

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA METABOLISMO MUSCULAR MEJORADO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud
5 de patente estadounidense n.º de serie: 14/612,973,
presentada el 3 de febrero de 2015, en adelante incorporada
mediante referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente descripción proporciona composiciones y métodos
para aumentar la síntesis de proteínas musculares, reducir la
proteólisis muscular, aumentar la fuerza y/o masa muscular y
mejorar el rendimiento deportivo aeróbico/anaeróbico. Las
composiciones útiles incluyen, de modo no taxativo, extractos
15 de *Rhaponticum* y *Rhodiola* y combinaciones de estos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención incluye una composición que
incluye un extracto de *Rhaponticum*. En algunas modalidades,
20 el extracto de *Rhaponticum* comprende ecdisteroides a al menos
0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %,
1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que
incluye, por ejemplo, ecdisteroides a alrededor de 0.1 a 10 %
o ecdisteroides a alrededor de 0.4 % a 5 %. En algunas

modalidades, la composición de extracto de *Rhaponticum* comprende 20-hidroxiecdisona a al menos 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0,75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por
5 ejemplo, 20-hidroxiecdisona al 0.1 % a 5.0 %.

En otro aspecto, la invención incluye una composición que incluye un extracto de *Rhodiola*. En algunas modalidades, el extracto de *Rhodiola* comprende salidrosidias a al menos 0.5 %, 10 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, alrededor de 1 % a 4 %. En algunas modalidades, el extracto de *Rhodiola* comprende rosavinas a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por
15 ejemplo, rosavinas a alrededor de 0.5 % a 10 % o 3 % a 6 %.

En algunas modalidades, la composición comprende rosavina a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, rosavina a alrededor de 0.5 a 10 % o rosavina al 1 %
20 a 5 %. En algunas modalidades, la composición de extracto de *Rhodiola* comprende extracto de *Rhodiola* a al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, lo que incluye, por ejemplo, extracto de *Rhodiola* a alrededor de 50 % a 99 %, 60 % - 95 %, 70 % - 95 %.

En un aspecto, la invención incluye una composición que incluye un extracto de *Rhaponticum* y un extracto de *Rhodiola*. En algunas modalidades, el extracto de *Rhaponticum* comprende

5 ecdisteroides a al menos 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, ecdisteroides a alrededor de 0.1 a 10 % o ecdisteroides a alrededor de 0.4 % a 5 %. En algunas modalidades, la composición comprende 20-

10 hidroxiecdisona a al menos 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0,75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, 20-hidroxiecdisona al 0.1 % a 5.0 %.

15 En algunas modalidades, el extracto de *Rhodiola* comprende salidrosidias a al menos 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, alrededor de 1 % a 4 %. En algunas modalidades, la composición comprende rosavinas a al menos 0.1 %, 0.2 %, 20 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, rosavinas a alrededor de 3 % a 6 %. En algunas modalidades, la composición comprende rosavina a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %,

7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, rosavina a alrededor de 2 % a 5 %.

En algunas modalidades, la composición comprende extracto de *Rhodiola* a al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, lo que incluye, por ejemplo, extracto de *Rhodiola* a alrededor de 50 % a 99 %, 60 % - 95 %, 70 % - 95 %.

En otro aspecto, la invención incluye composiciones que tienen (i) ecdisteroides a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, ecdisteroides a alrededor de 0.1 a 10 % o ecdisteroides a alrededor de 0.4 % a 5 % y (ii) salidrosidinas a al menos 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, alrededor de 1 % a 4 %. En algunas modalidades, la composición comprende 20-hidroxiecdisona a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, 20-hidroxiecdisona al 0.1 % a 5.0 %. En algunas modalidades, la composición comprende rosavinas a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, rosavinas

a alrededor de 3 % a 6 %. En algunas modalidades, la composición comprende rosavina a al menos 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %, lo que incluye, por ejemplo, rosavina a
5 alrededor de 2 % a 5 %.

En otras modalidades, cualquiera de las composiciones que anteceden puede incluirse en una formulación farmacéutica. La composición puede formularse en cualquier formulación
10 adecuada y conveniente en función de la vía de administración que se pretenda. Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, jarabes o elixires. Opcionalmente, la composición contiene además un
15 portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, u otro ingrediente farmacéuticamente activo o no activo.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos para aumentar la síntesis de proteínas, aumentar la fuerza muscular y/o
20 reducir la proteólisis de proteínas en un sujeto al administrarle al sujeto cualquiera de las composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente. Aspectos adicionales incluyen métodos para tratar afecciones asociadas con la atrofia muscular, o caracterizadas por esta, en un

sujeto al administrarle al sujeto cualquiera de las composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente. La composición o formulación puede administrarse al sujeto mediante cualquier vía de administración adecuada. En una modalidad, la composición se administra de forma oral. En algunas modalidades, se le administra al sujeto una dosis diaria de al menos 1 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, 75 mg/kg/día, 100 mg/kg/día, 200 mg/kg/día, 400 mg/kg/día, 600 mg/kg/día, 800 mg/kg/día, 1000 mg/kg/día, 2000 mg/kg/día, 3000 mg/kg/día, 5000 mg/kg/día o más por día. En una modalidad, la formulación oral es de alrededor de 30-1000 mg/kg/día. En otra modalidad, la formulación oral es de alrededor de 50-100 mg/kg/día, alrededor de 5-50 mg/kg/día, o menos de 200 mg/kg/día. En modalidades adicionales, la formulación oral puede ser de alrededor de 200-500 mg/día, o alrededor de 50-2000 mg/día. La dosis diaria total puede administrarse como dosificación unitaria o dividirse en múltiples dosificaciones administradas en momentos diferentes (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más veces por día).

En diversas modalidades, la dosificación puede modificarse en función del tipo de sujeto y/o la masa del sujeto. Por

ejemplo, en algunas modalidades, una dosificación adecuada para un sujeto humano puede ser 50-2000 mg/día o 200-500 mg/día. En algunas modalidades, una dosificación conveniente para un sujeto humano o un sujeto rumiante puede ser 5-50 mg/kg/día o menos de 200 mg/kg/día.

En algunas modalidades, un sujeto puede tratarse para afecciones que incluyen sarcopenia, obesidad sarcopénica, cáncer, esclerosis múltiple, distrofia muscular, fractura ósea que requiera inmovilización (por ejemplo, férula o yeso), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), neuropatía periférica, apoplejía o caquexia. Los sujetos pueden tener, o diagnosticárseles, dicha afección y dicha afección puede ser idiopática o secundaria a otra afección. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero, que incluye, por ejemplo, un humano o un animal (por ejemplo, canino, felino, ovino, bovino, rumiante, etc.). Por consiguiente, en diversas modalidades, las composiciones descritas en la presente pueden utilizarse en alimentos, productos de piensos o suplementos nutricionales para humanos o animales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1a es una gráfica de los compuestos fenólicos totales identificados en el extracto del Ejemplo 11.

La Figura 1b es una gráfica de los ácidos orgánicos totales identificados en el extracto del Ejemplo 11.

5 La Figura 2a es una gráfica de los carbohidratos libres totales identificados en el extracto del Ejemplo 11.

Las Figuras 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b, 7a y 7b son gráficas de barras que representan la determinación de la fosforilación de S6K1 en treonina 389 en miotubos C2C12 después de la incubación con 5 preparaciones diferentes de extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones y con aminoácidos bajos y altos.

15 Las Figuras 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 10b, 11a, 11b, 12a y 12b son gráficas de barras que representan la determinación de la fosforilación de Akt en treonina 308 en miotubos C2C12 después de la incubación con 5 preparaciones diferentes de extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones y con aminoácidos bajos y altos.

Las Figuras 13a, 13b, 14a, 14b, 15a, 15b, 16a, 16b, 17a y 17b son gráficas de barras que representan la determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la

incubación con 5 preparaciones diferentes de extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones y con aminoácidos bajos y altos.

- 5 Las Figuras 18a y 18b son gráficas de barras que representan la determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con extractos de *Rhaponticum* F0 y *Rhodiola* a tres concentraciones.
- 10 Las Figuras 19a, 19b, 20a, 20b y 21 son gráficas de barras que representan la determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con extractos de *Rhaponticum* F0 y *Rhodiola*, solos o en combinación, a dos concentraciones.
- 15 Las Figuras 22a y 22b son gráficas de barras que representan el efecto de los extractos de *Rhaponticum* F0 y *Rhodiola* en la expresión génica de miostatina y atrogina en miotubos C2C12.
- 20 Las Figuras 23a, 23b, 24a y 24b son gráficas de barras que representan el efecto de la coincubación de los extractos de *Rhaponticum* F0 y *Rhodiola* en la expresión génica de miostatina en miotubos C2C12.

Las Figuras 25a, 25b, 26a y 26b son gráficas de barras que representan el efecto de la coincubación de los extractos de *Rhaponticum* F0 y *Rhodiola* en la expresión génica de atrogina en miotubos C2C12.

5

Las Figuras 27a, 27b y 28 son gráficas de barras que representan la determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con diferentes preparaciones de extractos de *Rhaponticum* a dos

10 concentraciones.

La Figura 29a es un diagrama de flujo que representa un proceso de extracción de la raíz de *Rhaponticum*.

15 La Figura 29b es un diagrama de flujo que representa fracciones obtenidas con diferentes solventes.

La Figura 30a es una gráfica de barras que representa el aumento en la fuerza de agarre (en Kg de fuerza) de ratas Wistar en un grupo de control y en un grupo experimental

20 luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

La Figura 30b es una gráfica de barras que representa el

aumento en la fuerza de agarre (en Kg de fuerza / g de peso corporal) de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

5

La Figura 31a es una gráfica de barras que representa el peso (en gramos) del extensor largo de los dedos (EDL, por sus siglas en inglés) de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una
10 composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

La Figura 31b es una gráfica de barras que representa el peso de EDL (en porcentaje del peso corporal total) de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental
15 luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

La Figura 32a es una gráfica de barras que representa el peso del sóleo (en gramos) de ratas Wistar en el grupo de control
20 y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

La Figura 32b es una gráfica de barras que representa el peso del sóleo (como porcentaje del peso corporal total) de ratas

Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

5 La Figura 33a es una gráfica de barras que representa el contenido de proteínas en el extensor largo de los dedos (EDL) de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

10

La Figura 33b es una gráfica de barras que representa el contenido de proteínas en el EDL de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

15

La Figura 34a es una gráfica de barras que representa el contenido de proteínas en el sóleo de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

20

La Figura 34b es una gráfica de barras que representa el contenido de proteínas en el sóleo de ratas Wistar en el grupo de control y en el grupo experimental luego de 42 días de tratamiento con una composición de *Rhaponticum* y *Rhodiola*.

La Figura 35a es un análisis de transferencia Western de la proteína extraída de la muestra del músculo FDP con antipuromicina.

5

La Figura 35b es una gráfica que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el control negativo. * Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p <$

10 0.001.

La Figura 35c es una gráfica que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y las proteínas de suero. * Significativamente

15 diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

La Figura 35d es una gráfica que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el tratamiento de *Rhodiola rosea*. *

20 Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

La Figura 35e es una gráfica que muestra unidades arbitrarias

de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el tratamiento de *Rhaponticum carthamoides*. * Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

5

La Figura 36a es un análisis de transferencia Western de la proteína extraída de la muestra del músculo deltoides con antipuromicina. * Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

10

La Figura 36b es una gráfica que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el control negativo. * Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

15

La gráfica de la Figura 36c muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y las proteínas de suero. * Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

20

La gráfica de la Figura 36d muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el tratamiento de *Rhodiola rosea*. * Significativamente

15

diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente
 $p < 0.001$.

La gráfica de la Figura 36e muestra unidades arbitrarias de
5 niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa
y el tratamiento de *Rhaponticum carthamoides*. *
Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente
diferente $p < 0.001$.

10 La Figura 37a es un análisis de transferencia Western de la
proteína extraída de la muestra del músculo bíceps con
antipuromicina. B:

La Figura 37b es una gráfica que muestra unidades arbitrarias
15 de niveles de puromicina normalizados con la carga
cuantitativa y el control negativo. * Significativamente
diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente
 $p < 0.001$.

20 La Figura 37c es una gráfica que muestra unidades arbitrarias
de niveles de puromicina normalizados con la carga
cuantitativa y las proteínas de suero. * Significativamente
diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente
 $p < 0.001$.

La Figura 37d es una gráfica que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el tratamiento de *Rhodiola rosea*. *

5 Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

La Figura 37e es una gráfica que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga

10 cuantitativa y el tratamiento de *Rhaponticum carthamoides*. * Significativamente diferente $p < 0.05$. * * Significativamente diferente $p < 0.001$.

La Figura 38 es una gráfica para los niveles de síntesis de

15 proteínas de todos los músculos de rata (FDP, deltoides y bíceps combinados) luego de un ejercicio de resistencia intenso en donde la gráfica muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga cuantitativa y el control negativo. * Significativamente diferente del

20 control negativo $p < 0.001$. ‡ Significativamente diferente de las proteínas de suero $p < 0.05$. ◇ Significativamente diferente del tratamiento de *Rhodiola Rosea* $p < 0.05$. ■: Significativamente diferente del tratamiento de *Rhaponticum carthamoides* $p < 0.001$.

Cabe destacar que se pretende que las figuras únicamente faciliten la descripción de las modalidades preferidas. Las figuras no ilustran cada aspecto de las modalidades descritas y no limitan el alcance de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona modalidades de ejemplo de composiciones novedosas para uso farmacéutico o nutracéutico en un mamífero, preferentemente un humano, para aumentar la síntesis de proteínas, la masa muscular y/o la fuerza muscular. Los ejemplos prácticos demuestran que la combinación de extractos de *Rhodiola* y *Rhaponticum*, y composiciones sintéticas relacionadas, puede aumentar la síntesis de proteínas, reducir la proteólisis (inhibir la expresión de Atrogina 1 y miostatina), aumentar la masa muscular y la fuerza muscular. En diversas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden un extracto de *Rhodiola rosea* y/o un extracto de *Rhaponticum carthamoides*. También se describen composiciones sintéticas (es decir, composiciones en las que uno o más ingredientes no derivan de extractos vegetales).

EXTRACTOS DE RHAPONTICUM

El extracto de *Rhaponticum* puede derivarse de cualquier especie de *Rhaponticum*, que incluyen (de modo no taxativo), *Rhaponticum acaule* (L.) DC., *Rhaponticum aulieatense* Iljin, *Rhaponticum australe* (Gaudich.), *Rhaponticum berardioides* (Batt.), *Rhaponticum canariense* DC., *Rhaponticum carthamoides* (Willd.), *Rhaponticum coniferum* (L.) Greuter, *Rhaponticum cossonianum* (Ball) Greuter, *Rhaponticum cynaroides* Less., *Rhaponticum exaltatum* (Willk.) Greuter, *Rhaponticum fontqueri*, *Rhaponticoides hajastana* (Tzvelev) M.V.Agab. & Greuter, *Rhaponticum heleniifolium* Godr. & Gren., *Rhaponticoides iconiensis* (Hub.-Mor.) M.V.Agab. & Greuter, *Rhaponticum insigne* (Boiss.) Wagenitz, *Rhaponticum integrifolium* C.Winkl., *Rhapontikum karatavicum* Iljin, *Rhaponticum longifolium* (Hoffmanns. & Link) Dittrich, *Rhaponticum lyratum* C.Winkl. ex Iljin, *Rhaponticum namanganicum* Iljin, *Rhaponticum nanum* Lipsky, *Rhaponticum nitidum* Fisch, *Rhaponticum pulchrum* Fisch. & C.A.Mey. *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo, *Rhaponticum scariosum* Lam., *Rhaponticum serratuloides* (Georgi) Bobrov, *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. En algunas modalidades, el extracto vegetal de *Rhaponticum* se elabora a partir de una planta seleccionada de la familia de las Asteraceae, el género *Rhaponticum* y, más específicamente, la especie *Rhaponticum Carthamoides*.

