 de mayo de 2015 que es una solicitud de patente de continuación en parte de E13944634 presentada el 17 de julio de 2013 que a su vez es una presentación no provisional de solicitud de patente provisional 61672849 presentada el 18 de julio de 2012.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención en general se refiere a composiciones para la inhibición de la adipogénesis. Más específicamente, la presente invención divulga una composición que comprende la escirpusina A y la escirpusina B y el potencial contra la adipogénesis/contra la obesidad de las mismas.

Descripción de la técnica anterior

La escirpusina A como dímero de hidroxiestilbeno de la uva de vinificación de Xinjiang ha sido previamente reportada por Kong Q y otros en J Sci Food Agric. 15 de Abril de 2010; 90(5):823-8. La escirpusina A se ha destacado por su actividad inhibidora de la agregación del péptido beta-amiloide (Riviere C y otros (2010)), inhibición del oxígeno singlete y actividad protectora del ADN (Kong Q y otros (2010)) y actividad inhibidora de la beta-secretasa (Jeon SY y otros (2007)).

La escirpusina B es un dímero vasodilatador de piceatanol bien establecido y se obtiene en grandes cantidades del maracuyá (Sano S y otros, "Identification of the strong vaso- relaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (Passiflora edulis) seeds, J Agric Food Chern. 8 de Junio de 2011; 59 (11): 6209-13La escirpusina B también se destaca por su leve actividad GSH (Maruki-Uchida H y otros (2013)) y propiedades contra el VIH (Yang GX y otros (2005)).

Se ha informado previamente que el extracto en hexano de extractos de rizoma de*Cyperus rotundus* exhibe propiedades contra la obesidad. (La administración de extracto de rizomas de Cyperus rotundus previene el aumento de peso en ratas obesas Zucker. Lemaure y otros 2007. Phytother Res. 21: 724 -730.). La fracción en hexano se ha caracterizado por contener α- Cipernona, Rotundeno, β-selineno, Calameneno, Cipereno, d-cadineno, Ciperotundona, Cadaleno, Patchoulenona, Nootcateno, Sugeonol, g-calacoreno, cobusona, Ciperol, Isocobusona y Epi-a-selinenoYadav y otros International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2010; 2 (1): 20-22). Pero la presente invención divulga la actividad contra la obesidad en la fracción de acetato de etilo de *Cyperus rotundus.* Esta fracción de acetato de etilo no contiene ninguno de los muchos constituyentes de la fracción en hexano. La presente fracción de acetato de etilo contiene compuestos derivados de estilbenoides.

El documento de EE.UU 2014/0024706 A1 divulga una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B y su potencial contra la obesidad. El documento también divulga procedimientos para inhibir la adipogénesis usando una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B y procedimientos para manejar terapéuticamente la obesidad en mamíferos usando una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B. El documento divulga además un procedimiento para obtener composiciones que comprenden A. escirpusina A y escirpusina B y B. piceatanol y sus dímeros escirpusina A y escirpusina B mediante el fraccionamiento guiado por bioactividad de los rizomas de *Cyperus rotundus.* En el procedimiento el polvo de*Cyperus rotundus* se extrajo con hexano para obtener una fracción soluble en hexano y material gastado. El material gastado se extrajo adicionalmente con metanol para obtener una fracción activa soluble en metanol y material gastado. La fracción soluble en metanol se solubilizó en metanol acuoso y se repartió sucesivamente con cloroformo ($CHCl_3$), acetato de etilo (EtOAc) y metanol para obtener la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol respectivamente. La capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol se sometieron a un fraccionamiento guiado por bioactividad adicional, en el que el parámetro de bioactividad fue la capacidad de la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol para inhibir la adipogénesis en adipocitos de ratón 3T3-L1 (adipocitos de mamíferos).

Por tanto, el objetivo principal de la presente memoria descriptiva es divulgar una composición alternativa que comprende escirpusina A y escirpusina B y su potencial contra la adipogénesis/contra la obesidad.

Es un objetivo de la presente invención divulgar una composición alternativa que comprende escirpusina A y escirpusina B para su uso en un procedimiento de reducción de la obesidad en mamíferos.

Otro objetivo de la presente invención es divulgar una composición alternativa que comprende escirpusina A y escirpusina B para un uso alternativo.

La presente invención cumple los objetivos mencionados anteriormente y proporciona otras ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. La memoria descriptiva divulga composiciones que comprenden escirpusina A y escirpusina B y su potencial contra la adipogénesis/contra la obesidad. La memoria descriptiva también divulga un procedimiento para manejar la obesidad en mamíferos usando una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B. La presente memoria descriptiva divulga además un procedimiento para obtener composiciones que comprenden A. escirpusina A y escirpusina B y B. piceatanol y sus dímeros escirpusina A y escirpusina. B mediante el fraccionamiento guiado por bioactividad de los rizomas de *Cyperus rotundus.* Otras características y ventajas de la presente memoria descriptiva resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada, tomada junto con las imágenes adjuntas, que ilustran, a manera de ejemplo, el principio de la invención.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo que divulga las etapas para extraer principios activos de los rizomas de *Cyperus rotundus.*

La Figura 2, 2a, 2b y la Figura 3, 3a, 3b y 3c muestran el análisis por LC-MS de las subfracciones III y IV, respectivamente, de la capa en acetato de etilo enriquecida naturalmente con dímeros de piceatanol, escirpusina A y escirpusina B.

La Figura 4 y 5 muestran los datos del HRMS indicando que los valores de [M+H] obtenidos en el mismo se corresponden muy bien con la estructura del dímero y los datos reportados (Sano y otros, 2011) sobre el mismo.

La Figura 6 muestra la reducción gráfica del peso corporal en seres humanos obesos a los que se les administró la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus*estandarizados al 5 % de estilbenos totales. La Figura 6a muestra la reducción gráfica del índice de masa corporal en seres humanos obesos a los que se les administró la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizados al 5 % del total de estilbenos. La Figura 6b muestra la reducción gráfica de la circunferencia de la cintura en seres humanos obesos a los que se les administró la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizados al 5 % de los estilbenos totales.

La Figura 7 muestra las fotografías de la reducción de la circunferencia de la cintura en seres humanos obesos (hombres) a los que se les administró la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de*Cyperus rotundus* estandarizados al 5 % de los estilbenos totales.

Las Figuras 8a, 8b y 8c muestran las fotografías de la reducción de la circunferencia de la cintura en seres humanos obesos (mujeres) a los que se les administró la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizados al 5 % de los estilbenos totales.

Las Figuras 9a, 9b, 9c, 9d y 9e muestran los cambios en los lípidos sistémicos en seres humanos obesos a los que se les administró la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizados al 5 % de los estilbenos totales.

Descripción de los aspectos más preferidos

En el aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva se refiere a una composición anti-adipogénica/contra la obesidad que comprende escirpusina A y escirpusina B representadas por STR # 1 y STR # 2 respectivamente.

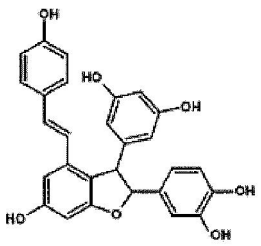
En otro aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para inhibir la adipogénesis en células de mamíferos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de poner en contacto células adipogénicas de mamíferos con una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B representadas por STR # 1 y STR # 2 respectivamente.

En otro aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva se refiere al procedimiento de inhibir terapéuticamente la obesidad provocada por adipogénesis en mamíferos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de suplementación dietética de una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B representada por STR # 1 y STR # 2 respectivamente para un mamífero que necesita dicha inhibición terapéutica.

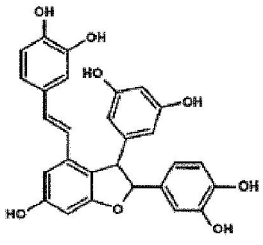
En otro aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva se refiere al uso de una composición que comprende escirpusina A y escirpusina B representada por STR # 1 y STR # 2 para inhibir la adipogénesis en células de mamífero.

En un aspecto alternativo, la presente memoria descriptiva también se refiere a un procedimiento para el fraccionamiento guiado por bioactividad de los rizomas de *Cyperus rotundus* para obtener composiciones anti-adipogénicas/contra la obesidad que comprenden A. escirpusina A y escirpusina B representadas por STR # 1 y STR # 2 y B. piceatanol y sus dímeros escirpusina A y escirpusina B representadas por STR # 1 y STR # 2 respectivamente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

1) Secar los rizomas de *Cyperus* rotundus y pulverizar los mismos para formar un polvo grueso;
2) Extraer el polvo del paso 1 con 3 volúmenes de hexano seguido de calentamiento, reflujo durante
3) 3 horas y filtrado para obtener la fracción soluble en hexano y el material gastado;
4) Extraer el material gastado del paso 2 con 3 volúmenes de metanol seguido de calentamiento, reflujo durante 3 horas y filtrado para obtener la fracción activa soluble en metanol y el material gastado;
5) Solubilizar la fracción activa soluble en metanol del paso 3 en metanol acuoso y particionar sucesivamente con cloroformo ($CHCl_3$), acetato de etilo (EtOAc) y metanol para obtener la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol respectivamente;
6) Someter la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol a un fraccionamiento guiado por bioactividad adicional, en el que el parámetro de bioactividad es la capacidad de la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol para inhibir la adipogénesis en adipocitos de ratón 3T3-L1 (adipocitos de mamíferos);
7) Calcular los valores de IC_{50} (µg/ml) para la inhibición de la adipogénesis ejemplificados por la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol (0, 9,39 y 66,42 respectivamente);
8) Fraccionar la capa en acetato de etilo usando el fraccionamiento en columna para identificar el biomarcador de bioactividad (inhibición de la adipogénesis), dicho fraccionamiento incluye la etapa en donde las fracciones se eluyen con polaridad creciente de metanol: cloroformo para producir subfracciones de la capa en acetato de etilo (fracción);
9) Someter las subfracciones del paso 7 para análisis de bioactividad (contra la adipogénesis);
10) Identificar las subfracciones más bioactivas del paso 8 y someter las mismas a análisis por LC-MS para identificar los principios bioactivos de escirpusina A y escirpusina B; y
11) Someter las subfracciones del paso 7 a través de HPLC preparativa para obtener el dímero purificado y someter las mismas a espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS), cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) para confirmar la masa y las estructuras de los principios bioactivos de la escirpusina.



(STR#1)



(STR#2)

Los presentes inventores investigaron el extracto en hexano referido en la epata 2 anterior y encontraron que no estaban presentes la escirpusina A y la escirpusina B. Por tanto, el extracto en hexano en la epata 1 es constitucionalmente diferente de la fracción de acetato de etilo detallada en la epata 7. Así, el extracto de acetato de etilo de *Cyperus rotundus* es bastante diferente del extracto de hexano que fue objetivo de investigación en Lemaure y otros 2007. Phytother Res. 21: 724-730.

Las siguientes secciones de esta memoria descriptiva consisten en ejemplos ilustrativos de los aspectos más preferidos de la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 1: Fraccionamiento guiado por bioactividad de los rizomas de *Cyperus rotundus* (Figura 1)

Procedimiento:

Rizomas secos de *Cyperus rotundus* se pulverizaron para formar un polvo grueso. Después, el polvo pulverizado se extrajo con 3 volúmenes de hexano seguido de calentamiento, reflujo durante 3 horas y filtrado para obtener la fracción soluble en hexano y el material gastado. El material gastado se extrae adicionalmente con 3 volúmenes de

metanol seguido de calentamiento, reflujo durante 3 horas y filtrado para obtener la fracción activa soluble en metanol y el material gastado. La fracción soluble en metanol se solubiliza en metanol acuoso y se particiona sucesivamente con cloroformo ($CHCl_3$), acetato de etilo (EtOAc) y metanol para obtener la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol respectivamente. La capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa acuosa en metanol se someten a un fraccionamiento guiado por bioactividad adicional, en el que el parámetro de bioactividad fue la capacidad de la capa en cloroformo, la capa en acetato de etilo y la capa en metanol acuoso para inhibir la adipogénesis en adipocitos de ratón 3T3-L1 (adipocitos de mamíferos). Los pasos de la técnica de tinción Oil Red O adaptada de Salazar Olivo y otros (1995), Wu Z y otros (1998), Fu M y otros (2005) para estudiar el grado de inhibición de la adipogénesis se explica en el Ejemplo 1A a continuación en la presente memoria. Los resultados se mencionan en la Tabla A.

Ejemplo 1A: La diferenciación terminal de los adipocitos se acompaña de la acumulación de grandes cantidades de lípidos en grandes vesículas citoplasmáticas. Un ensayo común para medir la diferenciación de adipocitos en cultivos celulares es con el tinte Oil Red-O (ORO). El ORO es un tinte rojo brillante soluble en lípidos que es un indicador confiable de la diferenciación de adipocitos.

Principio: El Oil Red O (Solvente Rojo 27, Sudan Rojo 5B, CI 26125 y C26H24N40) es un tinte diazo lisocromo (tinte soluble en grasa) que se usa para teñir triglicéridos y lípidos neutros en secciones congeladas y algunas lipoproteínas en secciones de parafina. Tiene la apariencia de un polvo rojo con la máxima absorción a 518(359) nm. El Oil Red O es uno de los tintes usados para la tinción de Sudán. Tintes similares incluyen Sudan III, Sudan IV y Sudan Black B. La tinción debe realizarse en muestras frescas, ya que la fijación con alcohol elimina los lípidos. El Oil Red O reemplazó en gran medida a Sudan III y Sudan IV, ya que proporciona un color rojo mucho más profundo y, por lo tanto, las manchas son mucho más fáciles de ver. El Oil red O es un tinte soluble en aceite. Los colorantes solubles en aceite exhiben una mayor solubilidad del colorante en sustancias lipoides en los tejidos/células, que en los solventes de colorantes hidroalcohólicos habituales. Por lo tanto, manchará profundamente las células.

Se siembran células 3T3-L1, aproximadamente 60 X 10^4 células durante 48-72 horas para obtener una confluencia de 70-80 %. Después de 48 h, se añaden 200 µl de AIM (medio de inducción de adipogénesis) recién preparado. 72 horas después, se añaden a los pocillos 200 µl de APM (medio de progresión de la adipogénesis) con los compuestos de prueba en concentraciones diferentes. Las células se incuban durante 48 horas en una atmósfera humidificada (37 °C) de CO_2 al 5 % y 95 % de aire. El sobrenadante se recoge y se almacena para la estimación de leptina, adiponectina, IL-6 y TNF-alfa. Las células se fijan añadiendo 100 µl de formalina al 10 % y se realiza la tinción ORO. La DO se lee a 492 nm en un lector de microplacas.

Los resultados se expresan como valores IC_{50} mediante el uso del software Graph Pad Prism. El porcentaje de inhibición de la adipogénesis se calcula como sigue.

$$\% \text{ de Inhibición} = C\text{-}T/T * 100$$

Donde C es la absorbancia del Oil red O en células diferenciadas/indiferenciadas
T es la absorbancia de Oil Red O en células diferenciadas/indiferenciadas tratadas con muestra.

Tabla A

Muestra	Porcentaje de inhibición a concentración variable					IC_{50} µg/mL
	3,12 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	
Capa de hexano	1,29 %	12,09 %	18,97 %	26,25 %	40,13 %	52,22
Capa de metanol	-NIL-	5,58 %	13,7 %	25,75 %	41,74 %	66,42
Capa de $CHCl_3$	-NIL-	8,91 %	9,58 %	24,21 %	26,66 %	-
capa (EtOAc)	18,98 %	26,77 %	53,55 %	73,63 %	88,41 %	9,39

La capa en acetato de etilo ilustró la mejor bioactividad en términos de inhibición de la adipogénesis con un valor de IC_{50} (µg/ml) de 9,39. A continuación, esta fracción se sometió a fraccionamiento en columna para identificar el biomarcador de bioactividad (inhibición de la adipogénesis). El fraccionamiento en columna implicó la etapa de eluir subfracciones de la capa en acetato de etilo con polaridad creciente de la mezcla de metanol: cloroformo. Las subfracciones de la capa en acetato de etilo se etiquetan como I, II, III y IV y se someten a evaluación de bioactividad (contra la adipogénesis). Las etapas esenciales de la evaluación de la actividad anti-adipogénica implican el procedimiento descrito en la presente memoria antes del Ejemplo 1A. Los resultados se resumen en la presente memoria a continuación en la Tabla B.