Un extracto puede prepararse a partir de cualquier parte de la planta *Rhaponticum*. Sin embargo, la raíz es particularmente útil. La raíz de *Rhaponticum* puede extraerse con un solvente del grupo de etanol, metanol, agua, etanol en agua, acetato de etilo, acetona, hexano o cualquier otro solvente de extracción convencional, preferentemente etanol en agua o agua, más preferentemente etanol en agua al 10 a 90 % v/v e incluso más preferentemente etanol en agua al 30 a 70 % (v/v). En una modalidad, la extracción consiste en mezclar la raíz de *Rhaponticum* molida con solvente a una relación solvente:planta de entre 1:1 a 30:1, y la planta puede someterse a un proceso de extracción única o, de forma alternativa, doble (o más extracciones). La duración de la extracción es preferentemente > 1h, más preferentemente 1.5 h. En una modalidad preferida, la raíz de *Rhaponticum* se mezcla con etanol en agua (50 % v/v) a una relación de 10:1 y se somete a 3 extracciones sucesivas. Luego de la extracción, la mezcla combinada puede filtrarse y/o centrifugarse y el sobrenadante concentrarse a DM al 30 a 70 %, más preferentemente DM al 50 % y finalmente secarse a forma sólida, con una humedad < 10 %, tal como en la forma de un polvo. Un experto en la técnica reconocerá múltiples procesos de preparación de extractos vegetales que pueden utilizarse

para la presente descripción, además de los procesos particulares descritos en la presente.

Los componentes de interés en *Rhaponticum* son los
5 ecdisteroides, en particular 20-hidroxiecdisona
($(2\beta, 3\beta, 5\beta, 22R)-2, 3, 14, 20, 22, 25$ -Hexahidroxicolest-7-en-6-
ona). Este compuesto puede utilizarse como referencia para la
determinación de la calidad de las preparaciones, si bien
puede que no sea el único compuesto que tenga efectos y es
10 posible que una mezcla de compuestos haga el extracto más
efectivo que la 20HE sola (Timofeev et ál., Voldov et ál.).

En algunas modalidades, el extracto de *Rhaponticum* comprende
ecdisteroides totales a al menos 0.01 %, ecdisteroides
15 totales a alrededor de 0.05 % a 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 %, en
función del peso total del extracto (p/p), más
preferentemente ecdisteroides totales a al menos alrededor de
0.1 a 10 %, aun más preferentemente ecdisteroides totales al
20 0.4 % a 5 % en función del peso total del extracto (p/p).

En algunas modalidades, el extracto de *Rhaponticum* comprende
20-hidroxiecdisona (20HE) a al menos 0.01 % en función del
peso total del extracto (p/p), 20HE a alrededor de 0.05 % a

99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 %, más preferentemente 20HE a al menos alrededor de 0.1 a 5.0 % en función del peso total del extracto (p/p).

5

Además, el extracto de *Rhaponticum* también puede comprender ecdisteroides que no sean ecdisterona, tal como, a modo de ejemplo no taxativo, los siguientes ecdisteroides: polipodina B, Makisterona A, 2-Deoxiecdisterona, Integristerona A, Integristerona B, Taxisterona, Ajugasterona C, α -ecdisona, Lesterona, Rapisterona D, Inokosterona, Rapisterona, 20-hidroxiecdisona 2,3;20,22-diacetonida, 20-hidroxiecdisona 2,3-monoacetona; 20-hidroxiecdisona 20,22-monoacetona; 22-oxo-20-hidroxiecdisona, 24(28)-dehidromakisterona A; (24z)-29-hidroxi-24(28)-dehidromakisterona C; carthamosterona; rubrosterona, dihidrorubrosterona; posterona, isovitexirona, leuzeasterona, makisterona C, polipodina B 20,22-acetonida; rapisterona B, rapisterona C, rapisterona D 20-acetato, 24(24')(z)-dehidroamarasterona B, polipodina B-22-benzoato; carthamosterona A, carthamosterona B; Amarasterona A; carthamoleusterona; 24(28)-dehidroamarasterona B, 22-deoxi-28-hidroxi-makisterona C; 3-epi-20-hidroxiecdisona; 24-epi-makisterona A, 14-epi-ponasterona A 22-glucosida; 5- α -20-hidroxiecdisona; 20-

20

hidroxiecdisona 2-acetato, 20-hidroxiecdisona 3-acetato; 1 β -hidroximakisterona C; 26-hidroximakisterona C; 15-hidroxiponasterona A; inokosterona 20,22-acetonida, turkesterona.

5

El extracto de *Rhaponticum* también puede comprender los siguientes ecdisteroides: abutasterona 25-acetoxi-20-hidroxiecdisona 3-o-; beta;-d-glucopiranosida; acetilpinasterol; achyranthesterona; ajugacetalsterona a; 10 ajugacetalsterona b; ajugalida e; ajugasterona b; ajugasterona b; ajugasterona c 3; 22-diacetonida; ajugasterona c 22-etilideno; acetal; ajugasterona c22-monoacetonida; ajugasterona d; amarasterona a; amarasterona b; asteraster b; atrotosterona a; atrotosterona b; 15 atrotosterona c; blecnosida a; blecnosida b; bombicosterol; bombicoster 3-fosfato; brahuisterona; calonisterona; calvaster a; calvaster b; canescensterona; capitasterona; carpesterol; castasterona; cheilanthona a; cheilanthona b; coronatasterona; cianosterona a; ciasterona; ciasterona 3-acetato; 20 ciasterona 22-acetato; ciasterona 3-monoacetonida; cyathisterona; dacryhainansterona; decumbesterona a; dehidroajugalactona; dehidroajugalactona; dehidroamarasterona b; dehidrociasterona 2-glucosida; 3-dehidroecdisona; 2-dehidro-3-epi-20-hidroxiecdisona; y/o 22-dehidro-12-

hidroxiciasterona, dehidro-20-hidroxiecdisona; 3-dehidro-20-
 hidroxiecdisona; dehidro-242-hidroximakisterona c, dehidro-
 12-hidroxi-29-nor-ciasterona; dehidro-12-hidroxi-29-nor-
 sengosterona; dehidro-12-hidroxi-sengosterona; (28)-
 5 dehidromakisterona a; 2-dehidropoststerona; 24-
 dehidropreciasterona; 2-deoxicastasterona; 22-deoxi-21-
 dihidroxiecdisona; 22-deoxi-26-dihidroxiecdisona; 2-deoxi-26-
 dihidroxiecdisona; 3-deoxi-1(alfa) 20-dihidroxiecdisona; 2-
 deoxi-20-dihidroxiecdisona 2-deoxi-polipodina b; 2-
 10 deoxiecdisona; deoxiecdisona; 2-deoxiecdisona 3-acetato; 2-
 deoxiecdisona 22-acetato; 2-deoxiecdisona 22-adenosina-
 monofosfato; 2-deoxiecdisona 22-benzoato; 2-deoxiecdisona 3-
 4-(1-(beta)-d-glucopiranosil)-ferulato; 2-deoxiecdisona 22-
 (beta)-d-glucosida; 25-deoxiecdisona 22-o-(beta)-d-
 15 glucopiranosida; 2-deoxiecdisona 22-fosfato; 2-deoxiecdisona
 25-ramnosida; (5-(alfa))-2-deoxi-21-hidroxiecdisona; 2-deoxi-
 20-hidroxiecdisona; 22-deoxi-26-hidroxiecdisona; 14-deoxi-20-
 hidroxiecdisona; 2-deoxi-21-hidroxiecdisona; 2-deoxi-20-
 hidroxiecdisona 25-acetato; 2-deoxi-20-hidroxiecdisona 22-
 20 acetato; (5-(alfa))-2-deoxi-20-hidroxiecdisona 3-acetato; 2-
 deoxi-20-hidroxiecdisona 3-acetato; 2-deoxi-20-
 hidroxiecdisona 22-benzoato; y/o 2-deoxi-20-hidroxiecdisona
 3-crotonato.

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender polifenoles (en particular, ácido gálico y polímero tal como procianidina B1).

- 5 El extracto de *Rhaponticum* puede comprender compuestos fenólicos (en particular, cinarina y ácido clorogénico).

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender flavonoides tales como patuletina, 6-hidroxi-kaempferol-7-glucosida; 10 quercetagitina, quercetina, quercetagetina, luteolina, kaempferol, isoramnetina, quercetin-3-metileter, quercetin-5-o- β -D-galactosida, isoramnetina 5-o- α -L-ramnosida, quercetagetin-7-o- β -glucopiranosida; apigenina, eriodictiol, eriodictiol-7- β -glucopiranosida, hesperina, crisantemina, 15 cianina.

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender lignanos (carthamogenina, carthamosida, traquelogenina, traquelosida).

- 20 El extracto de *Rhaponticum* puede comprender taninos (ácido elágico).

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender fenilpropanoides de serotonina.

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender poliacetilenos.

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender lactonas
5 sesquiterpénicas.

El extracto de *Rhaponticum* puede comprender glucosidas
triterpenoides (raponticosidos A a H).

10 El extracto de *Rhaponticum* puede comprender triterpenoides
(acetato de parkeil, parkeol).

EXTRACTOS DE RHODIOLA

La presente descripción también incluye un extracto de
15 *Rhodiola*, una planta de crecimiento a grandes alturas que
posee alrededor de 200 especies, que incluyen *R. rosea* y *R.*
crenulata (Kelly, Altern. Med. Rev. 6:293-302, (2001); Ming
et ál., Phytother. Res. 19:740-743, (2005)). La *Rhodiola*
rosea es un adaptógeno que ayuda al cuerpo a adaptarse y
20 resistir una variedad de tensiones ambientales, físicas y
químicas.

El extracto de *Rhodiola* utilizado en las composiciones de la
presente descripción puede elaborarse a partir de cualquier

planta del grupo de *Rhodiola rosea*, *Rhodiola crenulata*,
Rhodiola sachalinensis *Rhodiola sacra*, *Rhodiola algida*,
Rhodiola dumulosa, *Rhodiola kirilowii*, *Rhodiola henryi*,
Rhodiola yunannensis. Un extracto puede elaborarse a partir
5 de cualquier parte de la planta de *Rhodiola*; sin embargo, son
particularmente útiles los extractos preparados a partir de
la raíz y el rizoma.

La especie *Rhodiola* puede contener fenilpropanoides tales
10 como rosavina ((2E)-3-fenilprop-2-en-1-il 6-O- α -L-
arabinopiranosil- α -D-glucopiranosida), rosin
((2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hidroximetil)-6-[(E)-3-fenilprop-2-
enoxil]oxan-3,4,5-triol) y rosarina ((2E)-3-fenil-2-propenil6-
O-.alfa.-L-arabinofuranosil-(9CI); [(E)-3-fenil-2-propenil]6-
15 O- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranosida; [(E)-3-fenil-2-
propenil]6-O-(α -L-arabinofuranosil)- β -D-glucopiranosida). La
especie *Rhodiola* también puede contener derivados de
feniletanol, tales como salidroside/rodioside (2-(4-
hidroxifenil)etil β -D-glucopiranosida) y tirosol (4-(2-
20 hidroxietil)fenol). La especie *Rhodiola* puede contener además
flavanoides (por ejemplo, rodicolina, rodionina, rodiosina,
acetilrodalgina y tricina); monoterpenos (por ejemplo,
rosiridol y rosaridina); triterpenos (por ejemplo,
daucosterol y beta-sitosterol); ácidos fenólicos (por

ejemplo, ácidos clorogénicos, hidroxycinámicos y gálicos);
taninos, minerales y aminoácidos esenciales. Los ingredientes
activos como p-triosol, salidroside, rosavina, piridide,
rodiosina y rodionina se encuentran en la mayoría de las
5 especies *Rhodiola*, pero varían en cantidad. Un ingrediente
bioactivo de interés en la *Rhodiola rosea* es la salidroside.
Las rosavinas (por ejemplo, la suma de rosarina, rosina y
rosavina) son otro constituyente bioactivo identificado de la
planta. La salidroside y/o rosavinas pueden utilizarse como
10 referencia para la determinación de la calidad de las
preparaciones.

En algunas modalidades, el extracto de *Rhodiola* comprende
salidroside a al menos alrededor de 0.10 % a 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 % en función del
15 peso total en seco del extracto; más preferentemente
salidroside a al menos alrededor de 1 % a 4 %. En algunas
modalidades, el extracto de *Rhodiola* comprende rosavina a al
menos alrededor de 0.10 % a alrededor de 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 %, más preferentemente
20 rosavina a al menos alrededor de 2.0 a 5 % en función del
peso total del extracto. En algunas modalidades, el extracto
de *Rhodiola* comprende rosavinas (por ejemplo, la suma de
rosarina, rosavina y rosina) a al menos alrededor de 0.10 % a

90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 %, más preferentemente rosavinas a al menos alrededor de 3 % a 6 % o 1 % a 6 % en función del peso total del extracto vegetal.

5 COMBINACIONES DE EXTRACTO

En algunas modalidades, el extracto de *Rhodiola* comprende alrededor de 1 a 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 % p/p (por ejemplo, alrededor de 1 %, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 % o alrededor de 99 % p/p) en función del peso total de la composición y el extracto de *Rhaponticum* comprende alrededor de 99 % a 1 % p/p (por ejemplo, alrededor de 1 %, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 % o alrededor de 90 % o alrededor de 99 % p/p) en función del peso total de la composición.

20

El extracto de *Rhodiola* puede comprender alrededor de 50 - 99 % p/p y el extracto de *Rhaponticum* comprende alrededor de 1 - 50 % p/p del peso total de la composición. El extracto de *Rhodiola* puede comprender alrededor de 1 - 50 % p/p y el

extracto de *Rhaponticum* comprende alrededor de 50 - 99 % p/p del peso total de la composición. Las diversas preparaciones adecuadas de ejemplo de *Rhodiola* y *Rhaponticum* son las siguientes.

5

El extracto de *Rhodiola* es alrededor de 90 % p/p y el extracto de *Rhaponticum* es alrededor de 10 % p/p del peso total de la composición. El extracto de *Rhodiola* comprende alrededor de 10 % p/p y el extracto de *Rhaponticum* comprende
10 alrededor de 90 % p/p del peso total de la composición. El extracto de *Rhodiola* es alrededor de 60 % p/p y el extracto de *Rhaponticum* es alrededor de 40 % p/p del peso total de la composición. El extracto de *Rhodiola* comprende alrededor de 40 % p/p y el extracto de *Rhaponticum* comprende alrededor de
15 60 % p/p del peso total de la composición. El extracto de *Rhodiola* es alrededor de 50 % p/p y el extracto de *Rhaponticum* es alrededor de 50 % p/p del peso total de la composición. En algunas modalidades, la relación de masa de *Rhaponticum* y *Rhodiola* puede ser de alrededor de entre 60:40
20 y 80:20. En una modalidad, la relación de masa de *Rhaponticum* y *Rhodiola* puede ser de alrededor de 75:25.

En una modalidad, se proporcionan composiciones que comprenden un extracto de *Rhodiola rosea* (raíz) a alrededor

de 50 % p/p y un extracto de *Rhaponticum carthamoides* (raíz) a alrededor de 50 % p/p en función del peso total de los componentes del extracto de la composición. El extracto de *Rhodiola* contiene salidrosidias al 1 - 4 %, rosavina al 2 - 5 % y rosavinas al 3 - 6 %, y el extracto de *Rhaponticum* contiene 20HE al 0.37 % y ecdisteronas totales al 0.78 %. En algunas modalidades, la composición puede comprender ecdisteronas a alrededor de 0.1 % a 10 % o ecdisteronas a alrededor de 0.5 % a 3 %.

10

Se contempla que las composiciones descritas en la presente abarcan toda combinación adecuada de proporciones de los extractos vegetales de *Rhodiola rosea* y *Rhapoticum carthamoides*. Los porcentajes que se proporcionan en la presente se refieren a la relación p/p del peso en seco de la parte del extracto en el peso total de la composición.

15

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

20

Tal como se describe en la presente, se pueden seleccionar diversas especies de plantas, hierbas o partes de estas como parte de las composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y promover el metabolismo muscular mejorado. Los extractos de dichas especies pueden prepararse de diversas maneras adecuadas. En una modalidad, un extracto de planta,

hierba o partes de estas puede lograrse mediante agua y/o alcohol, o ambos, y luego el secado a un polvo fino. En otra modalidad, la extracción se puede llevar a cabo mediante extracción de CO₂ supercrítico.

5

Las composiciones de la presente descripción pueden encontrarse, por ejemplo, en forma de formulaciones sólidas, líquidas o de aerosol que comprenden al menos los dos extractos en cualquier proporción (uno o más de los
10 extractos) tal como se describe en la presente. Las composiciones de la descripción pueden comprender además otros componentes, por ejemplo, de modo no taxativo, vitaminas, fármacos o excipientes agregados a una formulación en una cantidad de 0.1 a 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 % p/p del
15 producto final y, por lo tanto, las relaciones de los extractos pueden variar en consecuencia. Dichas composiciones pueden elaborarse en diversas formulaciones, que se administran a un mamífero para promover el crecimiento
20 muscular y la fuerza muscular.