Tabla B

Muestra	IC_{50} (µg/mL)
Sub fracción I (constituyentes no polares)	23,21
Sub fracción II (enriquecida naturalmente en piceatanol	41,05
junto con los dímeros escirpusina A y escirpusina B)	
Sub fracción III (enriquecida naturalmente en dímeros de piceatanol escirpusina A y escirpusina B)	13,31
Sub fracción IV (enriquecida naturalmente en dímeros de piceatanol escirpusina A y escirpusina B)	18,75

Las subfracciones III y IV se sometieron luego a LC-MS con ambas fracciones enriquecidas en dímeros de piceatanol escirpusina A y escirpusina B (La Figuras 2 y 3). El análisis por LC-MS/MS se realizó en un espectrómetro Thermo Electronics Finnigan LCQ Advantage MAX usando una columna RP C18 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µ). El sistema constaba de un detector PDA de topógrafo Thermo-Finnigan, una bomba LC y un muestreador automático. La fase móvil incluyó una ejecución en gradiente durante 35 minutos con el solvente (A) ácido acético al 0,1 % en agua y el solvente (B) acetonitrilo. La concentración del solvente B aumentó de 5 % durante 0- 5 minutos, de 5 - 60 % durante 5-20 minutos, de 60 -100 % durante 20-25 minutos, de 100 -5 % durante 25-27 minutos y se mantuvo constante a 5 % durante 27-35 minutos. La fase estacionaria incluyó Thermo BDS hipersil, columna C18 (Dimensión- 250 mm x 4,6 mm); Tasa de flujo: 1 ml/min; Rango de detección: 260 nm.

Parámetros de ionización: Modo positivo APCI, voltaje de fuente - 4,50 kV, temperatura capilar - 225 grados, voltaje capilar - 43.00 V.

Interpretación de datos: Se informa que la masa de escirpusina A es 470,13. La masa [M+H] observada a 18,77 min en modo de ionización positiva usando el protocolo anterior es 471,08. Se informa que la masa de escirpusina B es 486. La masa [M+H] observada a los 17,94 min en modo de ionización positiva es 487,05.

El primer nivel de confirmación de la presencia de dímeros de piceatanol en el extracto de Cyperus fue en base a esta información preliminar sobre la masa. La escirpusina A se confirmó directamente mediante comparación directa con una muestra auténtica de escirpusina A.

Las subfracciones se sometieron luego a HPLC preparativa para obtener el dímero escirpusina B purificado que luego se estudió usando las herramientas analíticas de espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS), cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) para ser confirmados como escirpusina B. Los datos del HRMS indicaron [M+H] = 487,138 que coincidía muy bien con la estructura del dímero y reportó datos (Sano y otros, 2011) sobre el mismo (La Figuras 4 y 5) y la estructura de la escirpusina B también se confirmó usando una sonda criogénica RMN (La Figura 6). El compuesto se identificó después de compararlo con los datos disponibles en la literatura (Sano y otros, 2011). Datos de RMN (CD30D): δ: 56,73; 93,50; 95,39; 100,79; 102,93; 105,87 X 2; 112,21; 112,63; 114,83; 114,91; 117,03; 118,42; 118,61; 122,17; 129,46; 129,53; 133,53; 135,60; 144,90; 145,01; 145,09; 145,21; 146,27; 158,36; 158,56 x 2; 161,46. El espectro de RMN APT (Prueba de Protones Adjunta) obtenido a 500 MHz confirmó aún más la estructura de escirpusina B. También se aisló una muestra auténtica de escirpusina B a partir de frutos de la pasión aislados por Sano y otros, 2011 y se comparó directamente con la escirpusina B aislada por nosotros de *Cyperus rotundus* como se describió anteriormente y la identidad de los tiempos de retención de HPLC, los datos de espectrometría de masas y los datos de RMN corroboraron la presencia de escirpusina B en *Cyperus rotundus* de la forma más convincente.

Ejemplo 2

Evaluación de la eficacia del efecto contra la obesidad de extractos de CYPRO-AF (fracción activa de acetato de etilo) y CYPRO-D1 (sub fracción de acetato de etilo enriquecida naturalmente en dímeros de piceatanol, escirpusina A y escirpusina B) en ratones.

Objetivo de la prueba: El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de los extractos Cypro-AF y Cypro-D1 para el efecto contra la obesidad en ratones C57.

Detalles del sistema de prueba:

Especies animales	Ratones
Cepa	C57
Intervalo de peso corporal	Machos: 22-27 g; Hembras: 20-24 g
Edad al momento del tratamiento	8-10 semanas
Número de grupos	6 grupos (un control, un control de dieta alta en grasas y cuatro grupos de tratamiento)
Número de animales / grupo	Cada grupo contenía 10 animales (5 machos + 5 hembras). Las hembras usadas fueron nulíparas y no gestantes.
Número total de animales	60
Identificación	Tarjetas de jaula y procedimiento de muescas de orejas de animales individuales.

Detalles del rendimiento de la prueba

Mantenimiento

Condiciones	Los animales se alojaron en condiciones estándar de laboratorio, con aire acondicionado y suministro de aire fresco adecuado (cambios de aire 12-15 por hora), temperatura ambiente 22 ± 3 °C, humedad relativa 30-70 %, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se registraron una vez al día.
Alojamiento	Los animales individuales se alojaron en una jaula de polipropileno estándar (tamaño: L 290 x B 140 x H 140 mm) con rejilla superior de malla de acero inoxidable que tiene instalaciones para contener alimento en forma de gránulos y agua potable en una botella de agua equipada con un tubo de sorbete de acero inoxidable. Se proporcionó cáscara de arroz esterilizada limpia como material para la cama.
Aclimatación	Los animales se aclimataron durante 7 días a las condiciones de laboratorio y se observaron diariamente los signos clínicos.
Dieta	Los animales se alimentaron ad libitum con alimento animal de laboratorio de la marca "Scientist's Choice" de VRK fabricado por VRK Nutritional Solutions, Bibwewadi-Kondhwa Road, Pune, durante todo el período de aclimatación.
	La dieta D12450B (con 10 kcal% de grasa) y la dieta alta en grasas D12492 (con 60 kcal% de grasa) fabricada por Research Diet Inc, EE. UU., obtenida de Indus Marketing, Hyderabad, Andhra Pradesh, INDIA, se usó para la inducción de la obesidad y el estudio principal.
Agua	Se proporcionó agua limpia para beber ad libitum durante todo el período de aclimatación e inducción de la obesidad. El agua de pozo profundo que pasó a través de la unidad de ósmosis inversa se proporcionó en botellas de agua de plástico con tubos de acero inoxidable.

Agrupamiento: El agrupamiento de los animales se realizó el último día de aclimatación mediante el procedimiento de estratificación y aleatorización del peso corporal. El agrupamiento de los animales se realizó de manera que la variación del peso corporal de los animales usados no supere ± 20 % del peso corporal medio de cada grupo.

Diseño del Estudio: Los animales se dividieron en 6 grupos, a saber, los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 que consiste en 10 animales (5 machos y 5 hembras) cada uno. Los detalles del grupo, las dosis y el número/sexo de los animales por grupo se presentan en la siguiente tabla:

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso corporal)	Número de animales		Números de animales	
			Machos	Hembras	Machos	Hembras
G1	Control (con 10 kcal% de grasa)	-	5	5	1-5	31-35
G2	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	-	5	5	6-10	36-40
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	50	5	5	11-15	41-45
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	100	5	5	16-20	46-50
G5	CYPRO-AF200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	200	5	5	21-25	51-55
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	10	5	5	26-30	56-60
Total:			30	30	-	-
Número total de animales:			60			

Detalles de formulación y administración

Los elementos de prueba Cypro-AF y Cypro-DI se disolvieron en agua destilada para formular diferentes dosis. Los elementos de prueba recién formulados se administraron por vía oral mediante sonda. El volumen de administración por animal se mantuvo en 10 ml/kg de peso corporal para todos los animales durante el período de estudio. La siguiente tabla proporcionó detalles de la formulación de prueba.

Grupo	Dosis (mg/kg de peso corporal)	Concentración (mg/ml)	Cantidad (mg)	Volumen de agua destilada (ml)
G1	-	-	-	4,0
G2	-	-	-	4,0
G3	50	5	20	4,0
G4	100	10	40	4,0
G5	200	20	80	4,0
G6	10	1	4	4,0

Inducción de la obesidad: Los animales del grupo de control G1 se alimentaron con alimento de dieta de control normal D12450B que contenía 10 kcal% de grasa y los animales del grupo G2 a G6 se alimentaron con alimento de dieta alta en grasas D12492 que contenía 60 kcal% de grasa durante la inducción de la obesidad y durante el estudio principal.

Estudio principal:

El estudio principal se inició después de la inducción de la obesidad. Las 3 dosis de Cypro-AF y 1 dosis de Cypro-D1 se administraron a los animales desde el día 28 diariamente de forma consecutiva durante un período de 27 días. La alimentación de las dietas continuadas en el estudio principal se realizó en inducción de obesidad. Los animales del grupo de control G1 y el grupo de control G2 con dieta alta en grasas se administraron con agua destilada, mientras que otros animales del grupo recibieron elementos de prueba desde el día 28 al día 54 del período de estudio. El volumen de dosis de administración se mantuvo de acuerdo con el peso corporal semanal de los animales individuales. La duración total del estudio fue de 61 días (7 días de período de aclimatación + 27 días de inducción de la obesidad + 27 días del estudio principal).

Observaciones

Las siguientes observaciones se hicieron durante el período de estudio.

Consumo de alimentos

Se registró el consumo de alimento animal individual. Se calculó y registró el consumo de alimento medio semanal.

Peso corporal

Los pesos corporales de los animales individuales se registraron el día de la recepción el día 1 y luego semanalmente (± 1 día) durante el período de estudio.

Observaciones clínicas

Todos los animales se observaron clínicamente dos veces al día durante el período de estudio.

Patología clínica

Al finalizar el período de estudio, se recolectaron muestras de sangre de los animales en tubos que contenían anticoagulante de potasio etilen diamida tetraacético (K2-EDTA) para hematología y sin anticoagulante para química clínica. Las muestras de sangre recogidas en tubos sin anticoagulante se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el suero. Se recogieron muestras de sangre de forma humanitaria del procedimiento de punción del plexo retroorbitario bajo anestesia suave con éter con la ayuda de un tubo capilar fino. Se analizaron los siguientes parámetros hematológicos y de química clínica.

Hematología

Los siguientes parámetros hematológicos se estimaron usando Sysmex, KX-21 (Transasia Bio-Medicals Ltd., India):

Parámetros	Unidades
Hemoglobina (Hb)	g/dL
Hematocrito (Ret)	%
Recuento de eritrocitos	10^6 células/µL
Recuento total de leucocitos	10^3 células/µL
Volumen corpuscular medio (MCV)	fL
Hemoglobina corpuscular media (MCH)	Pg
Concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC)	g/dL
Recuento de plaquetas	10^3 células/µL
Recuento diferencial de leucocitos (DLC)	%
Tiempo de coagulación	segundos

Química clínica

Los siguientes parámetros de química clínica se analizaron usando el "analizador Erba Mannheim Chern Touch" (Transasia Bio-Medicals Ltd., India) de muestras de suero.

Parámetros	Unidades
Proteína total	g/dL
Albúmina	g/dL
Glucosa	mg/dL
Alanina aminotransferasa (ALT)	UI/L
Aspartato aminotransferasa (AST)	UI/L
Triglicéridos	mg/dL
Colesterol total	mg/dL
Lípido de alta densidad (HDL)	mg/dL
Lípidos de muy baja densidad (VLDL)	mg/dL
Lípidos de baja densidad (LDL)	mg/dL

Patología

Después de la finalización del período de estudio, el día 55, todos los animales se sacrificaron humanitariamente exponiéndolos a un exceso de dióxido de carbono en la cámara de gas y se sometieron a la siguiente necropsia macroscópica externa e interna.

Necropsia macroscópica

Los animales se sometieron a exámenes patológicos macroscópicos externos e internos.

Pesos de órganos

Los siguientes órganos de todos los animales se recortaron de cualquier tejido adherido, según correspondiera, y se pesaron en húmedo lo antes posible para evitar que se secaran: Cerebro, timo, hígado, glándulas suprarrenales, riñones (órganos emparejados), bazo, corazón, ovarios/testículos (órganos emparejados).

Peso de los depósitos de grasa

Se recogieron y pesaron los siguientes depósitos de grasa de todos los animales.

1. Grasa del epidídimo
2. Grasa marrón
3. Grasa de ovario

Análisis estadístico y preparación de informes

Los datos primarios obtenidos del presente estudio se sometieron a procesamiento estadístico informático. La impresión de la computadora de los datos (en forma de apéndice) se verificó con los datos originales sin procesar. Después de la verificación, los datos se sometieron a ANOVA unidireccional (análisis de varianza) con la prueba posterior de Dunnett para los datos sobre pesos corporales, parámetros hematológicos y de química clínica, pesos de órganos usando GraphPad Prism versión 5.01, GraphPad Software. Todos los análisis y comparaciones serán evaluados al 95 % de nivel de confianza (P<0,05), indicado por el designado por los superíndices de a donde G1 se compara con G3, G4, G5 y G6 y b donde G2 se compara con G3, G4, G5 y G6 a lo largo del informe como se indica a continuación: *: Estadísticamente significativo (P<0,05) cuando corresponda.

Los datos se sometieron a un análisis estadístico ANOVA unidireccional comparando lo siguiente:
Grupo G1 {grupo de control (con 10 kcal% de grasa)} al grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa) y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa} como se representa a continuación:

Grupo G1 Grupo control (con 10 kcal% de grasa)	Grupo G3 CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G4 CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G5 CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G6 CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)

G2 -Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa) al grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} como se muestra a continuación:

Grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	Grupo G3 CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G4 CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G5 CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)
	Grupo G6 CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)

Resultados

Consumo de alimentos

El sumario del consumo de alimentos medio semanal de animales machos y hembras se presenta en la Tabla 1 y Tabla 2 respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimentos de los animales durante el período de estudio.

Tabla 1- Resumen del consumo de alimento medio semanal (g) de animales machos

Consumo de alimentos (g)									
Grupo	Tratamiento	Días							
		7	14	21	28	35	42	49	54
G1[a]	Control (con hasta kcal% de grasa)	2,80 ± 0,13	3,50 ± 0,11	4,46 ± 0,10	4,55 ± 0,11	5,15 ± 0,18	4,63 ± 0,23	4,82 ± 0,19	5,10 ± 0,25
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,86 ± 0,21	3,63 ± 0,15	4,38 ± 0,42	4,77 ± 0,21	5,00 ± 0,27	4,89 ± 0,20	4,83 ± 0,23	4,96 ± 0,14
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,79 ± 0,19	3,67 ± 0,14	4,45 ± 0,10	4,75 ± 0,19	5,12 ± 0,16	4,89 ± 0,35	4,96 ± 0,04	4,92 ± 0,47
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,73 ± 0,16	3,64 ± 0,19	4,27 ± 0,24	4,75 ± 0,18	5,12 ± 0,05	4,73 ± 0,28	4,99 ± 0,16	5,15 ± 0,19
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,99 ± 0,09	3,63 ± 0,15	4,41 ± 0,10	4,84 ± 0,06	5,20 ± 0,13	4,89 ± 0,14	5,02 ± 0,09	5,12 ± 0,12
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,87 ± 0,21	3,66 ± 0,18	4,34 ± 0,26	4,63 ± 0,25	5,03 ± 0,26	4,91 ± 0,10	5,01 ± 0,19	5,21 ± 0,25

Tabla -2: Sumario del consumo de alimento medio semanal (G) de animales hembras

CONSUMO DE ALIMENTOS									
Grupo	Tratamiento	Días							
		7	14	21	28	35	42	49	56
G1[a]	Control (con 10 kcal% de grasa)	2,90 ± 0,25	3,42 ± 0,30	3,87 ± 0,31	4,40 ± 0,51	4,88 ± 0,24	4,95 ± 0,15	4,54 ± 0,19	4,51 ± 0,15
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,92 ± 0,37	3,53 ± 0,25	3,54 ± 0,33	4,17 ± 0,41	4,80 ± 0,36	4,59 ± 0,31	4,36 ± 0,08	4,43 ± 0,13
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,77 ± 0,26	3,27 ± 0,32	3,48 ± 0,22	4,27 ± 0,49	4,75 ± 0,55	5,11 ± 0,09	4,42 ± 0,14	4,33 ± 0,23
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,72 ± 0,15	3,40 ± 0,69	3,59 ± 0,37	4,59 ± 0,27	4,55 ± 0,33	4,89 ± 0,08	4,35 ± 0,21	4,38 ± 0,17
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	2,90 ± 0,38	3,34 ± 0,30	3,56 ± 0,46	4,37 ± 0,31	4,42 ± 0,39	5,02 ± 0,26	4,63 ± 0,30	4,26 ± 0,12
G6	CYPRO-DI 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	3,08 ± 0,21	3,80 ± 0,53	3,59 ± 0,31	4,65 ± 0,28	4,54 ± 0,14	5,09 ± 0,19	4,56 ± 0,15	4,31 ± 0,19
n=5; los valores son la media ± la desviación estándar; P> 0,05									

Peso corporal

El sumario del peso corporal semanal de los animales machos y hembras se presenta en la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente.

Tabla -3: Sumario del peso corporal (G) de los animales machos

PESO CORPORAL (g)										
Grupo	Tratamiento	Días								
		1	7	14	21	28	35	42	49	55
G1[a]	Control (con 10 kcal% de grasa)	23,34 ± 1,11	23,50 ± 0,93	23,88 ± 1,08	23,48 ± 0,86	25,04 ± 1,05	26,70 ± 1,40	28,62 ± 3,31	29,16 ± 3,75	31,00 ± 4,12
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,48 ± 1,06	24,10 ± 0,86	24,58 ± 1,09	26,12 ± 1,12	28,48 ± 1,98	30,72 ± 1,72	32,50 ± 1,53	33,66 ± 1,78	35,20 ± 0,95
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,42 ± 1,06	24,30 ± 1,63	24,90 ± 1,71	25,96 ± 1,49	27,80 ± 2,84	29,48 ± 3,50	30,28 ± 3,39	30,98 ± 2,95	33,34 ± 1,78
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,24 ± 1,18	23,78 ± 1,62	24,68 ± 1,48	26,14 ± 2,12	28,70 ± 1,72	29,22 ± 3,06	30,04 ± 3,38	30,00 ± 2,85	32,94 ± 2,49
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,60 ± 1,03	24,32 ± 0,60	24,98 ± 1,31	26,08 ± 1,01	28,90 ± 0,82	30,60 ± 1,65	30,50 ± 3,28	31,06 ± 3,61	33,46 ± 3,40
G6	CYPRO-DI 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	23,68 ± 1,20	24,50 ± 1,19	25,24 ± 1,18	26,26 ± 1,53	29,04 ± 3,11	29,62 ± 3,76	29,86 ± 2,86	30,58 ± 2,63	33,38 ± 2,76
n=5; los valores son la media ± la desviación estándar; P> 0,05										

Tabla- 4: Sumario del peso corporal (G) de los animales hembras

PESO CORPORAL (g)										
Grupo	Tratamiento	Días								
		1	7	14	21	28	35	42	49	55
G1[a]	Control (con 10 kcal% de grasa)	21,08 ± 0,82	21,70 ± 0,81	22,24 ± 0,26	23,12 ± 0,68	23,98 ± 1,17	24,82 ± 2,41	25,10 ± 2,59	26,12 ± 1,91	27,74 ± 1,02
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	21,38 ± 1,02	22,02 ± 0,67	22,20 ± 0,98	23,10 ± 0,76	25,04 ± 0,34	26,40 ± 0,89	28,26 ± 0,78	30,70 ± 1,70	33,02 ± 1,80
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	21,14 ± 0,87	21,76 ± 0,36	22,76 ± 0,68	24,30 ± 0,85	25,84 ± 0,81	25,30 ± 1,35	26,62 ± 1,68	28,66 ± 1,01	30,58 ± 1,76
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	21,32 ± 1,03	21,62 ± 1,53	23,68 ± 1,08	25,56 ± 1,19	26,32 ± 0,69	26,30 ± 1,30	26,84 ± 2,34	28,08 ± 3,07	30,30 ± 3,54
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	20,94 ± 0,95	21,32 ± 1,18	23,14 ± 0,97	24,94 ± 1,32	26,12 ± 0,98	25,90 ± 1,23	26,30 ± 2,04	27,62 ± 1,06	30,22 ± 1,63
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	21,34 ± 1,27	21,58 ± 0,69	23,16 ± 1,08	25,46 ± 0,86	26,72 ± 0,61	26,18 ± 0,98	26,08 ± 1,47	28,44 ± 1,82	29,78 ± 1,74
n=5; los valores son la media ± la desviación estándar; *- Diferencia significativa, P<0,05										

En los animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio del día 21 en el grupo G3 {CYPRO-AF- 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF - 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 - 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

En los animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio del día 28 en el grupo G4 {CYPRO-AF - 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 - 10 mg/kg + Dieta

alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

En los animales machos, hubo una disminución en los valores de peso corporal semanal medio de los días 35, 42, 49 y 55 en el grupo G3 {CYPRO-AF- 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF- 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF-200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO -D1 - 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la administración de elementos de prueba.

En los animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio del día 21 en el grupo G4 {CYPRO-AF - 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 - 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

En los animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores de peso corporal semanal medio del día 28 en el grupo G3 {CYPRO-AF - 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF - 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 - 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

En los animales hembras, hubo una disminución en los valores de peso corporal semanal medio de los días 35, 42, 49 y 55 en el grupo G3 {CYPRO-AF - 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF - 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO¬ AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO -D1 - 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la administración de elementos de prueba.

Observaciones clínicas

El sumario de los signos clínicos de animales machos y hembras se presenta en la Tabla 5 y la Tabla 6, respectivamente. Se encontró que los animales tenían un estado de salud normal y saludable durante las observaciones clínicas durante el período de estudio.

Tabla -5: Sumario de las observaciones de signos clínicos en machos

Grupo	Observaciones de signos clínicos									
	Tratamiento	Días								
		1	2-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-55
G1a	Control (con 10 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G2b	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G6	CYPRO-DI 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
n=5; N-Normal										

Tabla- 6: Sumario de observaciones de signos clínicos en los animales hembras

Grupo	Observaciones de signos clínicos									
	Tratamiento	Días								
		1	2-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-55
G1[a]	Control (con 10 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G6	CYPRO-DI 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
n=5; N-Normal										

Hematología

El sumario de las estimaciones de los parámetros hematológicos de animales machos y hembras se presenta en la Tabla-7 y Tabla-8 respectivamente.

Tabla -7: Sumario de hematología de los animales machos

Grupo	Tratamiento (10^3 células/L)	TLC (10^6 células/L)	TEC g/dL	Hb (%)	Hct (fL)	MCV (pg)	MCH (g/dL)	MCHC (g/dL)	Recuento de plaquetas (10^3 células/L)
G1[a]	Control con 10 kcal% de grasa	9,34 ± 1,88	9,19 ± 0,48	13,04 ± 0,71	46,18 ± 3,65	50,22 ± 1,63	14,20 ± 0,40	28,28 ± 1,11	1.167,20 ± 139,82
G2[b]	Control alto en grasas con 60 kcal% de grasas	13,16 ± 7,95	9,25 ± 0,80	13,30 ± 0,82	46,44 ± 3,17	50,26 ± 0,86	14,40 ± 0,74	28,68 ± 1,27	1.297,80 ± 176,81
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas	7,34 ± 3,51	9,48 ± 0,75	13,74 ± 1,09	48,08 ± 4,30	50,72 ± 2,04	14,50 ± 0,46	28,58 ± 0,49	1.297,00 ± 232,56
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	10,08 ± 7,35	9,06 ± 1,19	13,34 ± 0,86	44,70 ± 5,39	49,40 ± 1,31	14,86 ± 1,22	30,04*a ± 1,95	1.313,20 ± 159,37
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	7,44 ± 3,64	8,93 ± 1,11	13,00 ± 1,82	44,84 ± 6,55	50,04 ± 1,76	14,52 ± 0,45	29,02 ± 0,33	1.465,60 ± 168,11
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	9,30 ± 3,51	9,57 ± 0,77	13,74 ± 0,50	47,08 ± 2,16	49,32 ± 2,09	14,42 ± 0,75	29,20 ± 0,62	1.389,60 ± 278,21
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P<0,05									

Tabla -7 (Continuación): Sumario de hematología de los animales machos

Parámetros de hematología							
Grupo	Tratamiento	Tiempo de coagulación (seg)	Recuento diferencial de leucocitos				
			Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
G1[3]	Control con 10 kcal% de grasa	106,80 ± 10,47	21,40 ± 3,21	70,00 ± 1,58	6,40 ± 1,52	0,80 ± 0,45	1,60 ± 0,89
G2b	Control alto en grasas con 60 kcal% de grasas	110,80 ± 14,86	20,00 ± 3,94	73,00 ± 3,16	6,00 ± 1,58	0,60 ± 0,55	1,00 ± 0,71
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas	111,20 ± 17,80	20,40 ±2,30	71,00 ± 3,08	6,60 ± 1,14	0,80 ± 0,45	1,40 ± 0,89
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	112,20 ± 13,46	19,80 ± 3,19	72,80 ± 3,42	5,80 ± 1,92	0,60 ± 0,55	1,40 ± 0,55
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	101,00 ± 11,45	22,00 ± 2,00	68,80 ± 1,64	7,00 ± 1,00	0,80 ± 0,45	1,40 ± 0,55
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	113,20 ± 13,10	21,40 ± 2,88	70,40 ± 4,16	5,80 ± 1,30	0,60 ± 0,55	1,80 ± 0,84
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P> 0,05							

Tabla -8: Sumario de hematología de los animales hembras

Grupo	Tratamiento (10^3 células/µL)	TLC (10^6 células/µL)	TEC g/dL	Hb (%)	Hct (fL)	MCV (pg)	MCH (g/dL)	MCHC (g/dL)	Recuento de plaquetas (10^3 células/µl)
G1[a]	Control con 10 kcal% de grasa	8,74 ± 2,96	9,94 ± 0,70	13,84 ± 0,81	50,06 ± 3,81	50,36 ±1,76	13,94 ± 0,72	27,68 ± 1,00	1.195,40 ± 273,99
G2[b]	Control alto en grasas con 60 kcal% de grasa	8,16 ± 2,55	8,97 ± 1,13	13,16 ± 1,72	45,74 ± 6,65	50,88 ± 1,58	14,66 ± 0,50	28,82 ± 0,77	1.241,80 ±245,80
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas	7,06 ± 1,87	9,47 ± 0,22	14,00 ± 0,50	49,84 ± 1,34	52,60*a ± 0,31	14,76*a ± 0,29	28,10 ± 0,51	1.144,00 ± 144,65
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	10,56 ± 5,49	9,25 ± 0,49	13,48 ± 0,73	47,50 ± 3,24	51,32 ± 1,34	14,58 ± 0,44	28,40 ± 0,70	1.124,00 ± 152,23
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	7,82 ± 3,18	9,73 ± 0,70	13,34 ± 0,93	49,32 ± 2,70	50,74 ± 1,55	13,72** ± 0,39	27,04**b ± 0,58	1.109,60 ± 223,81
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	7,40 ± 2,20	9,61 ± 0,52	13,82 ± 0,54	48,78 ± 1,91	50,82 ± 1,13	14,40 ± 0,42	28,36 ± 0,84	1.111,60 ± 180,93
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P<0,05									

TABLA- 8 (Continuación) Sumario de hematología de los animales hembras

Grupo	Tratamiento	Tiempo de coagulación (seg)	Recuento diferencial de leucocitos				
			Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
G1[a]	Control con 10 kcal% de grasa	105,60 ± 14,17	18,80 ± 3,90	74,60 ± 4,45	5,40 ± 0,89	0,80 ± 0,45	1,40 ± 0,89
G2[b]	Control alto en grasas con 60 kcal% de grasas	108,60 ± 12,74	21,00 ± 3,00	72,00 ± 1,87	6,20 ± 1,79	0,40 ± 0,55	1,40 ± 0,55
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas	117,60 ± 14,79	19,60 ± 3,85	73,20 ± 4,15	5,20 ± 1,10	0,80 ± 0,84	1,20 ± 0,84
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	104,60 ± 12,05	20,40 ± 4,62	72,00 ± 4,80	6,00 ± 1,58	0,80 ± 0,45	1,20 ± 0,45
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas con 60 kcal% de grasa)	111,20 ± 14,25	21,60 ± 3,97	69,20 ± 3,96	7,00 ± 0,71	1,00 ± 0,71	1,00 ± 0,71
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas con 60 kcal% de grasa)	109,40 ± 12,54	20,60 ± 3,51	71,00 ± 2,65	6,20 ± 1,48	0,80 ± 0,84	1,00 ± 0,71
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P>0,05							

Comparación de análisis estadístico de parámetros hematológicos entre G1 a G3, G4, G5 y G6

Concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC)

En los animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en el valor medio de MCHC del grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa))}. Estos cambios pueden considerarse incidentales ya que no hubo una respuesta dependiente de la dosis.

Volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media

En los animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores medios de MCV y MCH del grupo G3 {CYPRO-AF -50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Estos cambios pueden considerarse incidentales ya que no hubo una respuesta dependiente de la dosis.

Hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media

En las hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores medios de MCH y MCHC del grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 {Grupo control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}. Este cambio puede considerarse incidental ya que no hubo una respuesta dependiente de la dosis.

Química clínica

El sumario de las estimaciones de los parámetros de química clínica de animales machos y hembras se presenta en la Tabla-9 y Tabla-10, respectivamente.

Tabla 9

PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA EN ANIMALES MACHOS								
Grupo	Tratamiento	Proteína total (g/dL)	Albúmina (g/dL)	Glucosa (mg/dL)	ALT/SGPT (UI/L)	AST/SGOT (UI/L)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
G1[a]	Control (con 10 kcal% de grasa)	6,39 ± 0,39	2,73 ± 0,44	102,96 ± 48,15	58,74 ± 15,21	108,69 ± 28,77	122,28 ± 36,20	86,99 ± 16,72
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	7,14 ± 2,31	2,70 ± 0,20	106,86 ± 34,32	55,37 ± 35,47	98,57 ± 25,20	110,07 ± 19,34	128,94 ± 19,01
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,15 ± 0,26	2,71 ± 0,13	93,65 ± 28,95	59,42 ± 24,88	106,00 ± 23,46	94,93 ± 18,82	127,31[*a] ± 32,60
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,20 ± 0,23	2,64 ± 0,23	120,34 ± 19,04	56,04 ± 25,33	84,41 ± 28,56	99,65 ± 18,16	123,79 ± 25,80
G5	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,13 ± 0,61	2,57 ± 0,35	107,18 ± 37,36	42,54 ± 20,06	74,28 ± 22,79	95,36 ± 18,13	107,19 ± 19,26
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,50 ± 0,37	2,56 ± 0,35	103,20 ± 43,46	51,31 ± 23,80	71,58 ± 20,61	97,18 ± 21,58	130,72*[a] ± 15,34
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P<0,05								

Tabla 9 continuación

PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA				
Grupo	Tratamiento	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
G1[a]	Control (con 10 kcal% de grasa)	45,12 ± 16,79	24,46 ± 7,24	45,46 ± 13,24
G2[b]	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	85,48 ± 23,04	22,01 3,87	66,84 ± 17,14
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	40,04***[b] ± 7,49	18,99 ±3,76	78,70**[a] ± 14,09
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	55,90**[b] ± 15,76	19,93 ± 3,63	75,16**[a] ± 17,74
G5	CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	20,09**[ab] ± 7,51	19,07 ± 3,63	59,99 ± 13,73
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	26,82***[b] ± 5,45	19,44 ±4,32	81,31***[a] ± 11,64
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P<0,05				

Tabla- 10

PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA EN LOS ANIMALES HEMBRAS								
Grupo	Tratamiento	Proteína total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Glucosa (mg/dL)	ALT/SGPT (UI/L)	AST/SGOT (UI/L)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
G1a	Control (con 10 kcal% de grasa)	6,78 ± 0,36	3,11 ± 0,13	78,96 ± 18,98	40,51 ± 30,20	85,76 ± 39,56	97,65 ± 36,05	75,03 ± 11,41
G2b	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,70 ± 0,72	2,86 ± 0,36	89,91 ± 26,14	35,11 ± 9,73	71,58 ± 21,82	69,94 ± 35,70	97,70 ± 10,92
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,23*a ± 0,22	2,99 ± 0,24	85,60 ± 11,61	37,14 ± 17,21	75,62 ± 21,43	34,87***a ± 10,72	86,45 ± 15,34
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,27*a ± 0,31	3,08 ± 0,24	108,98 ± 34,03	41,86 ± 14,44	66,84 ± 5,55	44,60***a ± 14,87	84,90 ± 12,22
G5	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,36 ± 0,37	2,99 ± 0,30	105,62 ± 27,44	35,78 ± 5,12	78,49 ± 10,08	39,31***a ± 8,30	105,15*a ± 14,39
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	6,73 ± 0,09	3,15 ± 0,32	110,20 ± 21,29	37,81 ± 18,55	68,87 ± 19,91	29,27***a ± 12,83	87,39 ± 17,68
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P<0,05								

Tabla 10 continuación

PARÁMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA EN LOS ANIMALES HEMBRAS				
Grupo	Tratamiento	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
G1a	Control (con 10 kcal% de grasa)	14,70 ± 6,70	15,01 ± 2,28	42,01 ± 13,27
G2b	Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	20,48 ± 2,54	19,54 ± 2,18	47,61 ± 14,19
G3	CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	16,30*b ± 3,89	17,29 ± 3,07	47,80 ± 11,50
G4	CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	11,83***b ±1.87	16,98 ± 2,44	54,19 ± 5,27
G5	CYPRO-AF · 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)	12,67***b ± 2. 97	21,03*a± 2,88	49,27 ± 4,39
G6	CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)		17,48 ± 3,54	54,89 ± 13,74
n=5; Valores- media ± desviación estándar; P<0,05				

Comparación de análisis estadístico de parámetros de química clínica entre G1 a Q3, G4, G5 y G6

Proteínas totales

En los animales hembras, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores medios de proteína total del grupo G3 {CYPRO-AF -50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y del grupo G4 {CYPRO-AF - 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

Triglicéridos

En los animales hembras, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores medios de triglicéridos del grupo G3 {CYPRO-AF -50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 -10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

Colesterol total

En los animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en el valor medio de colesterol total del grupo G3 {CYPRO-AF -50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y del grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

En los animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en los valores medios de colesterol total del grupo G5 {CYPRO-AF -200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Este cambio puede considerarse debido a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

Lípidos de alta densidad

En los animales machos, hubo una disminución estadísticamente significativa en el valor medio de lípidos de alta densidad del grupo G5 {CYPRO-AF - 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Este cambio puede considerarse debido a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

Lípidos de baja densidad

En los animales machos, hubo un aumento estadísticamente significativo en el valor medio de lípidos de baja densidad del grupo G3 {CYPRO-AF -50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 -10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa))}. Se consideró que estos cambios se debían a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

Lípidos de muy baja densidad

En los animales hembras, hubo un aumento estadísticamente significativo en el valor medio de lípidos de muy baja densidad del grupo G5 {CYPRO-AF - 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G1 {Grupo de control (con 10 kcal% de grasa)}. Este cambio puede considerarse debido a la diferencia en el contenido de grasa del alimento.