En una modalidad, la composición inventiva se contiene en cápsulas. Las cápsulas adecuadas para administración oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas

suaves, selladas hechas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con un relleno como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como talco o
5 estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores.

Los líquidos para administración pueden ser soluciones o suspensiones. En un ejemplo, la composición de la invención se proporciona como un polvo seco. El sujeto disuelve o
10 suspende el polvo en una bebida de su elección (por ejemplo, agua, refresco, jugo de frutas, etc.) y luego consume esa bebida. De manera alternativa, las composiciones inventivas se proporcionan en forma líquida. En el caso de comprimidos, sustancias moldeadas o cápsulas, la forma de dosificación
15 debe adaptarse a una dosificación irregular. Las unidades con diferentes niveles de dosis pueden preempaquetarse, por ejemplo, en blísteres, y etiquetarse para el momento de la ingesta. Los intervalos pueden ser BID, TID, QID o más frecuentemente. En el caso de las cápsulas, se pueden incluir
20 una o más píldoras de acción retardada con perlas de acción prolongada. Sin dudas, existen otras maneras alternativas para la formulación. A modo de ejemplo, se pueden mezclar y encapsular micropartículas de acción prolongada y cantidades adecuadas de una o más cantidades de partículas con más

micropartículas de acción retardada. Los sustratos de matriz pueden utilizarse para formar comprimidos de 2, 3 o 4 capas múltiples o comprimidos recubiertos por prensa. Los comprimidos recubiertos por prensa pueden tener núcleos de acción retardada. Se pueden utilizar comprimidos formulados de forma diferente con múltiples capas y recubiertos por prensa, los cuales pueden incluir comprimidos recubiertos y no recubiertos empaquetados para especificar el momento de uso. De la misma manera, las micropartículas de acción retardada y de acción prolongada pueden suspenderse en fluidos parenterales para proporcionar una dosificación irregular.

En algunas modalidades, se puede preparar un extracto mediante secado y pulverización de dicha especie seleccionada. En modalidades adicionales, un extracto puede concentrarse antes del secado, lo cual puede ser conveniente para reducir el volumen del extracto. Dichas concentraciones pueden reducir el volumen del extracto mientras conservan el espectro completo de las características y los niveles de los compuestos marcadores de la planta o hierba natural o parte de estas.

En modalidades adicionales, se puede utilizar una técnica de

procesamiento del agua a baja temperatura. Dicho proceso puede ser conveniente dado que puede capturar una gran parte de los constituyentes de apoyo como los polisacáridos, flavonoides, terpenos y componentes volátiles, aceites y resinas valiosos (parte de los cuales típicamente los captura únicamente alcohol o hexano y ambos dejan indicios no deseados). Luego, el material vegetal extraído puede concentrarse, y el líquido concentrado puede secarse mediante el uso, por ejemplo, de un secador por pulverización ultrarrápida que produce un polvo fino, o similar. En algunas modalidades, la concentración del extracto vegetal a secarse hasta polvo puede reducir el volumen del polvo vegetal sin cambiar sustancialmente la composición de las partes constituyentes de la planta. Dicho método puede ser conveniente para reducir los indicios químicos no deseados que pueden introducirse en el material vegetal y, por lo tanto, se puede obtener un polvo vegetal de espectro completo más puro. Por ejemplo, pueden obtenerse relaciones de concentraciones de 10 a 1 a 20 a 1, lo que puede reducir significativamente el volumen del material y proporcionar una dosificación conveniente en las cápsulas.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" es una sustancia que puede agregarse a los ingredientes activos para ayudar a

formular o estabilizar la preparación y no provoca efectos toxicológicos secundarios significativos al paciente. Los ejemplos de dichos portadores son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen agua, azúcares como maltosa y sacarosa, albúmina, sales como cloruro de sodio, etc. Otros portadores se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin, que se incorpora a la presente mediante referencia. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los extractos de *Rhodiola* y *Rhaponticum*.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. La composición se formula preferentemente para ingesta oral. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta del fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de estos. En algunos casos, incluirá

agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición.

Tal como se usa en la presente, los "portadores" incluyen portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero que se exponen a estos en las dosificaciones y concentraciones usadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH amortiguado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidinona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcohólicos tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y PLURONIC.

Los portadores farmacéuticamente aceptables también incluyen portadores naturales y no naturales tales como maltodextrina, goma arábiga (E414), dióxido de silicio (E551), dextrina de tapioca, dextrinas, goma de acacia y similares.

5

La invención también incluye formulaciones sintéticas con los mismos ingredientes activos, en las mismas proporciones, que se enumeraron anteriormente. Estos ingredientes pueden purificarse o sintetizarse e incluirse en las composiciones y formulaciones sin incluir ningún otro material vegetal de origen natural que se encuentre normalmente presente en un extracto.

MÉTODOS DE USO

15 El extracto de *Rhodiola* puede utilizarse para aumentar la síntesis de proteínas y disminuir la expresión génica de miostatina y/o atrogina en las células del músculo esquelético. El extracto de *Rhaponticum* puede utilizarse para aumentar la síntesis de proteínas, aumentar la fosforilación de los miembros de la vía Akt, aumentar la fosforilación de S6K1 y/o reducir la expresión génica de miostatina y/o atrogina en las células del músculo esquelético.

20

En una modalidad adicional, la combinación de los extractos

de *Rhodiola* y *Rhaponticum* puede administrarse en cantidades que mejoren sus funciones en comparación con las de cada uno cuando se administran solos.

- 5 En aun otro aspecto, se proporciona un método para mejorar la masa muscular y la fuerza muscular en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición que se describe en la presente. El mamífero es preferentemente un humano, más preferentemente un atleta. En
- 10 un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un método para promover el rendimiento físico/deportivo aeróbico y anaeróbico en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición que se describe en la presente. En aun otro aspecto, se proporciona
- 15 un método para tratar las afecciones asociadas o caracterizadas por la atrofia muscular en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición que se describe en la presente.
- 20 En algunas modalidades, la composición se administra de forma oral a un mamífero, preferentemente un humano, a una dosis diaria de alrededor de 1 - 5000 mg/día, preferentemente a alrededor de 30 - 1000 mg/día, más preferentemente alrededor de 50 - 1000 mg/día, y aun más preferentemente alrededor de

100 - 600 mg/día o 200 - 500 mg/día. Se pueden proporcionar
dosis menores de alrededor de 0.5 mg/día o una dosis mayor
que 5000 mg/día. En algunas modalidades, se proporcionan
dosis diarias múltiples de 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500,
5 600, 700, 800, o más mg por dosis.

Los intervalos de dosificación son, convencionalmente, QD
(una vez al día), BID (dos veces al día), TID (tres veces al
día), QID (cuatro veces al día) o más frecuentes, que
10 incluyen, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis por día. El momento
de la administración puede basarse en la semivida, la
formulación de la forma de dosificación que se utiliza, la
reactividad sistémica, la conveniencia, si es
autoadministrado o por régimen y si la sustancia es
15 terapéutica, nutricional, esteroideal o antiinfecciosa.

Salvo que una composición sea de liberación controlada, o
tenga una semivida prolongada que permita la administración
QD, el intervalo de tiempo entre la ingesta de dosis puede
20 ser irregular. Por ejemplo, si una sustancia se ingiere tras
levantarse y al acostarse, los intervalos son probablemente
16 y 18 horas. Si se ingiere tras levantarse, al medio día y
al acostarse, los intervalos pueden ser 5, 11 y 8 horas. Si
se ingiere en intervalos regulares durante horas de

actividad, los intervalos pueden ser 5.33, 5.33, 5.33 y 8 horas. En dichos casos, la dosificación lógica debe ser irregular para ser congruente con los intervalos de tiempo irregulares.

5

Es mejor que se ingieran los compuestos nutracéuticos y determinados fármacos, y esteroides, antibióticos y sustancias similares, con el estómago lleno. Dichos intervalos durante el día pueden ser irregulares y el tiempo entre la última dosis durante el día y la siguiente dosis en la mañana puede ser diferente.

La dosis adecuada de un agente activo para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o la promoción de una función corporal mejorada dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada o la función objetivo, tal como se definió anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, el hecho de que el agente se administre con fines preventivos o terapéuticos, los tratamientos previos, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, así como del criterio del médico tratante. El agente se administra de forma adecuada al sujeto una vez o en una serie de tratamientos. Las dosificaciones y la concentración del fármaco deseada de las composiciones pueden variar en función del uso particular

previsto. La determinación de la vía de administración o dosificación adecuada se encuentra dentro del conocimiento del experto en la técnica. Los experimentos en animales proporcionan una guía confiable para la determinación de 5 dosis eficaces para la terapia en humanos. Por consiguiente, una "cantidad eficaz" de cualquier composición o formulación particular, de acuerdo con la presente descripción, variará en función de las circunstancias particulares, y un experto en la técnica podrá determinar una cantidad eficaz adecuada 10 en cada caso de aplicación mediante el uso de experimentos de rutina, para poder alcanzar el efecto deseado.

Tal como se usan en la presente, los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y similares, tal como se usan en la 15 presente, se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva, que incluye la terapia de sujetos sanos. Un ejemplo de la "terapia preventiva" es la prevención o disminución del trastorno o afección patológica objetivo. Las personas que necesitan tratamiento incluyen 20 aquellas que ya padecen el trastorno, así como aquellas propensas a padecer el trastorno o aquellas en las cuales se desea prevenirlo. La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en contraposición a un modo agudo, de modo de mantener el efecto

(actividad) terapéutico inicial durante un período de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene naturaleza cíclica. La
5 administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden. En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente pueden utilizarse para el tratamiento de afecciones
10 asociadas o caracterizadas por la atrofia muscular, que incluyen sarcopenia, obesidad sarcopénica, cáncer, esclerosis múltiple, distrofia muscular, fractura ósea que requiera inmovilización (por ejemplo, férula o yeso), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), neuropatía periférica, apoplejía,
15 caquexia o similares. Dichas afecciones pueden ser idiopáticas, secundarias a una afección diagnosticada, o similares.

Tal como se usa en la presente, una "cantidad
20 terapéuticamente eficaz" es la cantidad mínima del agente activo (por ejemplo, una composición que comprende extractos de *Rhodiola* y *Rhaponticum*) necesaria para conferir el beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" a un sujeto que padece o es propenso

a padecer o para prevenir que padezca es una cantidad que induzca, mejore o, de otro modo, provoque una mejora de los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad, las afecciones fisiológicas asociadas o la resistencia a perecer
5 por el trastorno mencionado anteriormente.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las modalidades preferidas. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación
10 representan técnicas descubiertas que funcionan correctamente y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para llevarla a la práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, en función de la presente descripción, deben observar que se pueden realizar diversos
15 cambios a las modalidades específicas descritas y aun así obtener un resultado igual o similar sin alejarse del espíritu y el alcance de las modalidades.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

20 Los extractos pueden prepararse mediante el uso de un proceso de extracción de solvente orgánico. Por ejemplo, las raíces de *Rhaponticum carthamoides* pueden molerse (por ejemplo, a un tamaño de 4 mm mesh) y el material molido mezclarse con un solvente que incluye, de modo no taxativo, agua al 100 %,

etanol al 1 % a 99 % en agua (v/v), metanol al 1 % a 99 % en agua (v/v), acetato de etilo, acetona, hexano o cualquier otro solvente orgánico utilizado convencionalmente para la extracción (por ejemplo, EtOh al 50 %) en un reactor o cualquier recipiente con una función de extracción. Una relación adecuada de solvente:planta es entre alrededor de 1:1 a 30:1, más preferentemente entre 5:1 y 15:1 (por ejemplo, 10:1 (p/v)). Se extrae la materia prima, por ejemplo, a reflujo con agitación, pero puede ser mediante maceración, con o sin reflujo, con o sin agitación y con o sin presión aplicada. La temperatura de extracción normalmente dependerá del solvente utilizado. El tiempo de extracción es preferentemente al menos más de 1 h (por ejemplo, 1 h 30).

15

Luego del tiempo de extracción, la mezcla puede filtrarse o centrifugarse para separar el líquido de la fase sólida (masa). En la etapa de filtración, se pueden utilizar filtros de 25 micrómetros.

20

La etapa de extracción puede repetirse más veces para alcanzar más de una cubierta (por ejemplo, repetirse 2 veces para lograr un total de 3 cubiertas) y pueden combinarse los filtrados. Se descarta la fase sólida.

Los filtrados combinados pueden concentrarse al vacío (por ejemplo, 0.8 Pa) a DM al 30 % a 70 % (preferentemente DM al 50 %). Se puede utilizar cualquier tipo de sistema de evaporación de solvente. La pasta de extracción resultante se denomina el "extracto natural".

Luego, se seca el extracto natural a un contenido de DM en % de alrededor de 90 % a 99 % (por ejemplo, 97 %), pero puede secarse a un % de DM menor. Esta etapa puede llevarse a cabo mediante cualquier proceso de secado que incluye, de modo no taxativo, atomización, secado al aire, secado en horno, secado al sol, etc., con o sin portador.

Ejemplo 1: extracción de *Rhaponticum* con Etanol al 50 % (v/v) (F0) .

Se muestra una versión esquemática del siguiente proceso de extracción en la Figura 29a. La hierba sin procesar *Rhaponticum* (raíz, 65 kg en base seca) se pesó y molió en un polvo grueso. El polvo se colocó en un reactor y/o cámara de extracción y se agregaron 700 L de etanol al 50 % en agua (v/v, alcohol al 50 %) a la materia prima, relación aproximada de 10:1 (v/p). La mezcla se calentó a reflujo con agitación durante 1.5 horas, a una temperatura de 80 -90 °C.

Después de 1.5 horas, el líquido se filtró y se separó. Se recuperó el residuo (fase sólida) y la etapa de extracción se repitió dos veces más (para lograr un total de tres cubiertas).

5

Los filtrados se combinaron antes de concentrarse al vacío (0.8 Pa) a DM al 30 - 60 % (por ejemplo, DM al 39 %). Se obtuvo un total de 25 kg de la pasta de concentración (denominada "F0 - extracto natural") y se analizó con respecto a ingredientes bioactivos.

10

En este proceso, el etanol puede recolectarse del filtrado y reutilizarse en la etapa de extracción, lo que asegura que el solvente sea siempre alcohol al 50 %.

15

La pasta de extracción concentrada luego se secó mediante atomización para proporcionar un polvo seco (menos de 10 % de humedad) (F0 - EtOH al 50 % de polvo seco). Se obtuvo una muestra de polvo seco y se utilizó para el análisis de ingrediente bioactivo, análisis microbiano, análisis de metales pesados, análisis de pesticidas y análisis nutricional.

20

Ejemplo 2: Etapas de centrifugación y filtración (F0 tal como

se representa en la Figura 29a)

Se diluyeron 12 kg de extracto natural de *Rhaponticum* (a DM al 39 %) preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 con agua a DM al 10 %, y luego se centrifugaron. El rendimiento fue 43 kg
5 de extracto natural diluido a DM aproximadamente al 10 % (F0 - natural diluido y centrifugado).

Se llevó a cabo una ultrafiltración (UF) a 5 kDa y luego a 1 kDa en 42 kg de este extracto natural diluido (a DM al
10 10 %) para obtener 3 fracciones: > 5 kDa, 1-5 kDa y < 1 kDa. Las fracciones se secaron al vacío o atomización (los rendimientos fueron 1.55 kg, 0.90 kg y 1.15 kg, respectivamente) (F0 - UF natural). Se envió una muestra para análisis bioactivo.

15

Ejemplo 3: Etapa de purificación (F5' tal como se representa en la Figura 29a)

Se purificó 1 kg de extracto natural diluido de *Rhaponticum* (a DM aproximadamente al 10 %) preparado de acuerdo con el
20 Ejemplo 2 (F0 - natural diluido y centrifugado) en una columna de resina adsorbente D-101 (volumen de resina 1 L). El eluato se concentró y se secó para proporcionar un polvo fino ((se obtuvo 14.5 g de polvo de extracto purificado) (F5' - extracto con EtOH al 50 % purificado).

Ejemplo 4: Proceso de extracción de *Rhaponticum* con Etanol al 70 % (v/v) (F5 y F7).

Se mezcló una cantidad conocida de la raíz *Rhaponticum* molida
5 a polvo grueso con agua a una relación solvente:planta de
10:1 (v/p) y se extrajo con reflujo a 80 °C durante 2 horas.
Se realizó una única extracción. La fase sólida se descartó y
la fase líquida se recuperó y se filtró a 25 µm.

10 Se concentró parte del filtrado mediante el uso de un
evaporador rotativo para eliminar la mayoría del solvente y
finalmente se secó al vacío hasta una humedad < 10 %. El
extracto fue un polvo (F7: extracto de EtOH al 70 %).