Comparación de análisis estadístico de parámetros de química clínica entre G2 a G3, G4, G5 y G6

Triglicéridos

En los animales machos, hubo una disminución en los valores medios de triglicéridos del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios en los valores medios de triglicéridos podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

En los animales hembras, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores medios de triglicéridos del grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios en los valores medios de triglicéridos podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

Hubo una disminución en los valores medios de triglicéridos del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios en los valores medios de triglicéridos podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

Colesterol total

En los animales machos, hubo una disminución en los valores medios de colesterol total del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios en los valores medios de colesterol total podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

En los animales hembras, hubo una disminución en los valores medios de colesterol total del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF 100.mg/kg + Dieta alta en grasas(con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios en los valores medios de colesterol total podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

Lípidos de alta densidad

En los animales machos, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores medios de lípidos de alta densidad del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa).

La disminución estadísticamente significativa en los cambios medios en los valores de lípidos de alta densidad podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

En los animales hembras, hubo una disminución estadísticamente significativa en los valores medios de lípidos de alta densidad del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal de % de grasa). Estas disminuciones en los cambios medios en los valores de lípidos de alta densidad podrían deberse al efecto de los elementos de prueba.

Lípidos de baja densidad

En los animales machos, hubo una disminución en los valores medios de lípidos de baja densidad del grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios medios en los valores de lípidos de baja densidad podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

Valores de lípidos de muy baja densidad

En los animales machos, hubo una disminución en los valores medios de lípidos de muy baja densidad del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF -100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G5 {CYPRO-AF 200 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Esta disminución en los cambios medios en los valores de lípidos de muy baja densidad podría deberse al efecto de los elementos de prueba.

En animales hembras, hubo una disminución marginal en los valores medios de lípidos de muy baja densidad del grupo G3 {CYPRO-AF 50 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)}, grupo G4 {CYPRO-AF 100 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} y grupo G6 {CYPRO-D1 10 mg/kg + Dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa)} en comparación con el grupo G2 Control de dieta alta en grasas (con 60 kcal% de grasa). Estas disminuciones en los cambios medios en los valores de lípidos de muy baja densidad podrían deberse al efecto de los elementos de prueba.

Conclusión: A partir del presente estudio, puede concluirse que los elementos de prueba Cypro-AF y Cypro-D1 tuvieron un efecto en la disminución de parámetros como las concentraciones de HDL, Triglicéridos, Colesterol, LDL y VLDL en animales C57 machos y hembras obesos inducidos por una dieta alta en grasas a 50, 100 y 200 mg/kg

de peso corporal de Cypro-AF y 10 mg/kg de peso corporal de Cypro-DI. No se observaron cambios estadísticos significativos en los pesos de los órganos y los depósitos de grasa en la necropsia de los animales.

Ejemplo 3 -El efecto de *Cyperus rotundus,* fracción de acetato de etilo que comprende piceatanol y sus dímeros escirpusina A y escirpusina B para el control del peso en seres humanos -Estudios de eficacia, seguridad y tolerabilidad.

Detalles del estudio

Los objetivos primarios incluyeron (i) Estudiar la eficacia del extracto de *Cyperus rotundus* para el control del peso en pacientes obesos; y (ii) Estudiar la seguridad y tolerabilidad del extracto de *Cyperus rotundus* para el control del peso en pacientes obesos.

El objetivo secundario incluyó el estudio del inicio de la actividad del extracto de *Cyperus rotundus* en el control del peso de pacientes obesos.

Las medidas del resultado primario incluyeron, (i) disminución del peso corporal y del índice de masa corporal; (ii) disminución de la circunferencia de la cintura y la relación cintura :cadera (medidas antropométricas); (iii) disminución de los valores de colesterol, triglicéridos, LDL y VLDL desde la línea de base; (iv) aumento de los valores de HDL desde el inicio; y (v) evidencia fotográfica obtenida de los sujetos desde el inicio y en la última visita mientras se ocultaba su identidad.

Las medidas del resultado secundario incluyeron evaluar la tolerabilidad del material de estudio en términos de eventos adversos y otros signos o síntomas físicos en los sujetos del estudio.

Demografía del sujeto (Tabla 11)

Tabla 11

	Total
Edad (años)	
N	30
Media ± desviación estándar	37,5 ± 10,71
Mediana	38,0
Altura (cm)	
N	30
Media ± desviación estándar	160,3 ± 10,10
Mediana	159,5
Peso (kg)	
N	30
Media ± desviación estándar	90,1 ± 16,45
Mediana	80,1
Índice de masa corporal (kg/m2)	
N	30
Media ± desviación estándar	34,57 ± 3,84
Mediana	33,9
Género [n (%)]	
Machos	8 (26,67)
Hembras	22 (73,33)

Formulaciones ilustrativas usadas en el estudio en seres humanos (Tablas 12 y 13)

Tabla 12

	Ingredientes (material de estudio activo)	Peso (mg)
1	*Extracto de Cyperus* rotundus (5 % de los estilbenos totales) -Extracto que comprende piceatanol, escirpusina A y escirpusina B	525
2	Fosfato de calcio dibásico	30
3	Estearato de magnesio	5

Tabla 13

Ingredientes (Placebo)	Peso (mg)
Celulosa microcristalina	560 mg

El material de estudio activo y el placebo descritos en la presente memoria se formularon anteriormente como cápsulas de gelatina dura marrón/marrón de tamaño "00" con un peso de relleno de 560 mg. Al ser un estudio doble ciego, tanto la cápsula de material de estudio activo como la cápsula de placebo fueron idénticas en todos los aspectos físicos como tamaño, forma y peso. Un lote seleccionado al azar de material de estudio activo cuando se analizó mostró 36,18 mg de piceatanol y escirpusina B en promedio por cápsula. En aspectos más ilustrativos, las formulaciones ilustrativas que comprenden *el extracto de Cyperus rotundus* se estandarizaron para contener más del 3 % de los estilbenos totales, incluidos piceatanol, escirpusina A y escirpusina B. En el ejemplo ilustrativo, enunciado en la Tabla 12, el extracto de *Cyperus rotundus* se ha estandarizado para que contenga un 5 % de los estilbenos totales, incluidos piceatanol, escirpusina A y escirpusina B.

El ensayo se llevó a cabo en el Government Ayurveda Medical College, Mysore, India. El estudio se inició solo después de obtener una opinión favorable escrita del comité de ética institucional. No se realizaron más cambios o enmiendas al protocolo aprobado durante el curso del estudio. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con los principios enunciados en la Declaración de Helsinki (Edimburgo, 2000) y la guía tripartita armonizada de la ICH sobre Buenas Prácticas Clínicas (BPC). Se proporcionó a todos los sujetos información escrita y oral sobre el estudio en un idioma comprensible para el sujeto.

Este estudio aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos, controlado con placebo, tuvo un total de 5 visitas al sitio clínico por parte de los sujetos del estudio, además de la visita de cribado. El calendario de evaluaciones se representa en la Tabla 14.

Tabla 14

Visita	0	1	2	3	4	5	Seguimiento (telefónico)
Días	Día - 3	Día 0	15	30	60	90	Al menos 15
							días desde la última visita
Evaluaciones							
Consentimiento informado por escrito	X						
Criterio de inclusión/exclusión		X					
Aleatorización		X					
Dispensación de IP		X	X	X	X		
Prueba de embarazo en orina para mujeres [a]	X				X	X	
Demografía	X		X	X	X	X	
Medidas antropométricas		X	X	X	X	X	
Examen físico	X		X	X	X	X	
Historial médico	X						
Historial de medicación	X						
Historial de tratamiento	X						
Condiciones comórbidas	X						
Hematología	X					X	
Bioquímica	X					X	
Virología	X						
Cuestionarios de calidad de vida		X				X	
Signos vitales	X	X	X	X	X	X	
Evento adverso y bienestar general		X	X	X	X	X	X
Medicación concomitante		X	X	X	X	X	X

Los sujetos se incluyeron en el estudio si se indicaba "Sí" a todos los criterios de inclusión y "No" a cualquiera de los criterios de exclusión. Criterios de inclusión: 1) Pacientes masculinos y/o femeninos 2) Edad entre 20 y 65 años 3) Niveles elevados de colesterol sérico más de 200 mg por dL 4) Triglicéridos séricos elevados más de 150 mg por dL 5) LDL sérico elevado más de 130 mg por dL y o VLDL sérico elevado más de 40 mg por dL 6) IMC entre ≥ 30 a 40 kg/m2 7) Dispuesto a acudir a visitas de seguimiento regulares 8) Capaz de dar su consentimiento informado por escrito. Criterios de Exclusión: 1) Ingesta de agentes para la pérdida de peso de venta libre, supresores del apetito de acción central en los seis meses anteriores, 2) Síndromes fisiopatológicos/genéticos asociados con la obesidad (síndrome de Cushing, síndrome de Turner, síndrome de Prader willi), 3) Pacientes con evidencia de malignidad 4) Pacientes con diabetes mellitus mal controlada (HbA1c> 10 %), 5) Pacientes con hipertensión mal controlada (> 160/100 mm Hg), 6) Pacientes con medicación prolongada (> 6 semanas) con corticosteroides, antidepresivos, anticolinérgicos, etc. o cualquier otro fármaco que pueda influir en el resultado del estudio, 7) Pacientes que padecen una enfermedad sistémica importante que requiera tratamiento farmacológico a largo plazo (artritis reumatoide, rizomeculosis, trastornos psico-neuroendocrinales, etc.), 8) Pacientes con antecedentes de fibrilación auricular, síndrome coronario agudo, infarto del miocardio, accidente cerebrovascular o arritmia grave en los últimos 6 meses, 9) Paciente sintomático con evidencia clínica de insuficiencia cardíaca, 10) Pacientes con trastorno hepático grave concurrente (definido como Aspartato Amino Transferasa (AST) y/o Alanina Amino Transferasa (ALT), Bilirrubina total, 11) Fosfatasa alcalina (ALP)> 2,5 veces el límite superior normal) o Trastornos renales (definido como S. Creatinina> 1,2 mg/dL), Disfunción Pulmonar Grave (asma bronquial no controlada y/o Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica [EPOC]), o cualquier otra condición que pueda poner en peligro el estudio, 12) Historia de VIH y otras infecciones virales, 13) Alcohólicos y/o drogadictos, 14) Terapia quirúrgica previa para la obesidad, 15) Historial de hipersensibilidad a cualquiera de los extractos de hierbas o suplementos dietéticos, 16) Mujer embarazada/lactante, 17) Pacientes que hayan completado su participación en cualquier otro ensayo clínico durante los últimos seis (06) meses, 18) Cualquier otra condición que el Investigador Principal considere que pueda poner en peligro el estudio.

Aleatorización, asignación de tratamiento y procedimientos de estudio

Al tratarse de un estudio piloto, no se requirió del cálculo formal del tamaño de muestra. A cada participante se le asignó un código de aleatorización de 6 dígitos y los productos de investigación fueron distribuidos por el personal del sitio de acuerdo con la lista de códigos de aleatorización generada por un estadístico independiente. El doble cegamiento de los productos en investigación se logró mediante un cegamiento independiente de los kits de administración y, por lo tanto, tanto el personal del centro clínico como los participantes permanecieron cegados al tratamiento recibido durante la duración del estudio. Se capturaron los datos demográficos de todos los sujetos inscritos en la visita de cribado (Tabla 11). Se incluyó en el estudio a pacientes obesos que no habían recibido ningún otro tratamiento en los 3 meses anteriores. Se recomendó a todos los sujetos inscritos que se adhirieran al programa de eventos (Tabla 14) del estudio. Los sujetos inscritos se asignaron entre los grupos activo y placebo en proporción 1: 1. Los sujetos usaron este producto de forma ambulatoria y se les pidió que se autoadministraran dos cápsulas de gelatina por día (cada una con un peso de 560 mg) ya sea activo o placebo, al menos 30 minutos antes de una comida, preferentemente por la mañana y por la noche como ingrediente dietético para un período de 90 días. Se programó que regresaran para las evaluaciones clínicas los días 15, 30, 60 y 90. Se realizó un seguimiento telefónico al menos 15 días desde la última visita programada sobre el bienestar del sujeto. La dieta diaria y las actividades físicas se registraron en los diarios de los pacientes que se les proporcionaron en la visita 1. Lo mismo se controló y verificó en visitas posteriores de los investigadores. El cumplimiento del suplemento del estudio se revisó en cada visita mediante el examen de los suplementos devueltos. La recopilación de datos durante este estudio clínico y el análisis estadístico se realizaron por grupos funcionales separados y un estadístico independiente certificado, respectivamente. No se realizaron cambios o enmiendas al protocolo aprobado después de que comenzó el ensayo y no se realizó ningún análisis intermedio durante el período de estudio. Los resultados de seguridad se midieron mediante: 1) Examen físico y datos vitales, 2) Evaluación de los eventos adversos (EA) informados, si los hay, 2) Eventos adversos, si los hay. Los resultados de eficacia se midieron por 1) peso, IMC, circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera y relación cintura-cadera.

Análisis estadístico

Se usó el software de análisis estadístico (SAS) de la versión 9.2 para el análisis de datos para el estudio clínico en seres humanos. Se usaron la prueba t pareada, el análisis de covarianza (ANCOVA) y la prueba de suma de intervalos con signo de Wilcoxon para las variables del conjunto de datos apropiado para alcanzar la mejor conclusión estadística posible entre los grupos que recibieron el placebo y el activo. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los descriptores de línea de base se resumieron como medias y desviaciones estándar para las variables continuas y como frecuencias y porcentajes para las variables categóricas. Ultima observación llevada a cabo (LOCF), se siguió el procedimiento por intención de tratar para las evaluaciones de eficacia de los sujetos.

Resultados

Ninguno de los sujetos inscritos tenía antecedentes médicos anormales o hallazgos físicos anormales observados en la visita de cribado o durante las visitas del estudio. No se observaron cambios estadísticamente significativos en

los signos vitales entre los grupos de tratamiento en ninguna de las visitas del estudio. De los 30 pacientes aleatorizados, 26 completaron el estudio. La proporción de hombres y mujeres que completaron todas las visitas del estudio es 7:19, 3 mujeres abandonaron el estudio en varios momentos, en el que un análisis al final del estudio reveló que 3 de cada 4 sujetos que abandonaron estaban recibiendo placebo. El porcentaje de cumplimiento del tratamiento de 26 pacientes que completaron el estudio fue bueno. El mínimo fue el 87,22 % y el máximo fue el 100 % de cumplimiento del tratamiento por 19 sujetos del estudio. El ensayo no terminó prematuramente y se detuvo solo después de alcanzar el tamaño de muestra objetivo de 30. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los signos vitales (Tabla 15) ni valores de laboratorio anormales clínicamente significativos (Tablas 16 y 17) desde la línea de base hasta las visitas finales y entre los grupos de tratamiento. Se informó un único EA durante todo el período de estudio y, de acuerdo con la opinión del investigador, el evento no estaba "relacionado" con el producto del estudio. No se observaron eventos adversos graves o eventos adversos significativos en este estudio. El análisis de eficacia de estos parámetros primarios revela que el peso, el IMC y la circunferencia de la cintura alcanzaron significación estadística entre los dos grupos de tratamiento al final del estudio, mientras que los otros dos parámetros (circunferencia de la cadera y relación cintura-cadera) no mostraron ninguna significación entre los dos grupos de tratamiento. Se encontró que pocas evaluaciones bioquímicas (Tabla 18) como colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de muy baja densidad fueron estadísticamente significativas ($p<0,01$) cuando se compararon entre los dos pacientes del grupo de tratamiento (Tabla 18). Las fotografías de los sujetos antes y después de la duración del estudio indican claramente la eficacia del producto.

Tabla 15

Parámetro vital	Producto	Inicial	Final	*valor de p
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	Placebo	128,0	126,7	0,1661
	Activo	134,7	133,6	0,3356
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	Placebo	82,7	81,7	0,3388
	Activo	86,0	85,7	.
Frecuencia cardíaca (latidos por minuto)	Placebo	73,9	73,8	0,1661
	Activo	72,8	72,6	.
Frecuencia de pulso (latidos por minuto)	Placebo	67,3	67,9	.
	Activo	68,1	68,1	.
Frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)	Placebo	14,0	14,0	.
	Activo	13,7	13,7	.
Temperatura oral (grados Fahrenheit)	Placebo	98,6	98,6	.
	Activo	98,4	98,5	.
Valores expresados como media ± desviación estándar *el valor p se estima a partir de la prueba t pareada				

Tabla 16

Parámetro de laboratorio	Visita	Placebo	Activo	Intervalo normal
Alanina aminotransferasa (UI/L)	Inicial	30,5 ± 16,81	34,7 ± 24,62	0 a 41
	Visita final	34,3 ± 11,87	30,3 ± 8,63	
Fosfatasa alcalina (IU/L)	Inicial	79,5 ± 16,25	77,4 ± 23,25	53 a 128
	Visita final	101,8 ± 32,50	106,5 ± 24,26	
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	Inicial	36,9 ± 20,32	33,1 ± 32,16	0 a 40
	Visita final	38,6 ± 22,40	30,2 ± 10,44	
Cloruro	Inicial	-1,0 ± 0,00	-1,0 ± 0,00	
	Visita final	100,2 ± 2,08	100,2 ± 1,72	
Potasio	Inicial	-1,0 ± 0,00	-1,0 ± 0,00	
	Visita final	4,2 ± 0,35	4,4 ± 0,33	
Creatinina sérica (mg %)	Inicial	0,9 ± 0,08	0,9 ± 0,13	0,6 a 1,4
	Visita final	0,9 ± 0,13	0,8 ± 0,13	
Sodio (mEq/L)	Inicial	-1,0 ± 0,00	-1,0 ± 0,00	136 a 145
	Visita final	138,3 ± 2,15	139,5 ± 2,44	
Bilirrubina total (mg/dL)	Inicial	0,8 ± 0,19	1,2 ± 1,62	0,1 a 1,2
	Visita final	0,8 ± 0,22	0,8 ± 0,24	
Ácido úrico	Inicial	-1,0 ± 0,00	-1,0 ± 0,00	
	Visita final	4,4 ± 0,58	4,9 ± 0,73	
Nitrógeno ureico en sangre (mg/dL)	Inicial	12,3 ± 3,38	10,7 ± 1,66	5,0 a 24
	Visita final	11,1 ± 2,69	10,9 ± 1,85	
Azúcar en sangre en ayunas (mg/dL)	Inicial	99,1 ± 2,54	106,2 ± 3,89	70 a 110
	Visita final	104,2 ± 2,99	120,4 ± 9,48	
Valores expresados como media ± desviación estándar				

Tabla 17

Parámetro de laboratorio	Visita	Placebo	Activo	Intervalo normal
Recuento de eritrocitos (RBC) (*10^6 células)	Inicial	4,3 ± 0,47	4,4 ± 0,34	4,0 a 6,5
	Visita final	4,3 ± 0,54	4,4 ± 0,33	
Hematocrito (%)	Inicial	37,5 ± 5,37	36,7 ± 5,80	40 a 50
	Visita final	39,5 ± 6,32	37,2 ± 3,11	
Hemoglobina (gm %)	Inicial	12,8 ± 2,03	12,1 ± 1,77	11 a 16
	Visita final	13,6 ± 2,29	12,4 ± 1,57	
Recuento de leucocitos (WBC) (células/mm3)	Inicial	8.893,3 ± 2.189,09	9.980,0 ± 1.607,22	4.000 a 11.000
	Visita final	9.033,3 ± 2.371,55	9.330,8 ± 2.146,46	
Recuento de plaquetas (*10^5 por mm3)	Inicial	4,0 ± 0,70	4,2 ± 0,72	1,5 a 4,5
	Visita final	3,7 ± 0,90	3,8 ± 0,79	
Linfocitos (%)	Inicial	31 ± 0,06	30 ± 0,06	25 a 40
	Visita final	29 ± 0,06	30 ± 0,06	
Monocitos (%)	Inicial	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0 a 10
	Visita final	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	
Neutrófilos (%)	Inicial	59 ± 0,05	61 ± 0,06	40 a 75
	Visita final	61 ± 0,06	63 ± 0,07	
Basófilos (%)	Inicial	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0 a 1
	Visita final	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	
Eosinófilos (%)	Inicial	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0 a 7
	Visita final	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	
Valores expresados como media ± desviación estándar				

Tabla 18

Parámetro	Placebo		Activo		valor de p	IC del 95 %
	Inicial	Visita 5	Inicial	Visita 5		
Colesterol total (mg/dL)	218,5 ± 13,17	218,8 ± 14,29	219,4 ± 16,29	182,4 ± 10,27	<0,01	-43,83 , -29,84
Triglicéridos (mg/dL)	182,3 ± 17,28	181,8 ± 16,88	182,3 ± 30,84	171,2 ± 24,93	0,0011	-16,40 , -4,724
Lipoproteína de baja densidad (mg/dL)	168,8 ± 19,13	167,9 ± 17,78	173,5 ± 19,89	159,3 ± 19,61	<0,01	-17,34 , -8,542
Lipoproteína de alta densidad (mg/dL)	42,4 ± 2,43	42,8 ± 2,72	40,9 ± 3,70	64,4 ± 3,65	<0,01	19,468 , 24,759
Lipoproteína de muy baja densidad (mg/dL)	46,8 ± 10,19	44,4 ± 13,30	47,9 ± 11,39	33,9 ± 7,21	0,0018	-17,82, -4,641
*Los sujetos que completaron la visita final se consideraron para este análisis						

En otro aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para reducir la obesidad en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga el 5 % de los estilbenos totales para lograr los efectos de

reducción del peso corporal, índice de masa corporal y circunferencia de la cintura. En un aspecto más específico, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga el 5 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol y sus dímeros. En aspectos aún más específicos, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga el 5 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol, escirpusina A y escirpusina B.

En otro aspecto más preferido, la presente memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para tratar la hipercolesterolemia en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus* rotundus estandarizado para que contenga el 5 % de los estilbenos totales para lograr los efectos de (a) reducción en los niveles sistémicos de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos séricos y (b) mejora en los niveles sistémicos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En un aspecto más específico, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga el 5 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol y sus dímeros. En aspectos aún más específicos, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga el 5 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol, escirpusina A y escirpusina B.

Como aspecto ilustrativo adicional, la presente memoria descriptiva se refiere a un procedimiento para reducir la obesidad en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales para lograr los efectos de reducción del peso corporal, índice de masa corporal y circunferencia de la cintura. En un aspecto más específico, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol y sus dímeros. En aspectos aún más específicos, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol, escirpusina A y escirpusina B.

Como ejemplo ilustrativo adicional, la presente memoria descriptiva también se refiere a un procedimiento para tratar la hipercolesterolemia en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus* rotundus estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales para lograr los efectos de (a) reducción en los niveles sistémicos de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos séricos y (b) mejora de los niveles sistémicos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En un aspecto más específico, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol y sus dímeros. En aspectos aún más específicos, la composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales consiste esencialmente en piceatanol, escirpusina A y escirpusina B.

Si bien se han divulgado en aspectos preferidos, el ámbito de la invención debe interpretarse únicamente junto con las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga 5 % de los estilbenos totales para su uso en un procedimiento de reducción de la obesidad en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la epata de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día la composición para lograr los efectos de reducción del peso corporal, índice de masa corporal y circunferencia de la cintura.

2. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga 5 % de los estilbenos totales para su uso en un procedimiento de tratamiento de la hipercolesterolemia en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día la composición para lograr los efectos de (a) reducción de los niveles sistémicos de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos séricos y (b) mejora de los niveles sistémicos de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

3. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga 5 % de los estilbenos totales para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la composición consiste esencialmente en piceatanol y dímeros del mismo.

4. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga 5 % de los estilbenos totales para su uso en los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 3 en el que la composición consiste esencialmente en una combinación de piceatanol, escirpusina B y escirpusina A.

5. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales para su uso en un procedimiento de reducción de la obesidad en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día la composición para lograr los efectos de reducción del peso corporal, índice de masa corporal y circunferencia de la cintura.

6. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales para su uso en un procedimiento de tratamiento de la hipercolesterolemia en seres humanos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar a dichos seres humanos por vía oral dos veces al día la composición para lograr los efectos de (a) reducción de los niveles sistémicos de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos séricos y (b) mejora de los niveles sistémicos de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

7. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales para su uso en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la composición consiste esencialmente en piceatanol y dímeros del mismo.

8. Composición que comprende la fracción de acetato de etilo del extracto de rizomas de *Cyperus rotundus* estandarizado para que contenga más del 3 % de los estilbenos totales para su uso en los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la composición consiste esencialmente en una combinación de piceatanol, escirpusina B y escirpusina A.

Figura 1

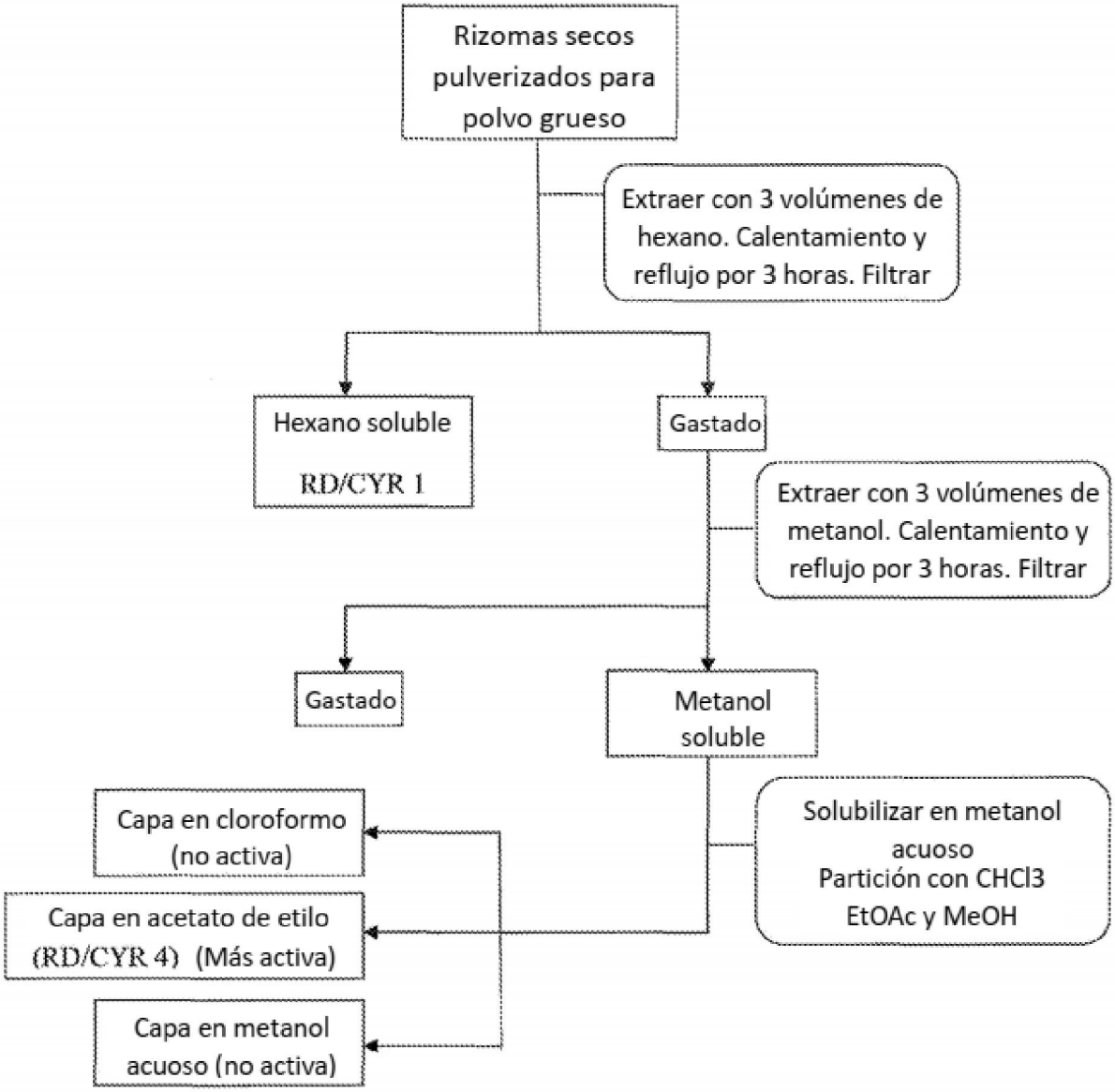

Rizomas secos pulverizados para polvo grueso
Extraer con 3 volúmenes de hexano. Calentamiento y reflujo por 3 horas. Filtrar
Hexano soluble
RD/CYR 1
Gastado
Extraer con 3 volúmenes de metanol. Calentamiento y reflujo por 3 horas. Filtrar
Gastado
Metanol soluble
Solubilizar en metanol acuoso
Partición con CHCl3
EtOAc y MeOH
Capa en cloroformo (no activa)
Capa en acetato de etilo (RD/CYR 4) (Más activa)
Capa en metanol acuoso (no activa)

Figura 2

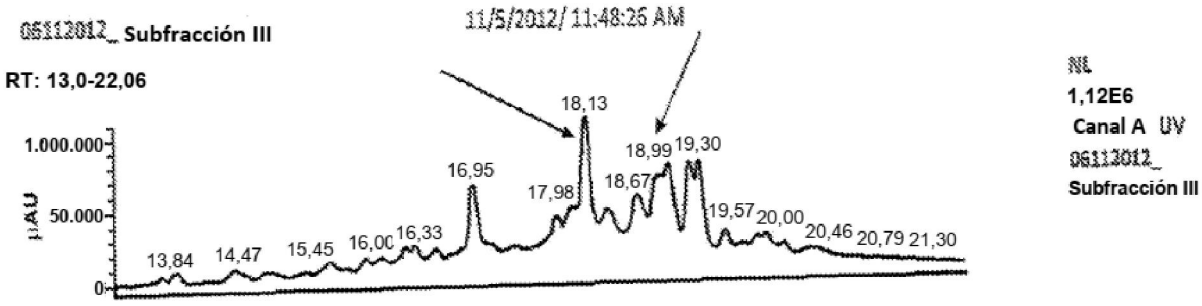

06112012_ Subfracción III
RT: 13,0-22,06
11/5/2012/ 11:48:26 AM
1.000.000
50.000
0
µAU
13,84
14,47
15,45
16,00
16,33
16,95
17,98
18,13
18,67
18,99
19,30
19,57
20,00
20,46
20,79
21,30
NL
1,12E6
Canal A UV
06112012_
Subfracción III