15 La otra parte del filtrado se purificó en una columna de
resina adsorbente tal como se describió en el Ejemplo 3, se
concentró y se secó al vacío hasta humedad < 10 %. El
extracto fue un polvo (F5 - extracto con EtOH al 70 %
purificado).

20

Ejemplo 5: proceso de extracción de *Rhaponticum* con agua (F1 y F3)

Se repitió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4, con la
excepción de que se utilizó agua en lugar de EtOH al 70 %.

Se mezcló una cantidad conocida de la raíz *Rhaponticum* molida a polvo grueso con agua a una relación solvente:planta de 10:1 (v/p) y se extrajo con reflujo a 80 °C durante 2 horas.

5 Se realizó una única extracción. La fase sólida se descartó y la fase líquida se recuperó y se filtró a 25 µm.

Se concentró parte del filtrado mediante el uso de un evaporador rotativo para eliminar la mayoría del agua y

10 finalmente se secó al vacío hasta una humedad < 10 %. El extracto fue un polvo (F1: extracto acuoso).

La otra parte del filtrado se purificó en una columna de resina adsorbente tal como se describió en el Ejemplo 3, se

15 concentró y se secó al vacío hasta humedad < 10 %. El extracto fue un polvo. (F3 - extracto acuoso purificado).

Ejemplo 6: proceso de extracción de *Rhaponticum* con acetona (F2 y F4)

20 Se repitió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4, con la excepción de que se utilizó acetona en lugar de EtOH al 70 %.

Se mezcló una cantidad conocida de la raíz *Rhaponticum* molida a polvo grueso con acetona a una relación solvente:planta de

10:1 (v/p) y se extrajo con reflujo a 80 °C durante 2 horas. Se realizó una única extracción. La fase sólida se descartó y la fase líquida se recuperó y se filtró a 25 µm.

5 Se concentró parte del filtrado mediante el uso de un evaporador rotativo para eliminar la mayoría del solvente y finalmente se secó al vacío hasta una humedad < 10 %. El extracto fue un polvo. (F2: extracto de acetona).

10 La otra parte del filtrado se purificó en una columna de resina adsorbente, se concentró y se secó al vacío hasta humedad < 10 %. El extracto fue un polvo. (F4 - extracto de acetona purificado).

15 **Ejemplo 7: preparación de extracto vegetal de *Rhodiola rosea***

Se extrajo material de *Rhodiola rosea* seco mediante alcohol acuoso. Por ejemplo, en algunas preparaciones, se prefirió etanol acuoso con etanol al 50 % o al 70 %. Luego, el extracto obtenido se filtró y se concentró el sobrenadante.

20 El extracto filtrado se centrifugó y el sobrenadante claro se purificó mediante columna. Se utilizó etanol para eluir la columna. Luego, la elución de etanol obtenida se concentró. Algunas preparaciones incluyeron una etapa de secado opcional.

Ejemplo 8: dosificación de rosavinas totales y salidrosidias en un extracto vegetal de *Rhodiola rosea*

Se determinó la cantidad de diversos compuestos, que incluyen
5 salidrosidias y rosavinas totales (rosarina, rosavina y
rosina), en el extracto de raíz de *Rhodiola rosea* mediante el
uso del método HPLC elaborado por: M. Ganzera et ál.,
"Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L.
(Golden root) by reversed phase high performance liquid
10 chromatography" Chem. Pharm. Bull. 49(4) 465 - 467 (2001). En
resumen, se realizó la cuantificación de compuestos objetivo
en un sistema HPLC Agilent 1100 HPLC equipado con un detector
de UV. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una
columna HPLC ACE C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) configurada a
15 45 °C. La fase móvil consistió en acetonitrilo (eluyente A) y
amortiguador de fosfato pH 7 (eluyente B). El gradiente fue
el siguiente: isocrático A al 11 % (10 min), A al 11 - 30 %
(20 min), A al 30 - 80 % (5 min), isocrático A al 80 % (10
min), A al 80 - 11 % (5 min). El tiempo de procesamiento
20 total fue 50 min. El volumen de inyección fue de 5 µL y la
velocidad de flujo fue de 1 mL/min. El monitoreo UV se llevó
a cabo a 225 nm para la detección de salidrosidias y a 250 nm
para la detección de rosavinas. La cantidad de compuestos
objetivo se cuantificó al comparar el área pico de la muestra

con el área pico del compuesto de referencia de concentración conocida.

Tabla 1: Salidrosidias y rosavinas totales (rosarina, rosavina y rosina) en el extracto de raíz de *Rhodiola rosea*.

Activo	A007/001/D14	A139/047/A14	Intervalo
Salidroside (%)	3.414	2.595	1 a 4 %
Rosarin (%)	0.746	0.751	0.7 a 0.8 %
Rosavin (%)	3.121	2.996	2 a 5 %
Rosin (%)	0.337	0.514	0.3 a 0.6 %
Rosavins totales (%)	4.204	4.261	3 a 6 %

Ejemplo 9: análisis de 20HE en los distintos extractos de raíz de *Rhaponticum*

Se determinó la cantidad de beta-ecdisona (20HE) en los distintos extractos de *Rhaponticum* preparados como en los Ejemplos 1 a 6 mediante el uso de un sistema HPLC Agilent 1100 equipado con un detector UV-Vis. La separación del compuesto se llevó a cabo en una columna HPLC Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm - 1.8 micrómetros) con una temperatura de columna configurada a 35 °C. La fase móvil consistió en

metanol (eluyente A) y ácido fórmico al 0.1 % en agua (eluyente B). La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/min. El gradiente fue lineal con aumento de 10 a 100 % A en 15 min. El volumen de inyección fue de 2 µL. Se realizó el monitoreo UV a 250 nm, bw 8 nm. La cantidad de compuestos objetivo se cuantificó al comparar el área pico de la muestra con el área pico del compuesto de referencia de concentración conocida.

Tabla 2: concentración de 20-Hidroxiecdisona (20-HE) en las diferentes fracciones de *Rhaponticum carthamoides* extraídas con etanol (50 %), etanol (70 %), agua o acetona, con o sin posterior purificación en columna.

Fracciones	Ejemplo de extracción	20HE % odb medido	Intervalo (% odb)
<i>Solvente de extracción EtOH al 50 % (F0 y F5')</i>			
F0 - extracto natural (labo - DM al 60 %)*	Ejemplo 1	0.18-0.21*	0.1-0.3*
F0 - extracto natural (piloto - DM al 38 %)*	Ejemplo 1	0.14*	0.1-0.3*
F0 - EtOH al 50% polvo seco	Ejemplo 1	0.37-0.40	0.3-0.5
F0 - natural diluido y centrifugado (DM al 7 %)	Ejemplo 2	0.13	0.1-0.3

	F5'- extracto EtOH al 50 % purificado	Ejemplo 3	2.31-2.52	2.0-3.0
	Ultrafiltración			
5	UF > 5 kDa	Ejemplo 2	0.53	0.5-1.0
	UF 1-5 kDa	Ejemplo 2	0.33	0.1-0.5
	UF < 1 kDa	Ejemplo 2	0.38	0.1-0.5
	Solvente de extracción EtOH al 70 % (F5 y F7)			
10	F7 - extracto EtOH al 70 %	Ejemplo 4	0.37-0.48	0.2-0.5
	F5 - extracto EtOH al 70 % purificado	Ejemplo 4	0.89-1.60	0.8-2.0
	Solvente de extracción agua (F1 y F3)			
15	F1 - extracto acuoso	Ejemplo 5	0.18-0.38	0.1-0.5
	F3 - extracto acuoso purificado	Ejemplo 5	1.48-1.96	1.2-2.0
	Solvente de extracción acetona			
20	F2 - extracto de acetona	Ejemplo 6	0.63	0.5-0.7
	F4 - extracto de acetona purificado	Ejemplo 6	3.30	> 3.0

*los valores se expresan en la muestra tal como se analizó y no en base seca

Ejemplo 10: análisis de ecdisteroides de extracto de raíz de

5 ***Rhaponticum* etanólico**

Se obtuvo el extracto seco de la raíz de *Rhaponticum carthamoides* (F0 - EtOH al 50 % polvo seco) mediante extracción con etanol al 50 % (v/v) en agua tal como se describió en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo la identificación de ecdisteroides mediante el uso de un sistema HPLC equipado con un detector de matriz de fotodiodos. La separación se llevó a cabo en una columna HPLC Atlantis C18 (150 x 3 mm - 3 µm) configurada a 40 °C. La fase móvil consistió en metanol con ácido acético al 0.1 % (v/v, eluyente A) y ácido acético al 0.1 % (v/v) en agua (eluyente B). La velocidad de flujo fue de 0.6 mL/min. El programa de gradiente fue el siguiente: isocrático A al 20 % (5 min), A al 20 - 40 % (25 min), A al 40 - 70 % (15 min), A al 70 - 85 % (15 min). El tiempo de procesamiento total es 60 min. Se llevó a cabo el monitoreo a 242 nm.

Tabla 3: ecdisteroides identificados en extracto etanólico (50 % v/v) de raíz de *Rhaponticum carthamoides* secada hasta forma de polvo (humedad < 10 %)

	Tiempo de retención	Fórmula	Compuestos	%
5	20.2	C ₂₇ H ₄₂ O ₇		0.005 %
	20.8	C ₂₇ H ₄₄ O ₉	Integristerona B	Nq
	24.9	C ₂₇ H ₄₂ O ₇	Isovitexirona	0.007 %
	30.5	C ₂₇ H ₄₄ O ₈		Nq
	30.7	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	20-Hidroxiecdisona	0.395 %
10	31.1	C ₂₉ H ₄₂ O ₈		Nq
	32.1	C ₂₇ H ₄₄ O ₇		0.006 %
	33.7	C ₂₇ H ₄₂ O ₇	22-Oxo-20-hidroxiecdisona	0.012 %
	35.3	C ₂₇ H ₄₄ O ₇		0.013 %
	35.6	C ₂₈ H ₄₄ O ₆		Nq
15	35.7	C ₂₈ H ₄₆ O ₇	Makisterona A	0.003 %
	36	C ₂₈ H ₄₄ O ₇	24 (28) - Dehidromakisterona A	0.004 %
	37.3	C ₂₇ H ₄₄ O ₇		0.158 %
20	38.3	C ₂₉ H ₄₄ O ₆		0.144 %
	38.6	C ₂₉ H ₄₆ O ₈		Nq
	39.8	C ₂₇ H ₄₄ O ₆	Alfa-ecdisona	0.006 %
	40.4	C ₂₉ H ₄₈ O ₇		0.030 %

41.2	C ₂₇ H ₄₄ O ₇		Nq
44.5	C ₂₉ H ₄₄ O ₆		0.005 %

Nq: no cuantificable. Ecdisteronas totales (como 20-
5 hidroxiecdisona) = 0.788 %.

Se identificó un total de 19 ecdisteroides en el extracto de raíz de *Rhaponticum*. Algunos se identificaron únicamente por sus estructuras químicas.

10

Ejemplo 11: análisis fitoquímico y fisicoquímico del extracto etanólico del extracto de raíz de *Rhaponticum* etanólico (que excluye los ecdisteroides)

Se obtuvo el extracto seco de la raíz de *Rhaponticum*
15 *carthamoides* (F0 - EtOH al 50 % polvo seco) mediante extracción con etanol al 50 % (v/v) en agua tal como se describió en el Ejemplo 1 y se analizó para fitocompuestos que no sean ecdisteroides y análisis físico. Los gráficos de los fenólicos totales, los ácidos orgánicos totales y los
20 carbohidratos libres totales identificados en la composición se representan en las Figuras 1a, 1b y 2.

Tabla 4: análisis físico (espectrofotometría y gravimetría) del extracto etanólico (50 % v/v) de la raíz *Rhaponticum*

***carthamoides* secado a forma en polvo**

OPC	Fenólico	Fibra	Proteínas	Ceniza	Agua
Como	Como	total			(equilibrio
Folin	Folin C.	método	Kehjdal	EuP.	IR.)
denis		AOAC			
0.7 %	13.4 %	6.7 %	2.7 %	16.7 %	3.95 %

Los resultados de HPLC/GC, agua, proteína, fibra y ceniza totales proporcionan 70.6 % del extracto identificado; los compuestos tales como acetileno tiofenos y esterol se encuentran en cantidades bajas (identificados pero no cuantificados).

MÉTODOS DE USO DE LOS EXTRACTOS DE *RHAPONTICUM* Y *RHODIOLA*

Los siguientes ejemplos evaluaron el efecto del extracto de *Rhaponticum* y el extracto de *Rhodiola*, solos y en combinación, en la síntesis de proteínas y las vías de señalización metabólica.

EJEMPLO 12: fosforilación de S6K1 en treonina 389 y de Akt en treonina 308 de diferentes preparaciones de extractos de *Rhaponticum carthamoides* (ETAPA 1, tal como se representa en la Figura 29a).

Se diseñó un estudio para evaluar la capacidad del extracto

de *Rhaponticum* para estimular la síntesis de proteínas y las vías metabólicas al nivel de Akt. La serina/treonina cinasa Akt (proteína cinasa B) se activa mediante una variedad de estímulos a través de la fosforilación en Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³. Una vez fosforilado, la Akt migra al núcleo donde es parte de una variedad de procesos celulares, como el transporte de la glucosa, la síntesis de proteínas o el almacenamiento de lípidos y triglicéridos.

También se evaluó la capacidad del extracto de *Rhaponticum* para estimular la síntesis de proteínas al nivel de S6 cinasa 1. La p70 S6 cinasa es una proteína citoplásmica ubicua que se activa en respuesta a citocinas. Se encuentra corriente abajo de la vía mTOR/PI3K y se fosforila en múltiples residuos, incluso la treonina 389. La fosforilación de Thr389, sin embargo, se encuentra más directamente correlacionada con la actividad de p70 cinasa in vivo. Una vez activada, la p70 S6 cinasa fosforila la proteína S6 en la proteína ribosomal 40S (rpS6) que conduce al proceso de síntesis de proteínas.

Las células C2C12 se obtuvieron originalmente por Yaffe y Saxel (1977) a través del pasaje en serie selectivo de mioblastos cultivados del músculo del muslo de ratones C3H

70 h después de una lesión por aplastamiento (Yaffe D, 1977). Estas células se mostraron capaces de diferenciación. Las células C2C12 son un modelo útil para estudiar la diferenciación de las células miogénicas con las células del músculo esquelético (por ejemplo, mecanismos de fosforilación de miosina) y expresan las proteínas musculares y el receptor androgénico.

Se prepararon cinco preparaciones diferentes del extracto de *Rhaponticum*: extracto de etanol al 50 %, extracto de etanol al 70 %, extracto de agua al 100 %, así como también extractos purificados en columna (con la excepción del EtOH al 50 %), tal como se describió en los Ejemplos 1 a 5 de la presente descripción.

15

Tabla 5: preparaciones de *Rhaponticum*

N.º	Extracto	Fracción	Lote	Fecha de recepción	Almacenamiento	Peso estimado	Observaciones
20 1	<i>Rhaponticum</i>	F0, NE- ETOH al 50 %	TL19/ 06/13 -1	2013/11/19	+4 °C	22.1 g	Suspensión marrón
2	<i>Rhaponticum</i>	F1, extracto acuoso primario	LAU- 25402 18/A	2013/11/19	+4 °C	24.0 g	Polvo marrón

5	3	<i>Rhaponticum</i>	F3, extracto acuoso purificado	LAU- 2390207 /B	2013/11/19	+4 °C	5.3 g	Polvo marrón
10	4	<i>Rhaponticum</i>	F5, extracto de etanol purificado	LAU- 2410208 /B	2013/11/19	+4 °C	6.4 g	Polvo verde
15	5	<i>Rhaponticum</i>	F7, extracto de etanol primario	LAU- 2600224	2013/11/19	+4 °C	22.8 g	Pequeños fragmentos marrones adhesivos

15

Se prepararon concentraciones analizadas para cada preparación del extracto de *Rhaponticum* para tener una concentración final en hidroxiecdisona de 0.1 μM , 1 μM y 10 μM . En función de la concentración de la hidroxiecdisona medida en cada extracto, las concentraciones utilizadas para cada preparación del *Rhaponticum* fueron las siguientes:

20

Tabla 6

	Compuesto	% de cantidad de hidroxiecdisona (% 20 HE)	Concentración final del extracto después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentración final en hidroxiecdisona (en pocillos)
5				
10	F0 (extracto líquido NE-ETOH al 50 %)	0.21 %	10 µg/mL	0.04 µM
			100 µg/mL	0.4 µM
			1001 µg/mL	4.4 µM
15	F1 (extracto acuoso primario)	0.38 %	12.6 µg/mL	0.1 µM
			126 µg/mL	1 µM
			1265 µg/mL	10 µM
	F3 (extracto acuoso purificado)	1.96 %	2.5 µg/mL	0.1 µM
			25 µg/mL	1 µM
			245 µg/mL	10 µM
20	F5 (extracto de etanol purificado)	1.60 %	3 µg/mL	0.1 µM
			30 µg/mL	1 µM
			300 µg/mL	10 µM
	F7 (extracto de etanol primario)	0.48 %	10 µg/mL	0.1 µM
			100 µg/mL	1 µM
			1001 µg/mL	10 µM

Al comienzo del estudio, no se determinó el valor del % de hidroxiecdisona para el extracto F0 y la concentración final analizada se basó en la concentración de hidroxilecdisona en el extracto F7. Sin embargo, se sobreestimó la concentración de esta ecdisona en el F0. Esta es la razón por la cual la concentración final de la hidroxiecdisona analizada para el extracto F0 era diferente a la de otras fracciones.

Se recolectaron células en crecimiento y se colocaron en placas a una densidad de 170 000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Las células se cultivaron durante 48 h en CO₂ al 5 % a 37 °C. Después de que las células alcanzaron 80 % de confluencia, el medio se reemplazó con un medio de diferenciación (DMEM + FBS al 2 %). Luego de 5 días, los mioblastos se fusionaron en miotubos multinucleados. 1 h antes de comenzar el experimento, se incubaron las células en medio Krebs para retirar los aminoácidos de las células.

Se trataron las células con cinco preparaciones del extracto vegetal de *Rhaponticum* a 3 concentraciones en la presencia de una concentración normal (0.8 mM) o baja (0.08 mM) de aminoácidos y con DMSO al 0.002 % durante 2 h.

Al final del experimento, las células se lisaron en un

amortiguador de lisado celular (100 μ L por pocillo) y se centrifugaron para aislar la proteína soluble en el sobrenadante. Las proteínas de este ensayo celular se cuantificaron mediante el uso de un ensayo colorimétrico derivado del método de LOWRY. Por lo tanto, se transfirieron 50 μ g de la proteína total en 100 μ L de amortiguador de lisis a bandas de micropocillos recubiertas con el anticuerpo pAkt o pS6K1 y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Luego de varios lavados, se agregó el anticuerpo de detección y se incubó durante 1 h a 37 °C. Nuevamente, se realizaron varios lavados y se agregó el anticuerpo secundario unido a HRP. Al final de los 30 min de incubación a 37 °C, se agregó el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y se desarrolló un color azul en los pocillos positivos. Para evitar la saturación de señal, se agregó una solución de detención que induce un color amarillo. La intensidad del color amarillo era legible en un espectrofotómetro a 450 nm y era directamente proporcional a la cantidad detectada de pS6K1 o Akt.

Cada condición se analiza en n=5 o n=6. Se utilizó IGF1 100 ng/ml como control positivo.

Los resultados de Akt fosforilada se expresan en absorbancia por μ g de proteína (Abs/ μ g proteína) luego de 2 horas de

incubación y en % de la condición de control sin tratamiento (100 %).

Los resultados de T389 S6 cinasa 1 fosforilada se expresan en
5 absorbancia por μg de proteína (Abs/ μg proteína) luego de 2
horas de incubación y en % de la condición de control sin
tratamiento (100 %).

Todos los resultados se expresan en % del control sin
10 tratamiento. Se evaluaron las diferencias entre los valores
obtenidos mediante ANOVA para las mediciones repetidas
seguido por un análisis t de Dunnett; si ANOVA revela
diferencias significativas, por una prueba U de Mann-Whitney
para comparar los controles sin tratamiento con los extractos
15 vegetales o IGF1; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, en
función del control sin tratamiento.

Todos los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM. Para
todos los parámetros evaluados, los análisis estadísticos se
20 llevaron a cabo mediante el uso de una prueba no paramétrica
de Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn (GraphPad
PRISM®4). Se realizó la comparación entre dos condiciones
mediante el uso de una prueba de Mann Whitney. Un valor p de
0.05 se consideró significativo.

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) se establece como un factor anabólico que puede inducir el crecimiento del músculo esquelético mediante la activación de la vía fosfoinositida 3-cinasa (PI3K)/Akt/diana de rapamicina en mamíferos (mTOR). La estimulación de la fosforilación de tanto S6K1 como Akt ya había sido informada por Miyazaki et ál. (Miyazaki M, 2010). Por lo tanto, el IGF-1 se seleccionó como control positivo del experimento. La fosforilación basal de S6K1 fue cuatro veces mayor en presencia de concentraciones normales de aminoácidos que en la presencia de concentración baja de aminoácidos (0.8 mM en comparación con 0.08 mM).

En la presencia de una concentración baja de aminoácidos, todas las fracciones analizadas, con la excepción de F7, a todas las dosis analizadas aumentaron la fosforilación de S6K1 (ver Figuras 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b, 7a y 7b). Los efectos no dependieron de la dosis en las dosis analizadas.

En la presencia de una concentración normal de aminoácidos, la dosis más baja de cada fracción, con la excepción de F3, y la concentración intermedia de F0, F3 y F5 estimularon la

fosforilación de S6K1 (ver Figuras 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b, 7a y 7b). Los efectos observados fueron menores que los observados con IGF-1 y fueron significativos únicamente para las fracciones F0, F1 y F3 (dosis más baja o intermedia). Debe observarse que en una condición de solubilidad parcial del extracto F7 de concentraciones intermedia y alta analizado, se informó una caída en la fosforilación de S6K1. Figuras 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b, 7a y 7b: determinación de la fosforilación de S6K1 en treonina 389 en miotubos C2C12 después de la incubación con 5 preparaciones diferentes del extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones.

Se incubaron cinco preparaciones diferentes del extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones durante 2 h en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados. Al final de la incubación, las células se lisaron, las proteínas solubles totales se cuantificaron y el nivel de fosforilación de S6K1 en el residuo de treonina 389 se midió y normalizó con la proteína beta-actina. Promedio $\pm$ SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 en comparación con valor de control.

Se informó previamente que IGF-1 estimula la fosforilación de Akt y en este contexto se seleccionó como una referencia

positiva en el ensayo (Miyazaki M, 2010). Después de la incubación de IGF-1 (100 ng/mL, 2 h), la fosforilación de Akt se activó por un factor 1.6x. Se publicaron anteriormente resultados similares para la fosforilación de Akt por Latres
5 o Miyazaki (Latres E, 2005) (Miyazaki M, 2010).

En presencia de una concentración normal o baja de aminoácidos, se observó una estimulación no significativa de la fosforilación de Akt para todas las distintas fracciones
10 analizadas a la dosis más baja, con la excepción de la fracción F0 incubada con una concentración baja de aminoácidos y F3 incubada con una concentración normal de aminoácidos, donde se observó un aumento no significativo con la dosis intermedia.

15

Se observó que el nivel basal de la fosforilación de Akt fue dos veces mayor en la presencia de la condición normal de aminoácidos en comparación con la condición baja de aminoácidos. Finalmente, en condición de solubilidad parcial
20 de los extractos F1 (concentración alta) o F7 (concentraciones intermedia y alta), se registró una caída en la fosforilación de Akt independientemente de la concentración de aminoácidos utilizada.

Figuras 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 10b, 11a, 11b, 12a, 12b:
determinación de la fosforilación de Akt en treonina 308 en
miotubos C2C12 después de la incubación con 5 preparaciones
diferentes del extracto de *Rhaponticum* a tres
5 concentraciones.

Se incubaron cinco preparaciones diferentes del extracto de
Rhaponticum a tres concentraciones durante 2 h en la
presencia de miotubos C2C12 diferenciados. Al final de la
10 incubación, las células se lisaron, las proteínas solubles
totales se cuantificaron y el nivel de fosforilación de Akt
en el residuo de treonina 308 se midió y normalizó con la
proteína beta-actina. Promedio $\pm$ SEM. *p < 0.05; **p < 0.01;
***p < 0.001 en comparación con valor de control.

15

**EJEMPLO 13: efecto de 5 preparaciones diferentes de extractos
de *Rhaponticum carthamoides* en la síntesis de proteínas
(incorporación de leucina tritiada) en miotubos C1C12 (ETAPA
1 tal como se representa en la Figura 29a).**

20 Se diseñó un estudio para evaluar la capacidad de extractos
vegetales para estimular la síntesis de proteínas mediante la
medición de la incorporación de la leucina tritiada. Se
prepararon las células C2C12 y las cinco preparaciones
distintas de los extractos de *Rhaponticum* tal como en el

Ejemplo 12.

Para el ensayo de síntesis de proteínas, se recolectaron células en crecimiento y se colocaron en placas a una densidad de 30 000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 48 h en CO₂ al 5 % a 37 °C. Después de que las células alcanzaron 80 % de confluencia, el medio se reemplazó con un medio de diferenciación (DMEM + FBS al 2 %). Luego de 5 días, los mioblastos se fusionaron en miotubos multinucleados. Se determinó la síntesis de proteínas mediante la medición de la incorporación de la leucina de aminoácidos tritiada. Brevemente, 1 h antes de la prueba de leucina, se incubaron las células en un medio libre de aminoácidos. Luego, las células se incubaron durante 2 h 30 en presencia de: leucina radiomarcada 5 µCi/mL e IGF1 100 ng/mL o extracto vegetal en presencia de una concentración normal (0.8 mM) o baja (0.08 mM) de aminoácidos y con DMSO al 0.002 %.

Todos los resultados se expresan en % del control sin tratamiento. Se evalúan las diferencias entre los valores obtenidos mediante ANOVA para las mediciones repetidas seguido por un análisis t de Dunnett; si ANOVA revela diferencias significativas, por una prueba U de Mann-Whitney

para comparar los controles sin tratamiento con los extractos vegetales o IGF1; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, en función del control sin tratamiento.

5 Todos los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM. Para todos los parámetros evaluados, los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn (GraphPad PRISM®4). Se realizó la comparación entre dos condiciones
10 mediante el uso de una prueba de Mann Whitney. Un valor p de 0.05 se consideró significativo.

El IGF1 indujo la síntesis de proteínas en presencia de una concentración baja (+45 %, $p < 0,001$) o normal (+21 %, $p < 0,001$) de aminoácidos. La prueba se validó dado que los
15 datos sobre la síntesis de proteínas con IGF-1 son similares a los datos registrados en la bibliografía que describían un aumento en la síntesis de proteínas de 20 - 50 % en presencia de IGF1 con una concentración baja o normal de aminoácidos
20 (Kazi AA, 2010) (Broussard SR, 2004). Se observó que la incorporación de radioactividad fue mayor en presencia de una concentración baja de aminoácidos, lo que indica que la competición entre la leucina radioactiva y la leucina fría fue más débil que en presencia de una concentración normal de

aminoácidos, como se esperaba.

Entre las distintas preparaciones de *R. Carthamoides*, las fracciones F0 (EtOH al 50 % natural), F5 (extracto EtOH al 70 % purificado) y F7 (extracto EtOH al 70 %) fueron capaces de estimular significativamente la síntesis de proteínas. Esta estimulación fue equivalente o mayor que la referencia del ensayo: IGF1 (IGF-1 100 ng/mL +21 % $p < 0.001$ en comparación con F0 10 µg/mL +43 % $p < 0.001$ o F5 300 µg/mL +23 % $p < 0.01$ o F7 10 µg/mL +29 % $p < 0.001$). La fracción F5 estimuló la síntesis de proteínas en una manera dependiente de la dosis y con efecto significativo de 30 µg/mL, correspondiente a una concentración de 20HE de 1 µM. De forma adicional, las fracciones F0 y F7 presentaron el mejor efecto con la dosis menor (respectivamente equivalente a 20HE 0.04 µM y 0.1 µM). La estimulación de la síntesis de proteínas inducida por la fracción F0 de 10 µg/mL fue significativamente mayor que la observada con IGF-1.

Las fracciones F1 (extracto acuoso) y F3 tuvieron un efecto muy leve, no significativo, en presencia de aminoácidos bajos; esto también fue cierto para F3 a una mayor concentración de aminoácidos.

Figuras 13a, 13b, 14a, 14b, 15a, 15b, 16a, 16b, 17a, 17b: determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con 5 preparaciones diferentes del extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones.

5

Se incubaron cinco preparaciones diferentes del extracto de *Rhaponticum* a tres concentraciones durante 2 h 30 en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados y leucina tritiada (5 μ Ci). Al final de la incubación, las células se lisaron,
10 las proteínas solubles totales se cuantificaron y se contó el nivel de la leucina tritiada incorporada en las células. Promedio $\pm$ SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 en comparación con valor de control.

15 En resumen de estos experimentos, en presencia de una concentración normal de aminoácidos, las fracciones F0, F5 y F7 estimularon significativamente la síntesis de proteínas. Esta estimulación fue similar o mayor que la referencia del ensayo, IGF-1 (IGF-1 100 ng/mL +20 % p < 0.001 en comparación
20 con F0 10 μ g/mL +43 % p < 0.001 o F5 300 μ g/mL +23 % p < 0.01 o F7 10 μ g/mL +29 % p < 0.001). Estas fracciones también estimularon la vía de señalización (fosforilaciones Akt y S6K1) a las dosis bajas analizadas. Se observaron problemas de solubilidad para F1 1300 μ g/mL y F7 1000 μ g/mL en todos

los ensayos.

Por otro lado, las fracciones F1 y F3 no estimularon la síntesis de proteínas. Sin embargo, se observó algo de
5 estimulación de las fosforilaciones de Akt y S6K1 con estas fracciones.

En conclusión, la fracción F0 y, en menor medida, la fracción F7, ambas a concentraciones menores (equivalentes a
10 20HE 0.04 - 0.1 μ M), aumentaron la fosforilación de Akt y S6K1, lo que se correlacionó con un aumento significativo en la síntesis de proteínas.

**EJEMPLO 14: efecto de una preparación seleccionada de
15 extracto de *Rhaponticum carthamoides* con *Rhodiola* en la síntesis de proteínas (incorporación de leucina tritiada) en miotubos C1C12 (ETAPA 2a y b tal como se representa en la Figura 29a).**

En nuestra condición experimental, se obtuvieron los mejores
20 resultados con las dosis más bajas de la fracción F0 en presencia de una concentración normal de aminoácidos, lo que muestra la estimulación de la síntesis de proteínas y la activación de la señalización (inducción de las fosforilaciones de S6K1 y Akt) (ver Ejemplo 13). Por lo

tanto, esta fracción se seleccionó para analizarse en un experimento de coincubación con otra preparación de extracto vegetal derivada de la especie *Rhodiola* que contiene salidroside como componente activo.

5

El extracto de *Rhodiola* utilizado contenía:

Tabla 7:

N.º	Extracto	% de salidroside	% de rosavina	Observación
1	<i>Rhodiola</i>	2.88 %	3.49 %	Polvo marrón

10

En una primera parte del estudio, se registró el mejor efecto para el extracto vegetal de *Rhaponticum* con la fracción F0 en su dosis más baja, se llevó a cabo una nueva evaluación de respuesta a la dosis a 0.1 - 1 - 10 µg/mL en la síntesis de proteínas en paralelo a un análisis de respuesta a la dosis del extracto de *Rhodiola*. Las concentraciones de *Rhodiola* elegidas fueron: 10 - 104 - 417 µg/mL, correspondientes a las concentraciones finales de salidroside de 1 - 10 - 40 µM.

20

Tabla 8:

5

Compuesto	% de cantidad de hidroxiecdisona (% 20 HE)	Concentración final del extracto después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentración final en hidroxiecdisona (en pocillos)
F0 (extracto líquido NE-ETOH al 50 %)	0.21 %	1 µg/mL	0.004 µM
		5 µg/mL	0.02 µM
		10 µg/mL	0.04 µM

Tabla 9:

10

15

Compuesto	% de salidroside	% de rosavina	Concentración final de <i>Rhodiola</i> después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentración final en salidroside (en pocillos)	Concentración final en rosavina (en pocillos)
<i>Rhodiola</i>	2.88 %	3.49 %	10.4 µg/mL	1.0 µM	0.8 µM
			104.3 µg/mL	10.0 µM	8.5 µM
			417.1 µg/mL	40.0 µM	34.0 µM

Para este estudio, se obtuvieron las células C2C12 tal como se describió en el Ejemplo 12. El ensayo de síntesis de proteínas se llevó a cabo tal como se describió en el Ejemplo 13, con la excepción de que se utilizaron leucina radiomarcada 5 µCi/mL e IGF1 100ng/mL, extracto F0 a 1, 5 y 10 µg/ml o extracto de *Rhodiola* a 10, 104 y 417 µg/ml en la

presencia de una concentración normal (0.8 mM) de aminoácidos y con DMSO al 0.005 %.