Figura 2a

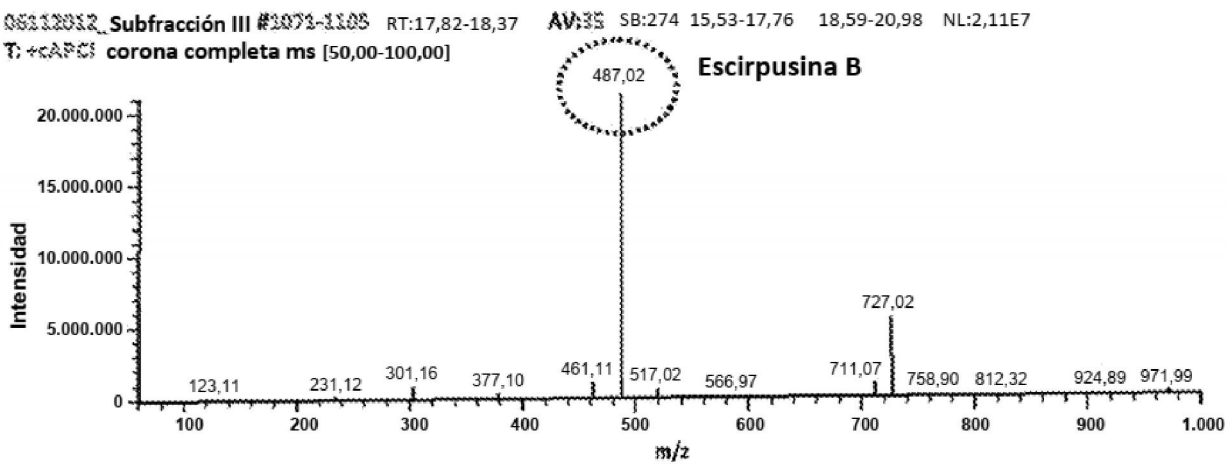

Subfracción III RT:17,82-18,37 SB:274 15,53-17,76 18,59-20,98 NL:2,11E7
corona completa ms [50,00-100,00]
Escirpusina B
487,02
727,02
Intensidad
20.000.000
15.000.000
10.000.000
5.000.000
0
123,11
231,12
301,16
377,10
461,11
517,02
566,97
711,07
758,90
812,32
924,89
971,99
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1.000
m/z

Figura 2b

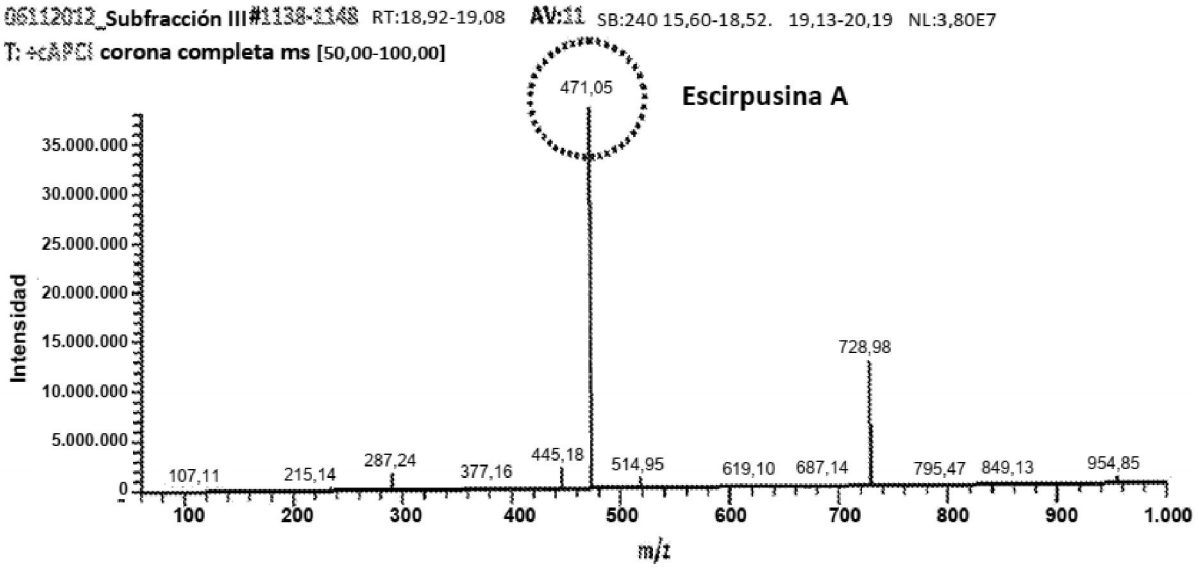

06112012_Subfracción III#1138-1148 RT:18,92-19,08 AV:11 SB:240 15,60-18,52. 19,13-20,19 NL:3,80E7
T: +cAPCI corona completa ms [50,00-100,00]
Escirpusina A
471,05
728,98
Intensidad
35.000.000
30.000.000
25.000.000
20.000.000
15.000.000
10.000.000
5.000.000
0
107,11
215,14
287,24
377,16
445,18
514,95
619,10
687,14
795,47
849,13
954,85
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1.000
m/z

Figura 3

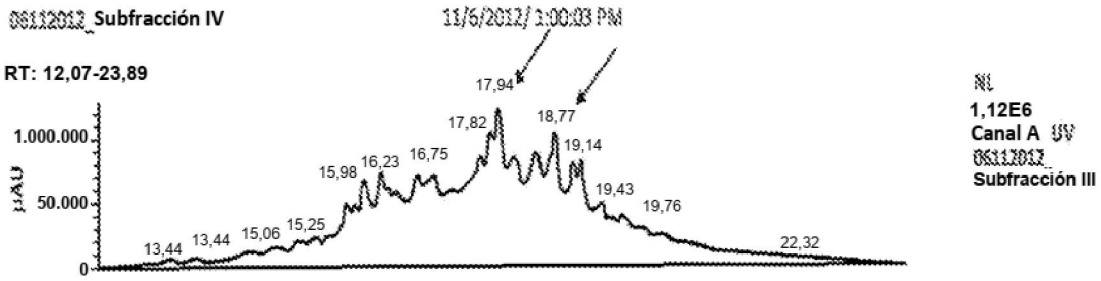

06112012_Subfracción IV
11/6/2012/ 1:00:03 PM
RT: 12,07-23,89
17,94
18,77
17,82
19,14
16,23
16,75
15,98
19,43
19,76
15,25
15,06
13,44
13,44
22,32
1.000.000
50.000
0
µAU
NL
1,12E6
Canal A UV
06112012_
Subfracción III

Figura 3a

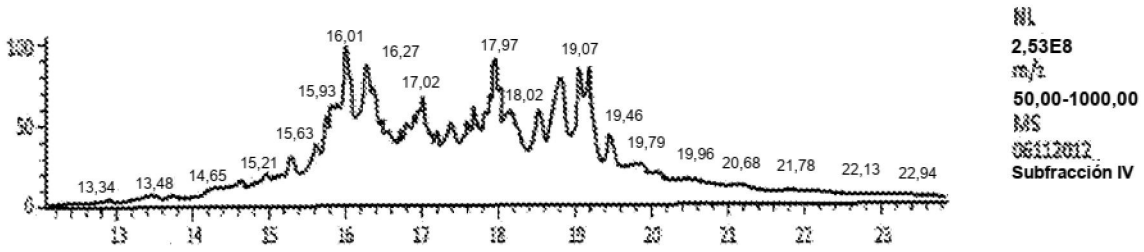

100
50
0
13,34
13,48
14,65
15,21
15,63
15,93
16,01
16,27
17,02
17,97
18,02
19,07
19,46
19,79
19,96
20,68
21,78
22,13
22,94
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
BI
2,53E8
m/z
50,00-1000,00
MS
06112012
Subfracción IV

Figura 3b

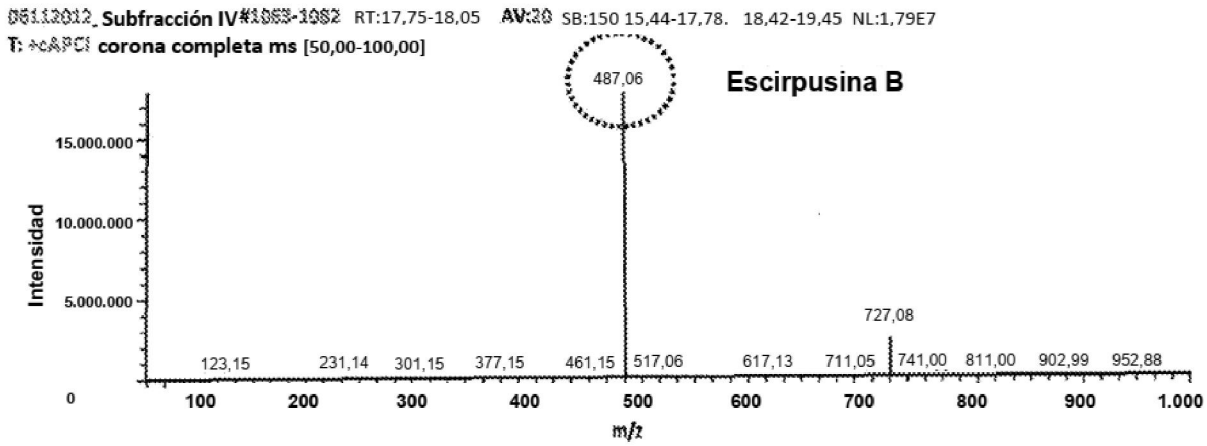

Subfracción IV RT:17,75-18,05 SB:150 15,44-17,78. 18,42-19,45 NL:1,79E7
corona completa ms [50,00-100,00]
Escirpusina B
487,06
727,08
123,15
231,14
301,15
377,15
461,15
517,06
617,13
711,05
741,00
811,00
902,99
952,88
Intensidad
15.000.000
10.000.000
5.000.000
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1.000
m/z

Figura 3c

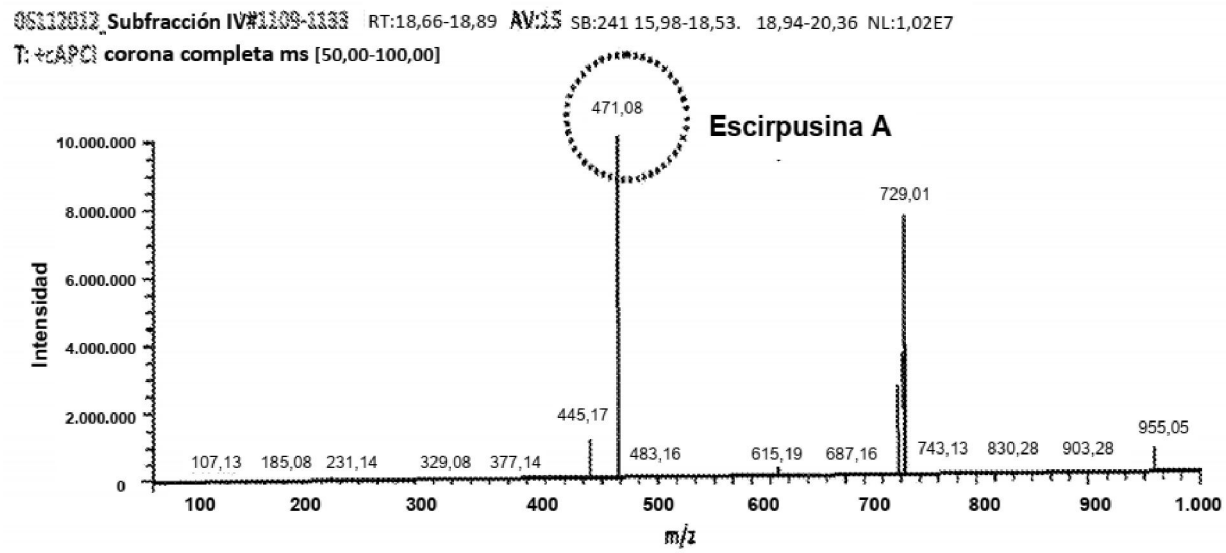

Subfracción IV#1109-1133 RT:18,66-18,89 AV:15 SB:241 15,98-18,53. 18,94-20,36 NL:1,02E7
T: +cAPCI corona completa ms [50,00-100,00]
Escirpusina A
471,08
729,01
445,17
955,05
107,13
185,08
231,14
329,08
377,14
483,16
615,19
687,16
743,13
830,28
903,28
Intensidad
10.000.000
8.000.000
6.000.000
4.000.000
2.000.000
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1.000
m/z

Figura 4

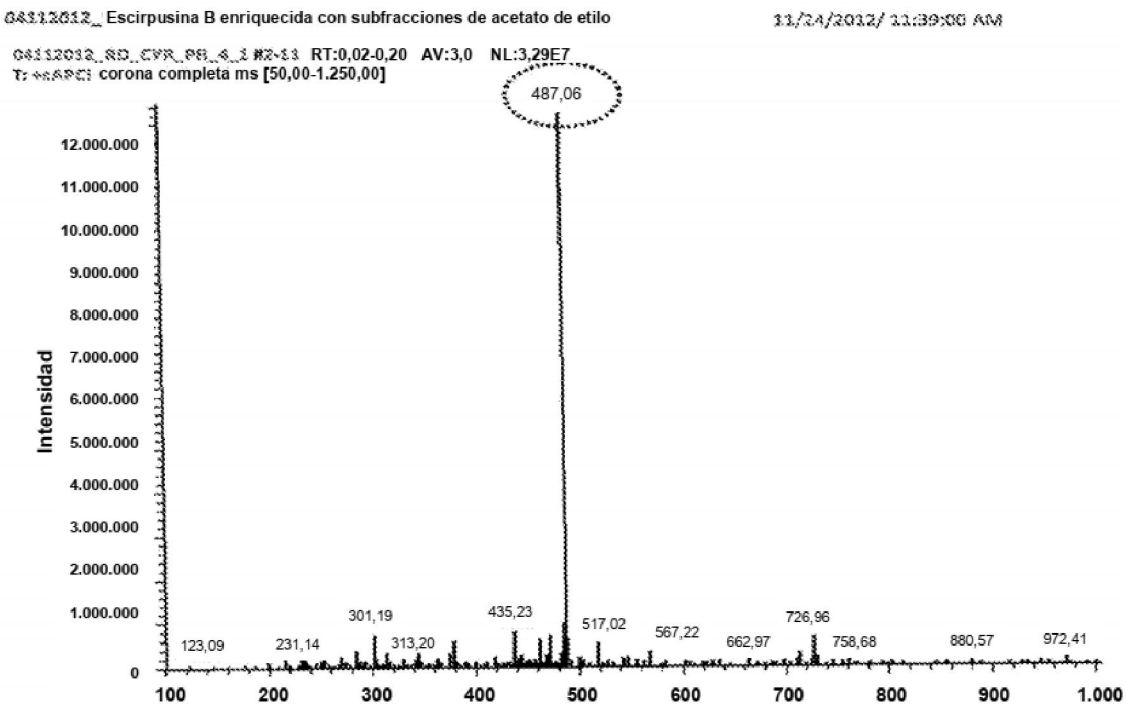

04112012_ Escirpusina B enriquecida con subfracciones de acetato de etilo
11/24/2012/ 11:39:00 AM
RT:0,02-0,20 AV:3,0 NL:3,29E7
corona completa ms [50,00-1.250,00]
Intensidad
12.000.000
11.000.000
10.000.000
9.000.000
8.000.000
7.000.000
6.000.000
5.000.000
4.000.000
3.000.000
2.000.000
1.000.000
0
487,06
301,19
435,23
517,02
726,96
123,09
231,14
313,20
567,22
662,97
758,68
880,57
972,41
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1.000