Figuras 18a y 18b: determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum* a tres concentraciones.

Se incubaron extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum* a tres concentraciones durante 2 h 30 en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados y leucina tritiada (5 μ Ci). Al final de la incubación, las células se lisaron, las proteínas solubles totales se cuantificaron y se contó el nivel de la leucina tritiada incorporada en las células. Promedio $\pm$ SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 en comparación con valor de control.

Todos los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM. Para todos los parámetros evaluados, los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn (GraphPad PRISM®4). Se realizó la comparación entre dos condiciones mediante el uso de una prueba de Mann Whitney. Un valor p de 0.05 se consideró significativo.

El IGF1 indujo la síntesis de proteínas en presencia de una concentración normal de aminoácidos tal como se había registrado anteriormente (Kazi AA, 2010) (Broussard SR, 2004). Este resultado confirmó nuestros datos previos generados en la etapa 1 (IGF-1 de etapa 1 +21 %, $p < 0.001$ en comparación con IGF-1 de etapa 2 +27 %, $p < 0.01$).

La fracción F0 pudo estimular de forma significativa la síntesis de proteínas a 1 $\mu\text{g/mL}$ (ver Figuras 18a y 18b). Esta estimulación fue similar a la referencia del ensayo: IGF-1 (IGF-1 100 ng/mL o F0 1 $\mu\text{g/mL}$ +27 % $p < 0.01$). Se observó una estimulación de la síntesis de proteínas con F0 10 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, no alcanzó una importancia estadística y fue menor que en la primera etapa (+16 % en comparación con +43 %). Esta diferencia puede deberse a la mayor concentración de DMSO utilizada en este experimento, en función de la solubilidad del extracto de *Rhodiola* y la anticipación del siguiente experimento de coincubación. Estos resultados indicaron que el o los compuestos activos en el extracto F0 en la síntesis de proteínas son sensibles a la concentración de DMSO.

El extracto de *Rhodiola* indujo la síntesis de proteínas a la concentración más baja (+23 %, $p < 0.01$). Esta actividad fue

similar a la de IGF-1. Por el contrario, a 417 µg/mL, la *Rhodiola* inhibió la síntesis de proteínas (ver Figuras 18a y 18b). Sin embargo, esta dosis alta se debió probablemente al límite de solubilidad del extracto y eso podría conducir al efecto perjudicial sobre la síntesis de proteínas.

Por lo tanto, para los siguientes experimentos de coincubación, se decidió analizar el extracto F0 de *Rhaponticum* y el extracto de *Rhodiola* a 1 y 10 µg/mL, solos y en combinación, en DMSO a una concentración final de 0.005 %. Cada preparación se sometió a sonicación para mejorar la solubilidad.

En una segunda etapa, se estudiaron diferentes combinaciones de ambos extractos vegetales para determinar si se podía registrar un efecto de potenciación en la síntesis de proteínas.

Para este estudio, se obtuvieron las células C2C12 tal como se describió en el Ejemplo 12. El ensayo de síntesis de proteínas se llevó a cabo tal como se describió en el Ejemplo 13, con la excepción de que se utilizaron leucina radiomarcada 5 µCi/mL e IGF1 100ng/mL, extracto F0 a 1 y 10 µg/ml o extracto de *Rhodiola* a 1 y 10 µg/ml o una combinación

de F0 con *Rhodiola* a diferentes concentraciones en la presencia de una concentración normal (0.8 mM) de aminoácidos y con DMSO al 0.005 %.

5 **Tabla 10:**

10

Compuesto	% de Sali- drosida	% de rosa- vina	Concentra- ción final de <i>Rhodiola</i> después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentra- ción final en salidrosida (en pocillos)	Concentra- ción final en rosavina (en pocillos)
<i>Rhodiola</i>	2.88 %	3.49 %	1.0 µg/mL	0.1 µM	0.1 µM
			10.4 µg/mL	1.0 µM	0.8 µM

15 **Tabla 11:**

20

Compuesto	% de cantidad de hidroxiecdisona (% 2 HE)	Concentración final del extracto después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentración final en hidroxiecdisona (en pocillos)
F0 (extracto líquido NE-ETOH al 50 %)	0.21 %	1 µg/mL	0.004 µM
		10 µg/mL	0.04 µM

Figuras 19a, 19b, 20a, 20b y 21: determinación de la síntesis de proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum*, solos o en combinación, a dos concentraciones.

5

Se incubaron dos concentraciones de extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum* durante 2 h 30 en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados y leucina tritiada (5 μ Ci). De forma adicional, se incubó una combinación de extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum* cada uno a dos concentraciones durante 2 h 30 en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados y leucina tritiada (5 μ Ci). Al final de la incubación, las células se lisaron, las proteínas solubles totales se cuantificaron y se contó el nivel de la leucina tritiada incorporada en las células. Promedio $\pm$ SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 en comparación con valor de control.

El IGF1 indujo significativamente la síntesis de proteínas en presencia de una concentración normal de aminoácidos tal como se registró anteriormente (+22 %, p < 0.05 en comparación con +27 %, p < 0.01 y + 21%, p < 0.001 en estudios anteriores).

La *Rhodiola* indujo en gran medida y de forma significativa la síntesis de proteínas a 10 μ g/ml tal como se registró

anteriormente (+30 %, $p < 0.001$ en comparación con +23 %, $p < 0.01$ en la etapa anterior) (ver Figuras 19a, 19b, 20a, 20b y 21).

5 F0 indujo de forma significativa la síntesis de proteínas a 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ tal como se registró anteriormente. De manera similar a la etapa 1, la inducción de la síntesis de proteínas por parte de F0 (10 $\mu\text{g/mL}$) fue significativa y mayor que el efecto de IGF-1. La diferencia con el
10 experimento de la etapa 2a puede deberse a la etapa de sonicación durante la solubilización del extracto. Los efectos de F0 y *Rhodiola* en la síntesis de proteínas fueron similares cuando se consideraron dosis equivalentes (ver Figuras 19a, 19b, 20a, 20b y 21).

15

Se observó una potenciación con dosis bajas de ambos extractos (F0 y *Rhodiola* 1:1 +19 %, $p < 0.05$ en comparación con 1 $\mu\text{g/ml}$ +14 % NS y *Rhodiola* 1 $\mu\text{g/ml}$ +10 % NS). El aumento en la síntesis de proteínas con la combinación fue superior
20 al del extracto de *Rhaponticum* o *Rhodiola* solo y, por lo tanto, se observó un efecto de potenciación.

Todos, F0 solo (10 $\mu\text{g/ml}$), *Rhodiola* sola (10 $\mu\text{g/ml}$) y la combinación de estos, aumentaron de forma significativa la

síntesis de proteínas en comparación con el control. No obstante, no se observó potenciación de la síntesis de proteínas con la combinación de dosis altas de *Rhodiola* y F0 en comparación con cada extracto solo (F0 y *Rhodiola* 10:10 +28 % $p < 0.001$ en comparación con F0 10 $\mu\text{g/ml}$ +29 % $p < 0.001$ y *Rhodiola* 10 $\mu\text{g/ml}$ +30 % $p < 0.001$).

Se observó un efecto menor que cada extracto solo a dosis alta (10 $\mu\text{g/ml}$) pero un efecto mayor que cada extracto solo a dosis baja (1 $\mu\text{g/ml}$) con las combinaciones de dosis alta de un extracto y de dosis baja del otro (F0 y *Rhodiola* 1:10 +16 % NS en comparación con F0 1 $\mu\text{g/ml}$ +14 % NS y *Rhodiola* 10 $\mu\text{g/ml}$ +30 % $p < 0.001$ o F0 y *Rhodiola* 10:1 +19 % $p < 0.05$ en comparación con F0 10 $\mu\text{g/ml}$ +29 % $p < 0.001$ y *Rhodiola* 1 $\mu\text{g/ml}$ +10 % NS).

EJEMPLO 15: evaluación de dos concentraciones del extracto F0 de *Rhaponticum* y dos concentraciones del extracto de *Rhodiola* en la expresión génica de miostatina y atrogina Y COMBINACIÓN DE ESTOS (Etapa 2c tal como se representa en la Figura 29a)

Se llevó a cabo un estudio para determinar si existe una potenciación en otros procesos fisiológicos y efecto de los extractos solos y en combinación en la proteólisis muscular mediante la medición del efecto de los extractos y la

combinación de estos en la expresión génica de miostatina y atrogina 1. El extracto F0 de *Rhaponticum* y el extracto de *Rhodiola* utilizados como se describió en el Ejemplo 14.

5 Para el ensayo de expresión génica, se recolectaron células en crecimiento y se colocaron en placas a una densidad de 30 000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 48 h en CO₂ al 5 % a 37 °C. Después de que las células alcanzaron 80 % de confluencia, el
10 medio se remplazó con un medio de diferenciación (DMEM + FBS al 2 %). Luego de 5 días, los mioblastos se fusionaron en miotubos multinucleados.

Las células se trataron con el extracto F0 a 1 y 10 µg/ml o
15 extracto de *Rhodiola* a 1 y 10 µg/ml o combinación de F0 con *Rhodiola* a diferentes concentraciones durante 6 h. Al final del experimento, las células C2C12 se lisaron en una solución de trizol y se extrajo y purificó ARN mediante el uso del método fenol/cloroformo. Se cuantificó la cantidad de ARN
20 después de la extracción mediante espectrofotómetro (260 nm/280 nm/320 nm) y se suspendió a una concentración final de 1 µg/µL. Posteriormente, se utilizó 1 µg de ARN como plantilla para la síntesis del ADNc de primera cadena mediante el uso de cebadores oligo(dT) y el sistema de

transcriptasa inversa del AMV, tal como lo describe el fabricante (Applied Biosystems 4368814). Luego, se llevaron a cabo qPCR mediante el uso de un sistema de detección rápido de PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems) y el programa qPCR estándar (1 ciclo 95 °C 15 min, 40 ciclos 95 °C 15 s y 60 °C 1 min, una curva de fusión 60 a 95 °C para sondas sybr green). Se llevaron a cabo experimentos de termociclado en una mezcla maestra para SYBR green qPCR (Applied Biosystems) para los genes de beta actina, miostatina y atrogina que contienen las muestras de 100 ng de ADNc y un conjunto de cebadores a una concentración final de 200 nM diseñado en dos exones diferentes.

Todos los resultados se expresan como promedio $\pm$ SEM. Para todos los parámetros evaluados, los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn (GraphPad PRISM®4). Se realizó la comparación entre dos condiciones mediante el uso de una prueba de Mann Whitney. Un valor p de 0.05 se consideró significativo.

Tabla 12:

5	Compuesto	% de Sali- drosida	% de rosa- vina	Concentra- ción final de <i>Rhodiola</i> después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentra- ción final en salidrosida (en pocillos)	Concentra- ción final en rosavina (en pocillos)
10	<i>Rhodiola</i>	2.88 %	3.49%	1.0 µg/mL	0.1 µM	0.1 µM
				10.4 µg/mL	1.0 µM	0.8 µM

Tabla 13:

15	Compuesto	% de cantidad de hidroxiecdisona (% 2 HE)	Concentración final del extracto después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentración final en hidroxiecdisona (en pocillos)
20	F0 (extracto líquido NE-ETOH al 50 %)	0.21 %	1 µg/mL	0.004 µM
			10 µg/mL	0.04 µM

En la bibliografía, diversos artículos informan sobre la inhibición de la expresión génica de atrogina de alrededor de 40 % después de una incubación durante 24 h con IGF-1 a

10 ng/mL (Latres E, 2005) (Stitt TN, 2004). No se publicaron
datos sobre la inhibición de la expresión génica de
miostatina por IGF-1 dado que la mayoría de los estudios se
enfocaron en el antagonismo de IGF-1 del efecto perjudicial
5 de la miostatina (Trendelenburg AU, 2009). Sin embargo,
internamente, registramos un efecto inhibidor de 20 - 40 %
del IGF-1 en la expresión génica de miostatina. En función de
la bibliografía y los datos internos, IGF-1 se seleccionó
como nuestro control positivo en este ensayo. En este
10 experimento, IGF1 inhibió significativamente las expresiones
génicas de miostatina y atrogina (respectivamente, -25 %, $p < 0.001$ y -59 %, $p < 0.001$).

Figuras 23a, 23b, 24a y 24b: efecto de la coincubación de los
15 extractos F0 de *Rhaponticum* y *Rhodiola* en la expresión génica
de miostatina en miotubos C2C12. Se incubó una combinación de
extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum*, cada uno a dos
concentraciones durante 6 h en la presencia de miotubos C2C12
diferenciados. Al final de la incubación, las células se
20 lisaron y se extrajo el ARN, se convirtió en ADNc para llevar
a cabo un PCR cuantitativo. Promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; **
 $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ en comparación con valor de control;
$p < 0.001$ en comparación con valor de control (prueba de
Mann-Whitney).

La *Rhodiola* inhibió, de forma significativa y dependiente a la dosis, la expresión génica de miostatina (-15 % NS y -54 % $p < 0.001$ a dosis baja y alta, respectivamente), mientras que
5 tuvo un leve efecto, no significativo, en la expresión génica de atrogina a la dosis más alta (-13 % NS) (ver Figuras 22a y 22b).

F0 indujo una reducción leve pero no significativa en la
10 expresión génica de miostatina (-10 % NS y -21 % NS a dosis baja y alta, respectivamente), pero no tuvo ningún efecto en la expresión génica de atrogina (+12 % NS y -4 % NS a dosis baja y alta, respectivamente).

15 Figuras 22a y 22b: efecto de los extractos F0 de *Rhaponticum* y *Rhodiola* en la expresión génica de miostatina y atrogina en miotubos C2C12.

Se incubaron extractos de *Rhodiola* y F0 de *Rhaponticum* a dos
20 concentraciones durante 6 h en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados. Al final de la incubación, las células se lisaron y se extrajo el ARN, se convirtió en ADNc para llevar a cabo un PCR cuantitativo. Promedio $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ en comparación con valor de control;

$p < 0.001$ en comparación con valor de control (prueba de Mann-Whitney).

Los resultados de la expresión génica de miostatina se
5 presentan en las figuras 23a, 23b, 24a y 24b.

La combinación de F0 10 $\mu\text{g/mL}$ y *Rhodiola* 1 $\mu\text{g/mL}$ indujo una
disminución significativa en la expresión génica de
miostatina (-23 %; $p < 0.05$ en comparación con el control),
10 mientras que F0 10 $\mu\text{g/mL}$ solo indujo únicamente -24 % (NS en
comparación con el control) y *Rhodiola* 1 $\mu\text{g/mL}$ únicamente
-15 % (NS en comparación con el control). Por lo tanto, la
disminución con la combinación fue superior al de cada
extracto solo y se observó un efecto de potenciación.

15

F0 y *Rhodiola* 1 $\mu\text{g/mL}$ solos o en combinación indujeron una
disminución leve no significativa en la expresión génica de
miostatina. La magnitud del efecto fue mayor con la
combinación (-19 % NS) en comparación con F0 solo (-10 %) o
20 *Rhodiola* sola (-15 % NS) (ver Figuras 23a, 23b, 24a y 24b).

Rhodiola 10 $\mu\text{g/mL}$ inhibió, en gran medida y de forma
significativa, la expresión génica de miostatina; sin
embargo, en presencia de F0 1 $\mu\text{g/mL}$ o 10 $\mu\text{g/mL}$, no se observó

un efecto de potenciación dado que el efecto inhibitor de las combinaciones fue sistemáticamente menor que el de la *Rhodiola* (10 µg/mL) sola.

- 5 Figuras 25a, 25b, 26a y 26b: efecto de la coincubación de los extractos F0 de *Rhaponticum* y *Rhodiola* en la expresión génica de atrogina en miotubos C2C12.

Se incubó una combinación de extractos de *Rhodiola* y F0 de
10 *Rhaponticum* cada uno a dos concentraciones durante 6 h en la presencia de miotubos C2C12 diferenciados. Al final de la incubación, las células se lisaron y se extrajo el ARN, se convirtió en ADNc para llevar a cabo un PCR cuantitativo. Promedio ± SEM. *p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 en
15 comparación con valor de control; ### p < 0.001 en comparación con valor de control (prueba de Mann-Whitney).

La combinación de F0 1 µg/mL y *Rhodiola* 10 µg/mL indujo una disminución en gran medida y significativa en la expresión
20 génica de atrogina (-31 %; p < 0.05 en comparación con el control), mientras que cada fracción sola no lo hizo: F0 1 ug/ml solo indujo un aumento de 21 % (NS en comparación con el control) y *Rhodiola* 10 ug/ml, una disminución de -13 % (NS en comparación con el control). Por lo tanto, la disminución

con la combinación fue superior al de cada extracto solo y se observó un gran efecto de potenciación.

La combinación de F0 10 µg/mL y *Rhodiola* 1 µg/mL disminuyó la
5 expresión génica de atrogina de forma no significativa (-10 %
NS) y esta disminución fue superior a la de F0 sola (-4 % NS)
o *Rhodiola* sola (+25 % NS).

F0 y *Rhodiola* 1 µg/mL no tuvieron efecto significativo en la
10 expresión génica de atrogina sola o en combinación. Se debe
observar que la magnitud del efecto fue mayor con la
combinación (-3 % NS) en comparación con F0 sola (+21 % NS) o
Rhodiola sola (+25 % NS) tal como se representa en las
Figuras 25a, 25b, 26a y 26b.

15

F0 y *Rhodiola* 10 µg/mL tuvieron un efecto muy leve pero no
significativo en la expresión génica de atrogina sola o en
combinación, y no se observó efecto de potenciación.

20 En conclusión, la combinación de F0 1 µg/mL y *Rhodiola*
10 µg/mL presentó un efecto de potenciación en la inhibición
de la expresión génica de atrogina. La disminución con la
combinación fue superior al de cada extracto solo y se
observó un gran efecto de potenciación.

EJEMPLO 16: evaluación de 4 preparaciones nuevas de la fracción F0 del extracto de *Rhaponticum* a 2 concentraciones (etapa 3 tal como se representa en la Figura 29a).

5 Para mejorar los resultados obtenidos en la síntesis de proteínas y para aumentar la posibilidad de tener un producto mejor y más puro para probarse en el modelo animal, la fracción F0 se procesó de forma diferente y se purificó de forma adicional para obtener nuevas fracciones. F0 Ne-ETOH
10 corresponde al F0 inicial analizado previamente en los Ejemplos 12, 13, 14 y 15. La fracción F1 correspondía a la fracción F1 de los Ejemplos 12 y 13. Luego de atomización de la fracción F0, se generó la fracción F0 seca. Luego de una dilución de la fracción F0 en una solución acuosa y
15 purificación en columna, se generó la fracción F5'.

Tabla 14:

Compuesto	% de cantidad de hidroxiecdisona (% 20 HE)	Concentración final del extracto después de la dilución en DMEM (en pocillos)	Concentración final en hidroxiecdisona (en pocillos)
F0 (extracto líquido NE-ETOH al 50 %)	0.21 %	11.4 µg/mL	0.05 µM
		22.9 µg/mL	0.1 µM

5	F0 (extracto de fracción seca)	0.37 %	6.5 µg/mL	0.05 µM
			13.0 µg/mL	0.1 µM
10	F1 (extracto acuoso primario)	0.18 %	13.4 µg/mL	0.05 µM
			26.7 µg/mL	0.1 µM
	F5' (extracto de fracción de etanol derivado de F0)	2.50 %	1.0 µg/mL	0.05 µM
			1.9 µg/mL	0.1 µM

Se obtuvieron las células del músculo esquelético C2C12 tal como en el Ejemplo 12. El ensayo de síntesis de proteínas se llevó a cabo tal como en los Ejemplos 13 y 14, con la excepción de que se utilizaron leucina radiomarcada 5 µCi/mL e IGF1 100 ng/mL, extracto F0 a 11.4 y 22.9 µg/ml o extracto seco de F0 a 6.5 y 13 µg/ml o extracto F1 a 13.4 y 26.7 µg/ml o extracto F5' a 1 y 1.9 µg/ml en presencia de una concentración normal (0.8 mM) de aminoácidos y con DMSO al 0.005 %. Al final de los experimentos, se descartaron los sobrenadantes y las células se lisaron en hidróxido de sodio 0.1 N durante 30 min. Luego, se contó la radioactividad asociada a la fracción soluble de la célula y se determinó la cuantificación de la proteína mediante el uso del método

colorimétrico de Lowry.

Cada condición se analiza en n=6. IGF1 100 ng/ml se utilizó como control positivo de la señalización y estimulación de la síntesis de proteínas. Los resultados de la síntesis de proteínas se expresan en cpm/ μ L/2.5 h y en % de la condición de control sin tratamiento (100 %).

Los resultados se presentan en las Figuras 27a, 27b y 28.

10

IGF1 indujo significativamente la síntesis de proteínas en presencia de una concentración normal de aminoácidos (+25 %, $p < 0.001$) tal como se registró anteriormente en las etapas 1-2a-2b (etapa 1 +21 %, $p < 0.001$; etapa 2a +27 %, $p < 0.01$; etapa 2b +21 %, $p < 0.05$ en comparación con la etapa 3 +25 %, $p < 0.001$). Se registraron resultados similares en la bibliografía en presencia de una concentración normal de aminoácidos (Kazi AA, 2010) (Broussard SR, 2004).

20 El extracto F0 de *Rhaponticum* NE-EtOH al 50 % (extracto natural EtOH al 50 %) indujo significativamente la síntesis de proteínas a 20HE 0.05 μ M y 20 HE 0.1 μ M (respectivamente +20 %, $p < 0.01$ y +18 %, $p < 0.05$). La estimulación de la síntesis de proteínas por la fracción F0 se documentó

previamente a 20HE 0.04 μ M (+29 %, $p < 0.001$ en la etapa 2B).

A 0.05 μ M y 0.1 μ M, el efecto en la síntesis de proteínas es significativo pero más débil que a 0.04 μ M.

5 El extracto F0 de *Rhaponticum* EtOH al 50 % (forma en polvo seco) indujo la síntesis de proteínas a ambas concentraciones, pero la estimulación fue grande y significativa únicamente a la dosis más baja (+33 %, $p < 0.00$ a 6.5 μ g/mL correspondiente a HE 0.05 μ M). El efecto fue
10 mayor que el efecto observado con la fracción F0 NE-EtOH al 50 %.

No se observó efecto de la fracción F5' (extracto EtOH al 50 % purificado) en la síntesis de proteínas a cualquiera de
15 las concentraciones finales de 20HE analizadas.

La fracción F1 acuosa no purificada presentó mayor actividad en la síntesis de proteínas que la preparación de NE-EtOH al 50 % y sus fracciones derivadas. A una concentración final de
20 20HE 0.05 μ M, la fracción F1 mostró un porcentaje similar de estimulación de síntesis de proteínas que la fracción F0 seca (+30 %, $p < 0.001$ y +33 %, respectivamente, $p < 0.001$). Independientemente de la concentración final de 20HE, el efecto de la fracción F1 en la síntesis de proteínas fue

similar.

Entre las diferentes fracciones de *Rhaponticum* analizadas, las fracciones F1 (extracto acuoso), F0 NE-ETOH al 50 %
5 (extracto natural ETOH al 50 %) y F0 seca (polvo atomizado de F0 ETOH al 50 %) presentaron un efecto estimulador significativo en la síntesis de proteínas. Para cada fracción positiva, se observó el mejor efecto a la dosis más baja de 20HE (0.05 μ M). El mayor efecto en la síntesis de proteínas
10 se obtuvo con el polvo atomizado de F0 ETOH al 50 %.

Por otro lado, la fracción F5', derivada de F0 NE-ETOH al 50 % y enriquecida en 20HE, no estimuló la síntesis de proteínas. Todos estos resultados sugieren que el efecto en
15 la síntesis de proteínas de los extractos de *Rhaponticum* no depende únicamente de la concentración de 20HE y que otros u otros componentes activos capaces de promover la síntesis de proteínas se encuentran presentes en los extractos activos. Figuras 27a, 27b y 28: determinación de la síntesis de
20 proteínas en miotubos C2C12 después de la incubación con diferentes preparaciones de extractos de *Rhaponticum* a dos concentraciones.

Se incubaron cuatro preparaciones diferentes de extractos de

Rhaponticum a dos concentraciones en presencia de miotubos C2C12 diferenciados y 5 μ Ci de leucina tritiada durante 2 h 30. Al final de la incubación, las células se lisaron, las proteínas solubles totales se cuantificaron y se contó el nivel de la leucina tritiada incorporada en las células. Promedio $\pm$ SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 en comparación con valor de control.

Observamos una potenciación con la combinación de *Rhodiola* (1 μ g/ml) y *Rhaponticum* (1 μ g/ml) en el ensayo de síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas puede estimularse mediante la inhibición de la miostatina objetivo. Welle et ál. demostraron en ratones maduros que la miostatina tiene una influencia inhibitoria tónica en la velocidad de la síntesis de proteínas miofibrilares, incluso después de que los músculos están completamente desarrollados (Welle S, 2008). El bloqueo de miostatina o su ausencia natural conduce a un aumento significativo en la masa muscular (Lee SJ, 2005). En nuestro experimento, registramos una disminución de la expresión génica de miostatina luego del tratamiento de C2C12 con el extracto vegetal de *Rhodiola* a 10 μ g/mL (equivalente a 10 ppm) dos veces mejor que el IGF-1 de referencia. Es

interesante que Zubeldia et ál. registraron que los miotubos tratados durante 6 h con un extracto de *Ajuga turkestanica* a 20 ppm (extracto vegetal que contiene ecdisona, que incluye 20HE y turkesterona) inhibían de forma significativa la expresión génica de miostatina y la inhibición era dos veces mayor que la inhibición inducida por el esteroide anabólico metandrostenolona (1 μ M) (Zubeldia JM, 2012).

La fracción F0 de *Rhaponticum* no mostró efecto significativo en la expresión génica de miostatina, mientras que la *Rhodiola* (10 μ g/mL) sola la redujo significativamente. A nuestro entender, no se registró en la bibliografía un efecto directo de *Rhodiola* en la expresión génica de miostatina. Además, en nuestro estudio se observó la potencialización del efecto de la inhibición de la expresión génica de miostatina con la combinación de extractos de *Rhodiola* o *Rhaponticum*. Tal como se observó para la síntesis de proteínas, no se documentó anteriormente un efecto de potenciación de ambos extractos (*Rhaponticum* y *Rhodiola*).

20

La ganancia de masa muscular es un equilibrio entre síntesis de proteínas, proteólisis y diferenciación de células satélite. La atrogina-1 o atrofia muscular de caja F (MAFbx) es una importante ubiquitina ligasa E3 relacionada con la

atrofia expresada en gran medida en el músculo esquelético durante la atrofia muscular y otros estados de enfermedad, tales como sepsis, caquexia cancerosa y ayuno (Cong H, 2011). Exploramos el sistema de ubiquitina proteasoma. Ninguno de los extractos solos presentó un efecto significativo en la expresión génica de atrogina. Por el contrario, es interesante que se haya observado un efecto de potenciación de la inhibición de la expresión génica de atrogina (-31 %, $p < 0.05$) cuando la fracción F0 del extracto de *Rhaponticum* se incubó en presencia del extracto de *Rhodiola* en una relación de 1:10. Cong et ál. mostró que la reducción de la atrogina mediante el uso del adenovirus SiMAFbx conduce a una inhibición de la expresión génica de 55 %, una inhibición del nivel de proteína de 60 % y un aumento en la masa muscular de 20 %. Se mostró que la atrogina se dirigió a la degradación de MyoD en la atrofia del músculo esquelético (Lagirand-Cantaloube J, 2009).

RESULTADOS SOBRE AMINOÁCIDOS BAJOS:

Tabla 15:

AMINOÁCIDOS BAJOS (Etapa 1)			
Fracción	cantidad del extracto	síntesis de proteínas	pS6K
IGF-1	100 ng/mL	145 %**	479 %**

5	F0 NE-ETOH al 50 %	10 µg/mL	115 %	195 %**
		100 µg/mL	114 %	137 %*
		1000 µg/mL	121 %*	231 %**
10	F1 acuoso	12.6 µg/mL	115 %	208 %**
		127 µg/mL	105 %	187 %**
		1265 µg/mL	110 %	204 %**
15	F3 acuoso	2.4 µg/mL	104 %	252 %**
		24.5 µg/mL	121 %	271 %**
		245 µg/mL	102 %	268 %**
	F5 EtOH al 70%	3 µg/mL	98 %	208 %**
		30 µg/mL	92 %	122 %
		300 µg/mL	99 %	121 %
	F7 EtOH al 70%	10 µg/mL	92 %	153 %
		100 µg/mL	97 %	41 %**
		1000 µg/mL	107 %	37 %**

En presencia de aminoácidos bajos, no se registró una inducción significativa de la síntesis de proteínas, con la excepción de la fracción F0 EtOH al 50 %; sin embargo, la estimulación de la síntesis de proteínas o la fosforilación de pS6K1 fue dos veces menor que la inducida por IGF-1. Se observó que, en casi todas las condiciones, la señalización de pS6K1 se activó, pero probablemente no alcanzó el umbral

necesario para inducir una respuesta fisiológica. De hecho, en una condición de aminoácidos bajos, el nivel de pS6K1 fue menor que el observado en la condición de control en presencia de una concentración de aminoácidos normal (máximo de 1.2 para la mejor fracción en comparación con 2.1 para el control en presencia de una concentración de aminoácidos normal). Por lo tanto, es preferible utilizar extractos vegetales en presencia de una concentración normal de aminoácidos.

10

F3, F5 y F5' son fracciones purificadas de extractos acuosos (fracciones en azul) o de etanol (fracciones en naranja). En todas las fracciones purificadas, no se observó actividad de estimulación en la síntesis de proteínas o se observó a un nivel menor que el de la solución madre. Estos datos indican que, durante la etapa de purificación, se perdieron una o más moléculas durante el proceso de purificación.

15

Tabla 16:

Fracción	Mejor estimulación de síntesis de proteínas	[20He]
F1 etapa 3	130-127 % ***	0.05 - 0.1 μ M
F0 EtOH al 50 % etapa 1	143 % ***	0.04 μ M

20

5	F0 EtOH al 50 % etapa 3	120 % ***	0.05 μ M
	F0 seco etapa 3	133 % ***	0.05 μ M
	F7 EtOH al 70% etapa 1	129 % ***	0.1 μ M
	F5 purificado etapa 1	123 % ***	10 μ M
	F1 etapa 1	Sin activación	0.1-1-10 μ M
10	F3 purificado etapa 1	Sin activación	0.1-1-10 μ M
	F5' purificado etapa 3	Sin activación	0.05-0.1 μ M

15 No se encontró una correlación real entre la concentración de
20HE y la estimulación de la síntesis de proteínas. Sin
embargo, en la fracción sin purificar en la que se registró
la mayor estimulación de la síntesis de proteína, la mejor
concentración de 20HE aparentemente fue de entre 0.05 y
20 0.1 μ M. Estos resultados sugieren que 20HE no fue la única
molécula activa implicada en la activación de la síntesis de
proteínas. Por lo tanto, obtener información sobre el perfil
molecular en las diferentes fracciones será de especial
interés para determinar qué cóctel de moléculas contribuye a

la estimulación de síntesis de proteínas.

Tabla 17:

5	Fracción activa	Cantidad de extracto	Síntesis de proteínas
	F0	1-5 µg/mL	actividad baja
		10-100 µg/mL	actividad máxima
		1000 µg/mL	actividad media
	F0 seco	6.4 µg/mL	actividad máxima
10	F1 etapa 3	13-26 µg/mL	actividad máxima
	F5	30 µg/mL	actividad máxima
		300 µg/mL	actividad máxima
	F7	3 µg/mL	actividad máxima

15 La actividad máxima del extracto vegetal de *Rhaponticum* se observó a una concentración de entre 10 µg/mL y 100 µg/mL. Cuando la fracción perdió una parte de su actividad debido a la etapa de purificación, se observó que el extracto tuvo que analizarse a una concentración mayor para observar un efecto

20 similar en la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la mejor concentración para la evaluación in vitro del extracto vegetal de *Rhaponticum* es 10 - 100 µg/mL.

Tabla 18:

	<i>Rhaponticum</i>	<i>Rhodiola</i>	<i>Rhaponticum</i> + <i>Rhodiola</i>
5 Síntesis de proteínas	+ + +	+ + +	0
Atrogina	0	+ + +	0
miostatina	0	0	+ + + +

Ambos extractos de *Rhaponticum* y *Rhodiola* estuvieron activos
 10 en la síntesis de proteínas; cada extracto por sí solo
 aumentó la síntesis de proteínas de 20 - 30 %, alcanzando el
 nivel superior que puede obtenerse en el ensayo. El efecto de
 potenciación en la síntesis de proteínas se apreciará mejor
 en el nivel de su vía de señalización, dado que el límite
 15 máximo de estimulación se encuentra por encima de 100 %
 cuando se mide pAkt o pS6K.