Figura 5

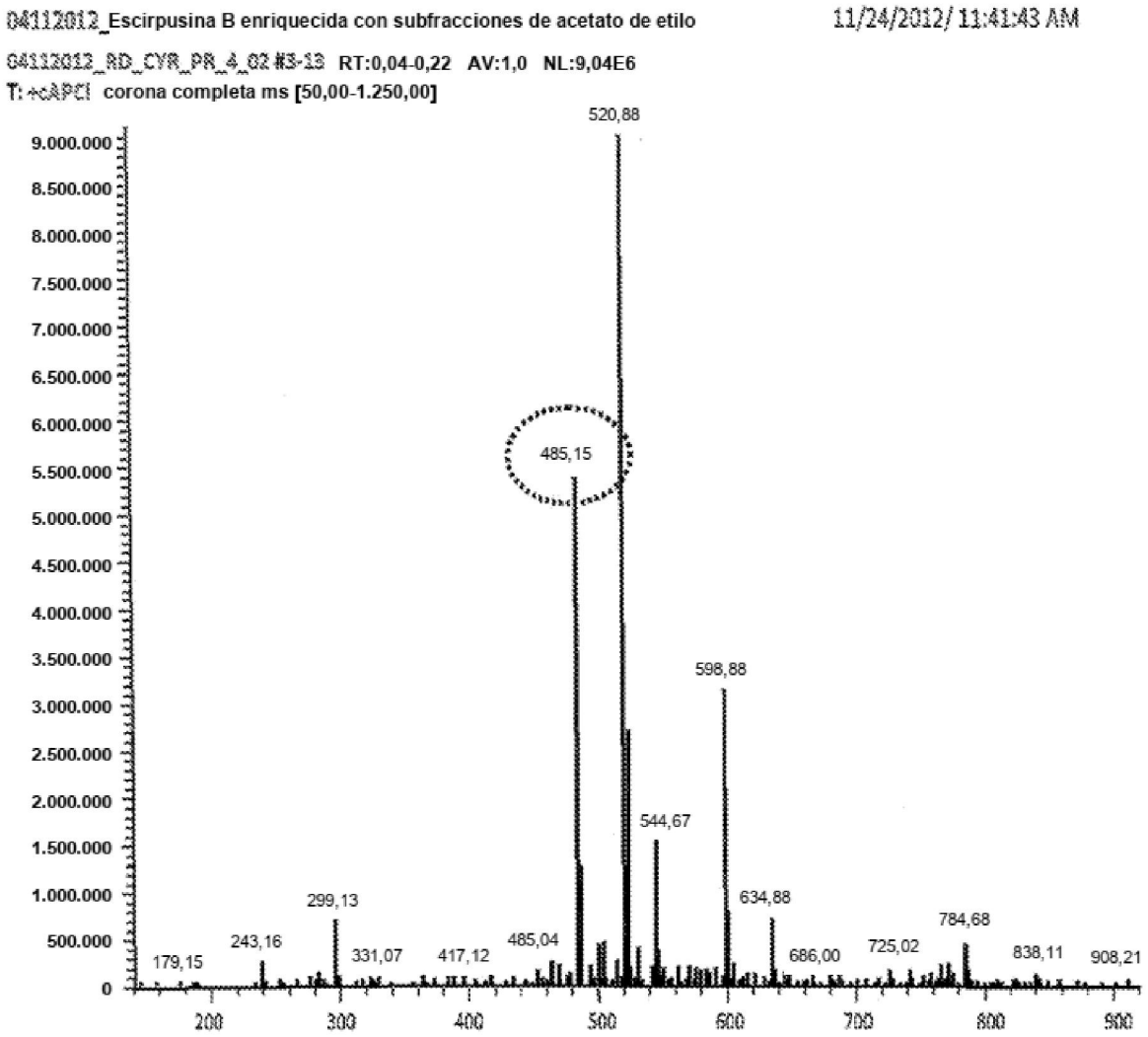

041112012_Escirpusina B enriquecida con subfracciones de acetato de etilo
11/24/2012/ 11:41:43 AM
041112012_RD_CYR_PR_4_02 #3-13 RT:0,04-0,22 AV:1,0 NL:9,04E6
T: +cAPCI corona completa ms [50,00-1.250,00]
520,88
485,15
598,88
544,67
634,88
299,13
784,68
243,16
485,04
725,02
838,11
179,15
331,07
417,12
686,00
908,21
9.000.000
8.500.000
8.000.000
7.500.000
7.000.000
6.500.000
6.000.000
5.500.000
5.000.000
4.500.000
4.000.000
3.500.000
3.000.000
2.500.000
2.000.000
1.500.000
1.000.000
500.000
0
200
300
400
500
600
700
800
900

Figura 6

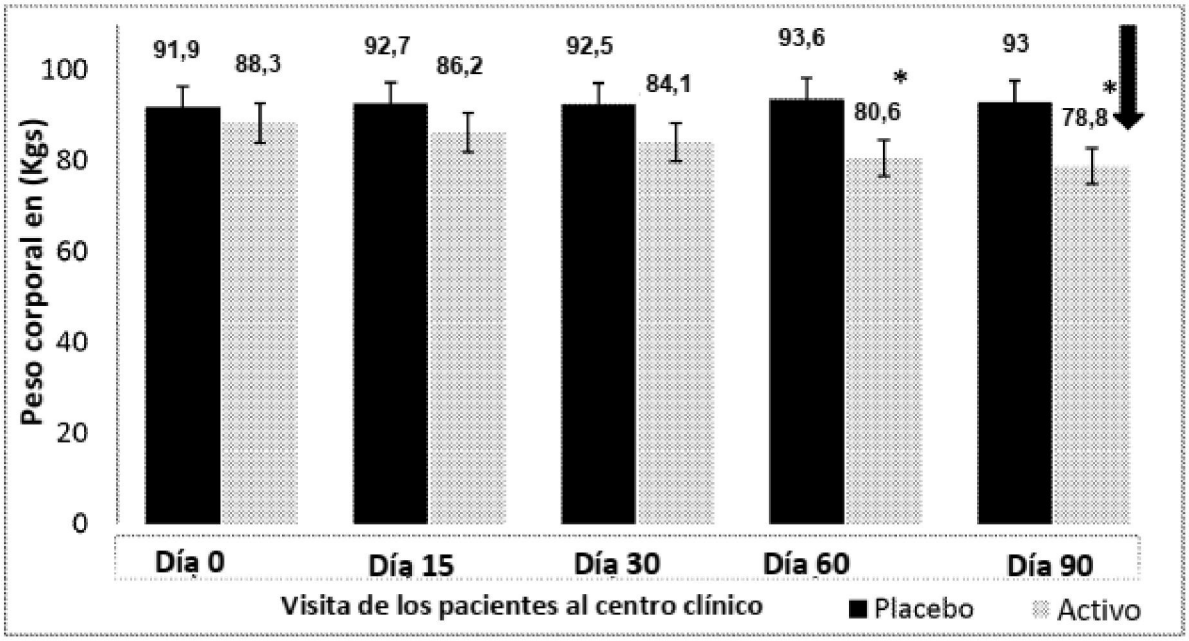


Figura 6a

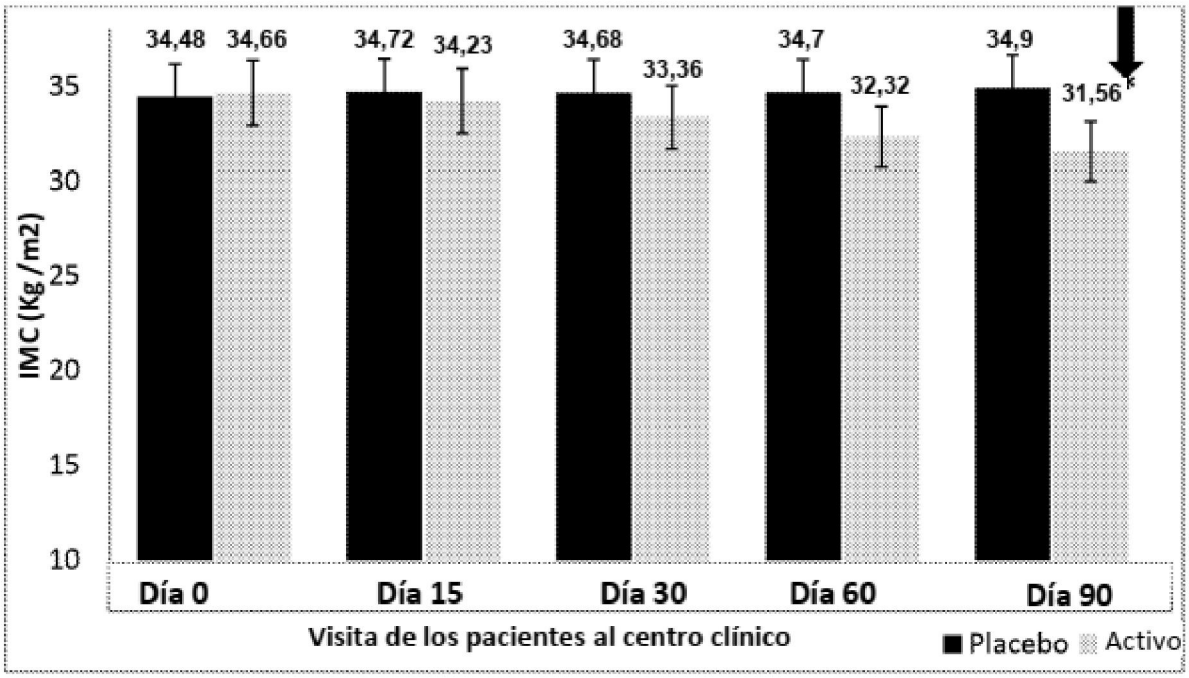


Figura 6b

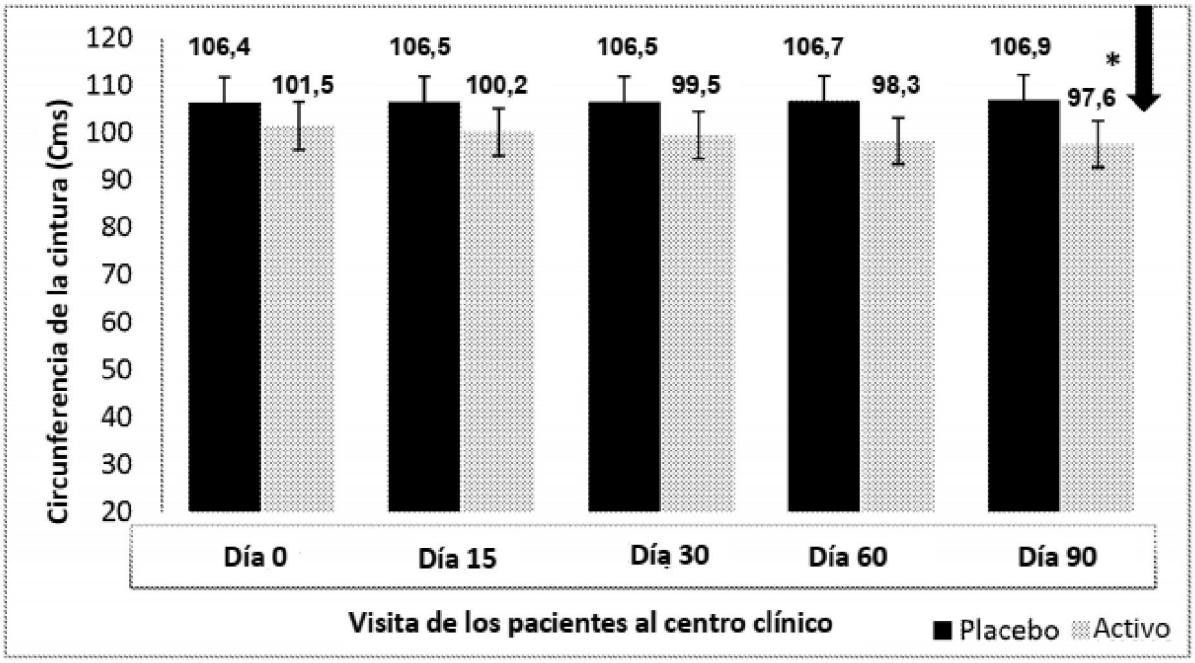
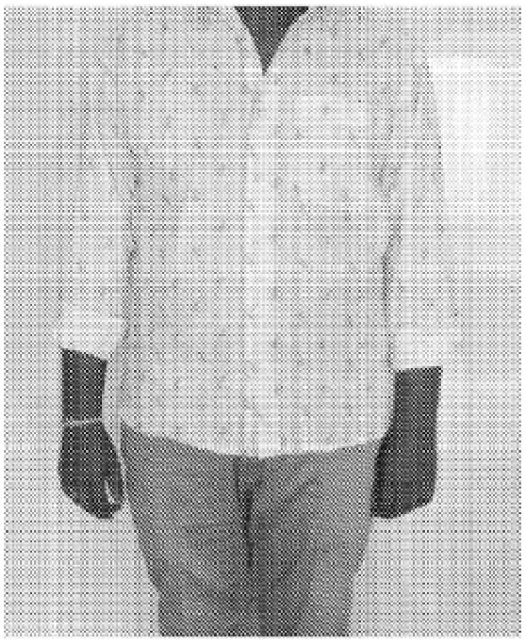

120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
Circunferencia de la cintura (Cms)
106,4
101,5
106,5
100,2
106,5
99,5
106,7
98,3
106,9
97,6
*
Día 0
Día 15
Día 30
Día 60
Día 90
Visita de los pacientes al centro clínico
Placebo
Activo

Figura 7

Sujeto 001- Pre tratamiento



Sujeto 001- Post tratamiento

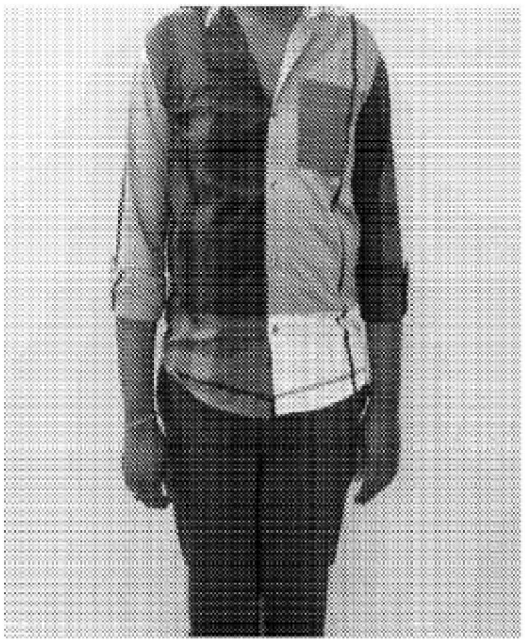
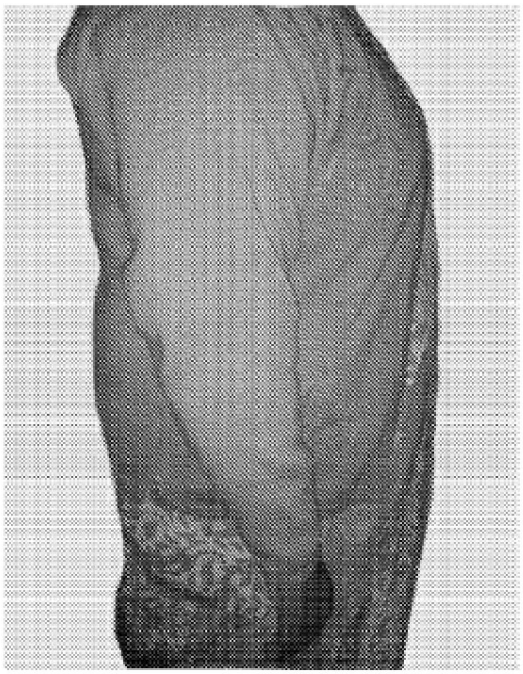


Figura 8a

Sujeto 016- Pre tratamiento



Sujeto 016- Post tratamiento

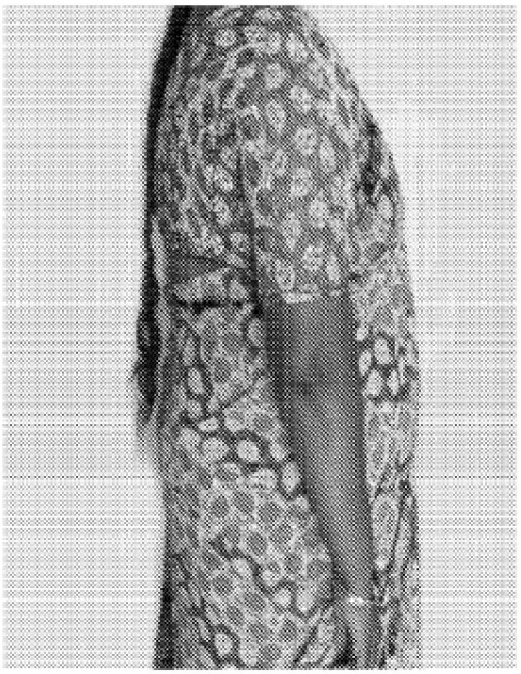


Figura 8b

Sujeto 024- Pre tratamiento



Sujeto 024- Post tratamiento

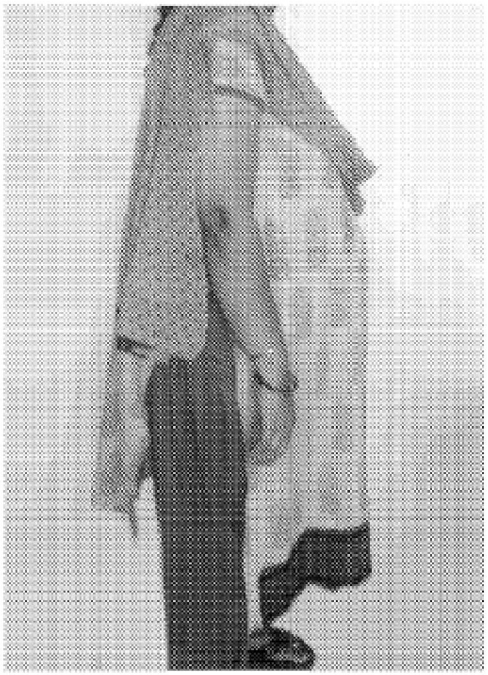


Figura 8c

Sujeto 030- Pre tratamiento



Sujeto 030- Post tratamiento

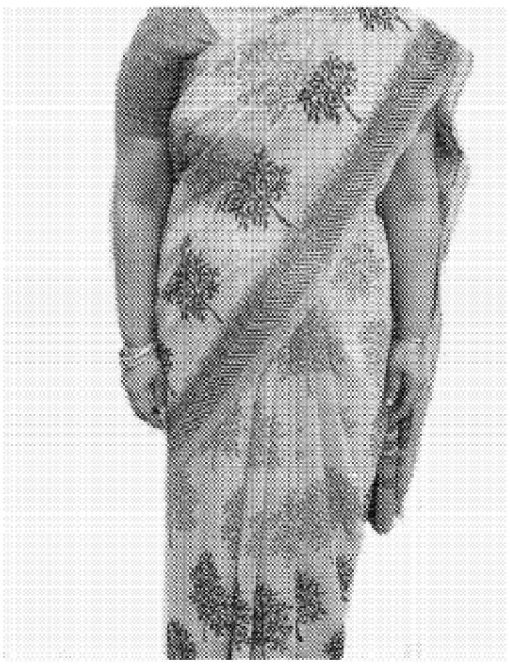


Figura 9a

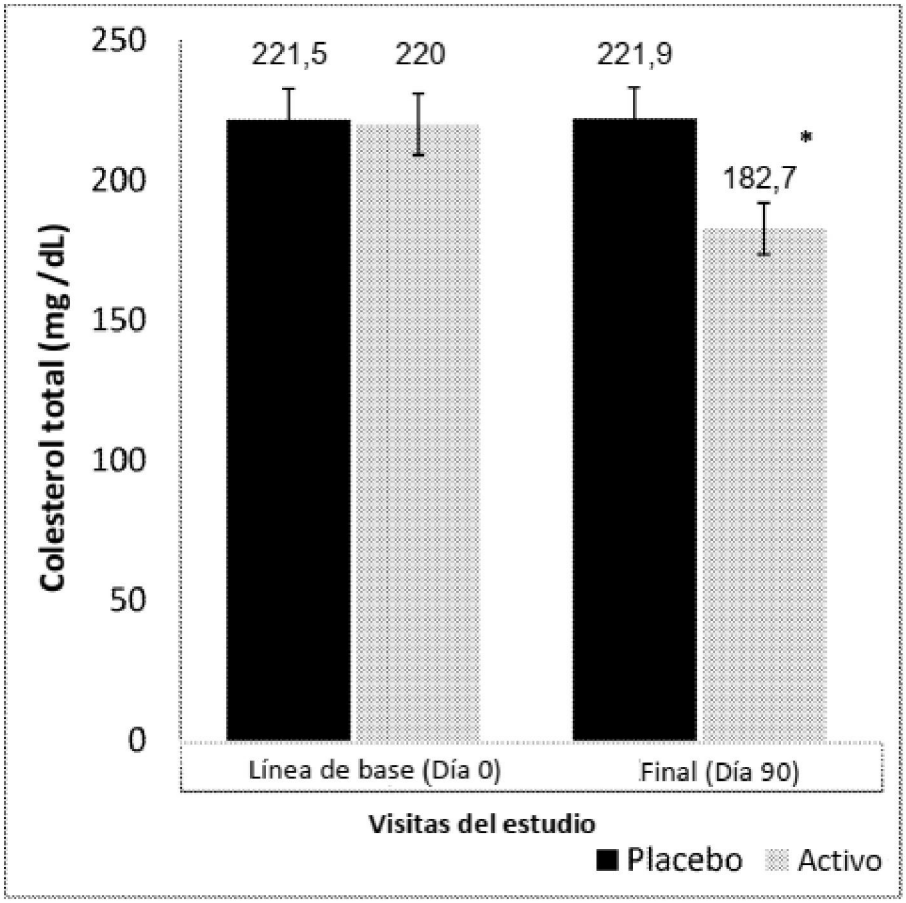

250
200
150
100
50
0
Colesterol total (mg /dL)
221,5
220
221,9
182,7
*
Línea de base (Día 0)
Final (Día 90)
Visitas del estudio
Placebo
Activo

Figura 9b

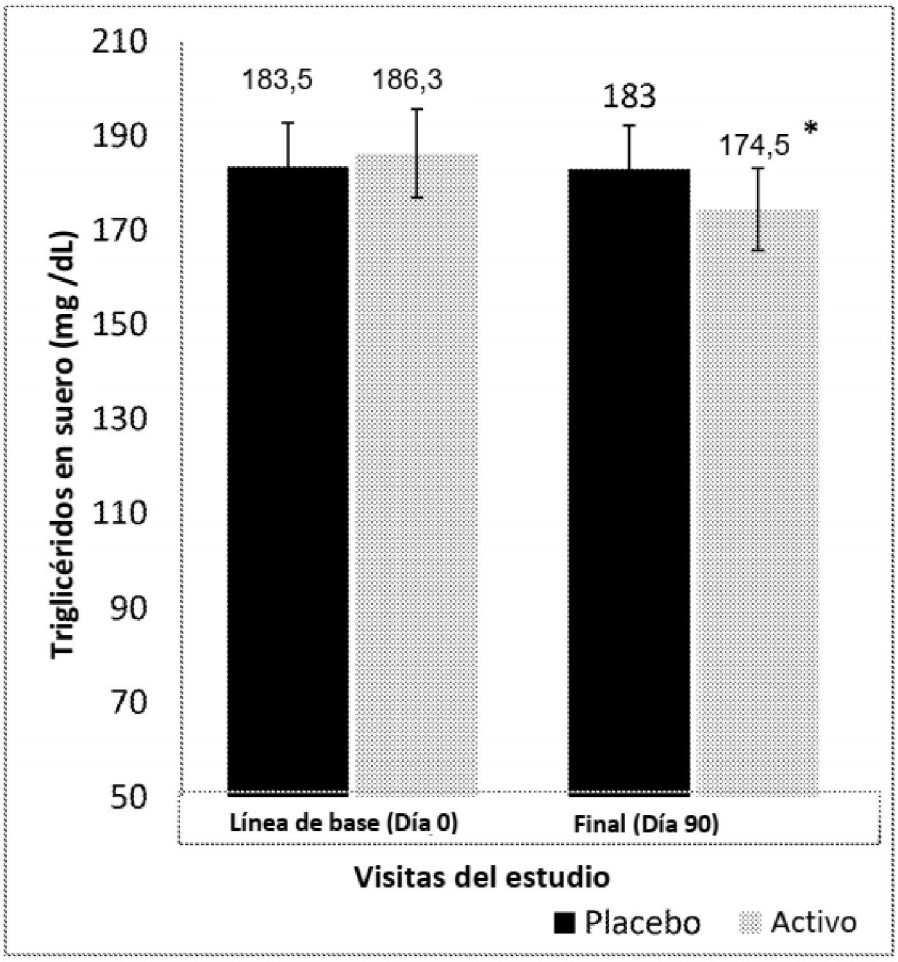

210
190
170
150
130
110
90
70
50
Triglicéridos en suero (mg /dL)
183,5
186,3
183
174,5
*
Línea de base (Día 0)
Final (Día 90)
Visitas del estudio
Placebo
Activo

Figura 9c

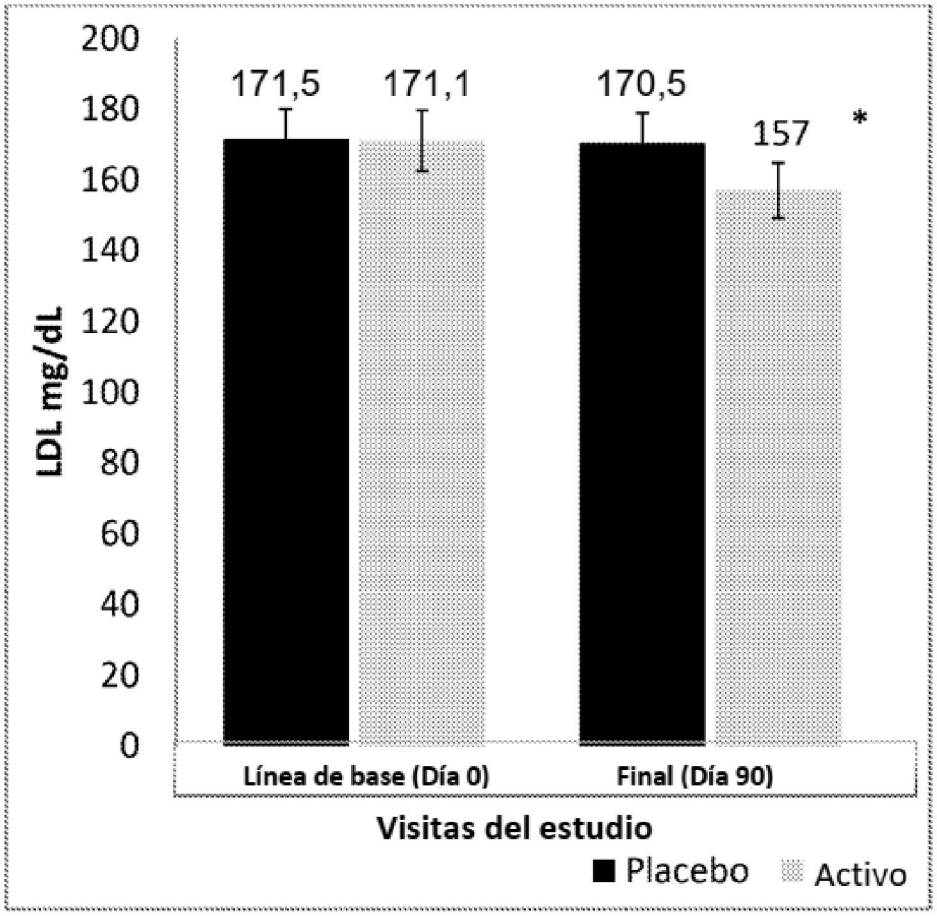

200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
LDL mg/dL
171,5
171,1
170,5
157
*
Línea de base (Día 0)
Final (Día 90)
Visitas del estudio
Placebo
Activo

Figura 9d

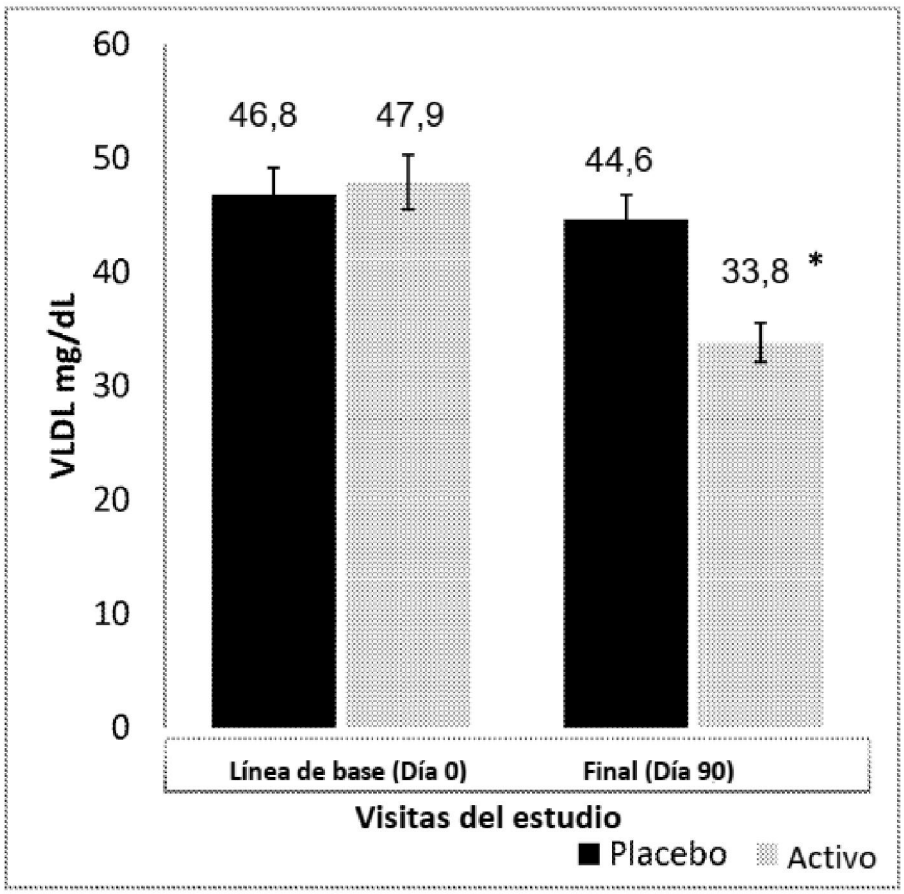
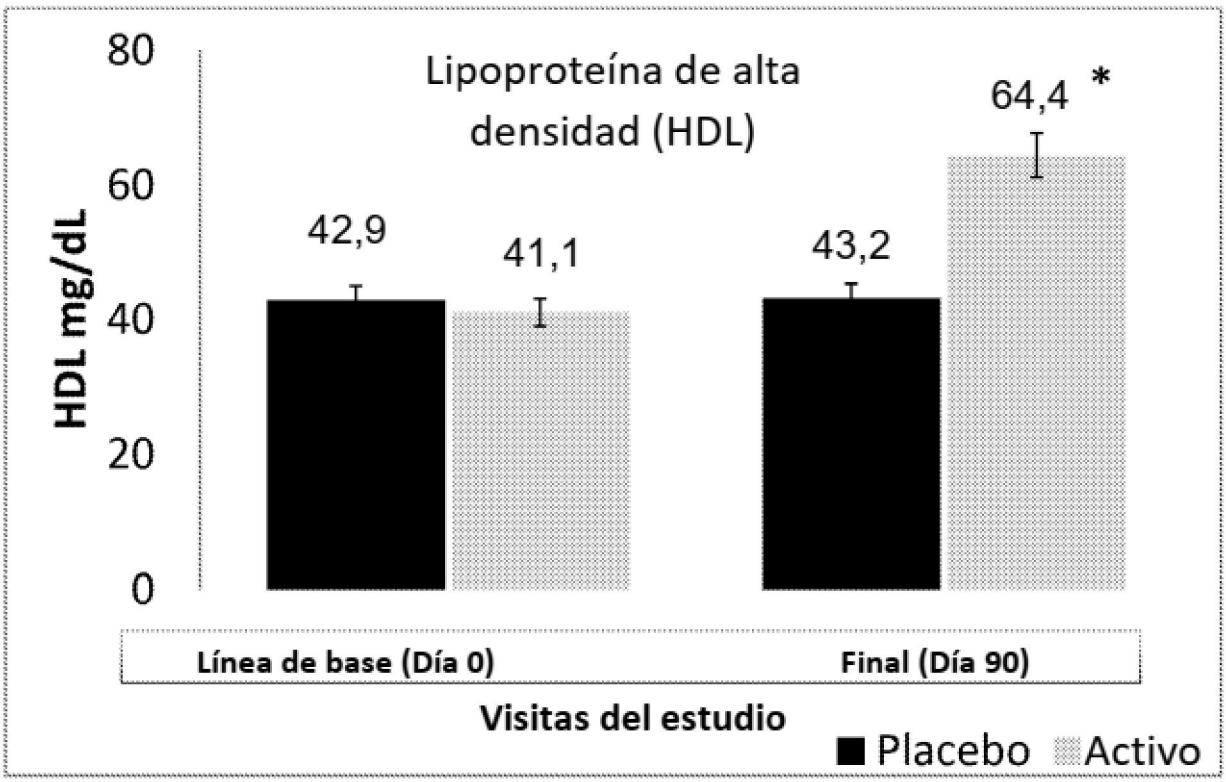

60
50
40
30
20
10
0
VLDL mg/dL
46,8
47,9
44,6
33,8
*
Línea de base (Día 0)
Final (Día 90)
Visitas del estudio
Placebo
Activo

Figura 9e


Lipoproteína de alta densidad (HDL)
HDL mg/dL
80
60
40
20
0
42,9
41,1
43,2
64,4
*
Línea de base (Día 0)
Final (Día 90)
Visitas del estudio
Placebo
Activo