El extracto de *Rhodiola* indujo la inhibición de la expresión
 génica de miostatina, pero se observó un efecto beneficioso
 20 menor cuando se coincubó *Rhodiola* y la fracción F0 de
Rhaponticum. Los resultados sugieren que la o las moléculas
 en la fracción F0 fueron capaces de antagonizar el efecto
 beneficioso del extracto de *Rhodiola*. La identificación y
 prepurificación de esta o estas sustancias podría mejorar el

efecto de la coincubación.

Ninguno de los extractos por sí mismos presentó una expresión
génica de atrogina, mientras que, en determinadas condiciones
5 de coincubación (F0 1 µg/mL y *Rhodiola* 10 µg/mL) se observó
un efecto de potenciación en la inhibición de la expresión
génica de atrogina. Se observó un efecto sinérgico y
beneficioso de parte de los extractos de *Rhodiola* y
Rhaponticum en la proteólisis.

10

En conclusión, este estudio mostró que el extracto de EtOH al
50 % del extracto de *Rhaponticum* fue la fracción más potente
de todas las fracciones evaluadas con respecto a la
estimulación de síntesis de proteínas. El extracto de
15 *Rhodiola* también aumentó en gran medida la síntesis de
proteínas. Cuando se coincubó con la fracción F0 de
Rhaponticum, se pudo mostrar un mayor efecto en este
parámetro en comparación con cada extracto por sí mismo
(cuando se mezcló cada extracto a una concentración de
20 1 µg/ml).

En paralelo, el extracto de *Rhodiola* disminuyó en gran medida
la expresión génica de miostatina a 10 µg/ml, pero no se
observó un mejor efecto cuando se coincubó con la fracción F0

de *Rhaponticum*. Cabe destacar que se observó un efecto de potenciación en la expresión génica de miostatina cuando se combinó *Rhodiola* (1 µg/ml) y *Rhaponticum* (1 µg/ml), mediante lo cual la expresión del gen de miostatina fue menor (si bien no significativamente) en comparación con cada extracto por sí mismo.

Se pudo observar un efecto sinérgico inhibitorio de la mezcla de extractos en la expresión génica de atrogina, lo que sugiere un impacto beneficioso de la mezcla de los extractos de *Rhaponticum* y *Rhodiola* en la proteólisis, además de su efecto en la síntesis de proteínas.

**EJEMPLO 17: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DEL
EXTRACTO DE RHODIOLA Y DEL EXTRACTO DE RHAPONTICUM EN LA
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS MUSCULARES Y LA VÍA ASOCIADA, LA MASA
MUSCULAR Y LA FUERZA MUSCULAR EN UN MODELO ANIMAL**

Se analizó la combinación de los extractos de *Rhodiola* y *Rhaponticum* con respecto a su efecto en la fuerza física, el peso muscular, la fosforilación de Akt muscular y el lactato, glucosa en plasma y contenido de proteínas.

Se obtuvo el extracto seco de la raíz de *Rhaponticum carthamoides* (F0 - EtOH al 50 % polvo seco) mediante

extracción con etanol al 50 % (v/v) en agua tal como se describió en el Ejemplo 1. Preferentemente, el extracto puede contener aproximadamente (% p/p) 20HE al 0.395 %, ecdisteroides totales al 0.79 % y polifenol total (Folin ciocalteu) al 13.4 % en función del peso total en seco del extracto vegetal.

El extracto etanólico de la raíz de *Rhodiola rosea* puede obtenerse preferentemente de modo de comprender aproximadamente (% p/p) salidrosidias al 3.41 %, rosavina al 3.12 % y rosavinas al 4.20 % (como suma de rosarina, rosavina y rosina) en función del peso total en seco del extracto vegetal.

15 Ambos extractos se encontraban en forma de polvo con humedad < 5 %. Los extractos se mezclaron a una relación de 50:50 (p/p) en función del peso total de la composición. En algunas pruebas, no se agregaron excipientes adicionales ni portador.

20 Esta combinación de dos extractos de raíz de *Rhodiola rosea* y raíz de *Rhaponticum carthamoides* se analizó con respecto a compuestos objetivo:

Se trataron ratas Wister machos con la combinación de

extracto a una dosis de 50 mg/kg en peso corporal (n=10) o con vehículo (n=10) durante un período de 6 semanas. La combinación se administró mediante sonda una vez al día.

5 Se evaluó la fuerza de agarre del miembro anterior de las ratas Wistar antes (día 0) y luego de 42 días de tratamiento (día 43) y se calculó la evolución de la fuerza de agarre del día 0 al día 43 como delta (fuerza de agarre a d43 - fuerza de agarre a d0). Como se conoce en la técnica, esta prueba de
10 fuerza de agarre tiene el objetivo de medir la fuerza de agarre de los miembros anteriores y posteriores de las ratas y se utilizaron por terceros para, por ejemplo, medir la fuerza luego de la administración de 20HE (Feldman-Gorelick et ál., 2008, JAFc).

15

Tal como se ilustra en la Figura 30a, el aumento de la fuerza de agarre delta en el grupo tratado con la mezcla fue 45 % mayor que el aumento observado en el grupo de control sin tratamiento. De forma adicional, tal como se ilustra en la
20 Figura 30b, cuando la fuerza de agarre delta se registró de forma alternativa en función del peso corporal (es decir, Kg de fuerza/g peso corporal), el grupo tratado con la mezcla fue incluso 40 % mayor que el aumento observado en el grupo de control sin tratamiento.

Se midió el peso de la rata dos veces por semana, durante cada semana del período de tratamiento. Se midió la glucosa en plasma y el lactato antes del tratamiento y después de 6
5 semanas de tratamiento (antes y después del ejercicio).

Al final de 43 días de tratamiento (día 44), luego de la prueba de fuerza de agarre y de extraer muestras de sangre, los animales fueron sacrificados. Se retiraron y se pesaron
10 los músculos de los miembros anteriores y miembros posteriores (extensor largo de los dedos (EDL, por sus siglas en inglés), sóleo, cuádriceps, tibial y tríceps) de las ratas Wistar. Tal como se muestra en las Figuras 31a y 31b, se observó un aumento de 5 % en el peso de EDL y en la relación
15 peso del EDL con respecto al peso corporal ($p < 0.05$ Mann-Whitney para ambos). De forma adicional, tal como se ilustra en las Figuras 32a y 32b, también se descubrió un aumento en el peso del músculo sóleo y en la relación peso del sóleo con respecto al peso corporal. No se registró modificación
20 sustancial en el peso muscular en los otros músculos.

Se midió el contenido de proteínas y fosforilación de Akt en los músculos muestreados. La combinación de *Rhaponticum* y *Rhodiola* administrada a 50 mg/kg durante 6 semanas no cambió

significativamente la cantidad de proteínas dentro del músculo EDL (en μg de proteína por mg de tejido; Figura 33a) y la cantidad total de proteínas del EDL (mg por músculo; Figura 33b). Sin embargo, se observó un aumento del contenido de proteína (en μg de proteína por mg de tejido; +10 %, $p = 0.08$, Figura 34a) y la cantidad de proteína total del EDL (mg por músculo; +14 %, Figura 34b) en el músculo sóleo en las ratas Wistar.

10 **EJEMPLO 18: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE 8 SEMANAS CON LA COMBINACIÓN DEL EXTRACTO DE *RHODIOLA* Y EL EXTRACTO DE *RHAPONTICUM* EN LA COMPOSICIÓN CORPORAL, LA MASA MUSCULAR, LA FUERZA MUSCULAR Y LA RESISTENCIA AL EJERCICIO EN HOMBRES ACTIVOS DE FORMA RECREATIVA DURANTE UN PROGRAMA DE**
15 **ENTRENAMIENTO DE RESISTENCIA**

Dado los resultados de los estudios in vitro y en animales, se postula que la suplementación a hombres activos de forma recreativa de la mezcla descrita durante el entrenamiento de resistencia puede proporcionar beneficios adicionales en términos de aumento de fuerza y tamaño muscular. El objetivo del presente estudio es determinar los efectos de la suplementación de la preparación descrita a hombres activos de forma recreativa durante 8 semanas de entrenamiento de resistencia externa dinámica constante (DCER, por sus siglas

en inglés) en la fuerza y en el área transversal del músculo del muslo.

El objetivo principal del presente estudio es evaluar los efectos de la suplementación durante 8 semanas de la combinación de los extractos de *Rhaponticum/Rhodiola* (ver Ejemplo 17 para la descripción de la mezcla) en la fuerza muscular (1RM, prensa de piernas y levantamiento de pesas en banco). La prueba puede evaluar la fuerza muscular en el cuerpo superior e inferior mediante la prueba de ejercicio de 1RM, prensa de piernas y levantamiento de pesas a 4 y 8 semanas.

Los objetivos secundarios son evaluar los efectos de la suplementación durante 8 semanas con la combinación de los extractos de *Rhaponticum/Rhodiola* en la composición corporal y la masa muscular (DXA), el contenido de proteína en el músculo, la glucosa en sangre y la resistencia/tiempo hasta el agotamiento durante el ejercicio de entrenamiento de resistencia.

El estudio puede ser un estudio aleatorizado, controlado con placebos, doble ciego, de grupo paralelo. De acuerdo con su aleatorización, los participantes pueden tomar dosis bajas

(100 mg) o altas (400 mg) del suplemento o de un placebo todos los días durante 8 semanas. Los cambios en la fuerza muscular (fuerza muscular del cuerpo superior e inferior) pueden evaluarse en la semana 0 (punto de referencia), semana 5 4 y semana 8 mediante el uso de 1RM, prensa de piernas y levantamiento de pesas. Los cambios en la composición corporal y la masa muscular pueden evaluarse en la semana 0 y la semana 8 mediante el uso de DEXA. Se puede llevar a cabo el análisis y la biopsia muscular en la semana 0 y la semana 10 8. La resistencia/tiempo hasta el agotamiento puede medirse mediante el aumento de la repetición de 1RM en la semana 0 (previo al tratamiento; punto de referencia) y a la semana 8. La fatiga mental puede evaluarse mediante el uso del cuestionario del índice de esfuerzo percibido (RPE, por sus 15 siglas en inglés) en la semana 0 (previo al tratamiento, punto de referencia) y a la semana 8.

Para verificar las respuestas metabólicas intensas a la ingesta del suplemento (al comienzo y al final de la fase de 20 suplementación), puede realizarse una ingesta intensa del suplemento luego de un estudio aleatorizado, doble ciego, cruzado, controlado con placebo. Luego de una ingesta intensa de dosis baja (200 mg) o alta (400 mg) del suplemento o del placebo, se puede evaluar la fuerza muscular (fuerza muscular

del cuerpo superior e inferior) tal como se describió anteriormente. Se pueden medir los parámetros biológicos, tales como glucosa en sangre y el lactato en sangre.

- 5 Para el estudio, se pueden reclutar hombres en edad universitaria (por ejemplo, de 18-35 años de edad) activos de forma recreativa para formar parte del estudio. Los participantes pueden inscribirse en el estudio si cumplen con todos los criterios de inclusión y no presentan ninguno de
- 10 los criterios de exclusión (determinado por los cuestionarios). Se puede obtener aprobación ética del Comité de Ética de la universidad correspondiente.

Los participantes pueden incluirse en el estudio si:

- 15 no son fumadores;
- tienen de 18 a 35 años;
- con un IMC de 19 - 29.9 kg/m²;
- tienen un peso estable (es decir, no han aumentado ni bajado más de 3 kg/m² en los últimos 3 meses);
- 20 son activos de forma recreativa, es decir, asisten al gimnasio aproximadamente dos veces a la semana pero no siguen ningún entrenamiento intensivo ni programa de competición (a determinar el tipo de deporte que realizan de forma recreativa y la frecuencia/intensidad);

- han seguido un entrenamiento de peso al menos 2 veces por semana durante los 3 meses previos al comienzo del estudio; no toman ninguna medicación (establecer una duración limitada antes del comienzo del estudio) y/o durante el último mes no
- 5 han ingerido ningún suplemento nutricional que el investigador considere que influya en el metabolismo, el peso corporal y/o el apetito; y
- no han ingerido niveles ergogénicos de suplementos nutricionales que puedan afectar la masa muscular (por
- 10 ejemplo, creatina, HMB, etc.) y/o suplementos que puedan afectar los niveles de hormonas catabólicas/anabólicas (por ejemplo, androstenediona, DHEA, etc.) durante 1 mes (a determinarse) antes del comienzo del estudio.
- 15 Se excluirá a los participantes que:
- son fumadores;
- asisten al gimnasio más de dos veces por semana y/o siguen cualquier tipo de entrenamiento intensivo o programa de competición (a determinar el tipo de deporte no deseado y la
- 20 frecuencia/intensidad);
- tienen un diagnóstico actual de una afección médica importante;
- tienen historia o síntomas de trastornos metabólicos, endócrinos o cardíacos;

toman medicación o suplementos y/o han ingerido durante el último mes cualquier suplemento nutricional que el investigador considere que influya en el metabolismo, peso corporal y/o apetito; o

han ingerido niveles ergogénicos de suplementos nutricionales que puedan afectar la masa muscular (por ejemplo, creatina, HMB, etc.) y/o suplementos que puedan afectar los niveles de hormonas catabólicas/anabólicas (por ejemplo, androstenediona, DHEA, etc.) durante 1 mes (a determinarse) antes del comienzo del estudio.

Los participantes se pueden asignar a uno de dos grupos independientes: tratamiento o placebo (20 participantes en cada grupo). Los grupos se pueden hacer coincidir lo más posible en función de las características físicas.

El producto del estudio puede ser la combinación de los extractos de *Rhodiola* y *Rhaponticum* tal como se describió en el Ejemplo 17. Se pueden analizar dos dosis en el estudio: una dosis baja (100 mg) y una dosis alta (400 mg) del producto de prueba. Se puede utilizar un placebo coincidente inerte que consiste en celulosa.

Todos los participantes pueden completar una prueba a base de fuerza antes de la fase de suplementación (0 semanas) y a la semana 4 y semana 8. Se puede evaluar una repetición máxima (1RM; el peso mayor que puede levantarse en un ejercicio específico de la forma correcta) en el cuerpo superior o inferior mediante ejercicios de levantamiento de pesas (uso de la máquina Smith) y prensa de piernas, respectivamente.

Antes y después de la suplementación durante 8 semanas, se puede registrar el peso y la altura del participante, así como también la circunferencia de la cintura y el contorno de las extremidades. La composición corporal y el peso muscular pueden evaluarse mediante DEXA en el punto de referencia (0 semanas) y a las 8 semanas, el día antes de 1RM de ejercicio.

15

Las biopsias musculares, previas o posteriores a la suplementación, pueden llevarse a cabo para medir la proteína fosforilada en comparación con la proteína total, el análisis de proteína, las vías de Akt/pS6K1 y el tamaño de diámetro de fibra muscular. También se puede medir la glucosa en sangre.

20

Para la resistencia/tiempo al agotamiento, estos parámetros pueden medirse mediante aumento de la repetición de 1RM. La fatiga mental puede evaluarse mediante el uso del

cuestionario del índice de esfuerzo percibido (RPE).

Todos los participantes pueden completar un programa de entrenamiento supervisado de 8 semanas, de dos sesiones por semana, para verificar la homogeneidad del ejercicio entre los participantes. La carga de entrenamiento puede ser un porcentaje establecido del punto de referencia de mediciones de 1RM y el programa de entrenamiento puede progresar en intensidad cada 2 semanas. Los participantes pueden entrenar 2-3 veces por semana bajo supervisión de un entrenador de acondicionamiento y de fuerza calificado. Todas las sesiones de entrenamiento pueden llevarse a cabo en la mañana y cada sesión puede durar aproximadamente 90 min. Cada sesión puede consistir en un calentamiento estandarizado, 4 x 6 repeticiones de cada ejercicio (con una recuperación de 4 min entre series) y un enfriamiento. Se pueden realizar ejercicios que se dirigen a la musculatura del cuerpo superior (por ejemplo, levantamiento de pesas en banco, empuje de hombros y fondo de tríceps con peso) e inferior (por ejemplo, prensa de piernas y extensión de piernas, flexiones de isquiotibiales). El índice de esfuerzo percibido puede registrarse en intervalos durante las sesiones de entrenamiento. Se pueden enseñar técnicas correctas para cada ejercicio a todos los participantes antes del comienzo del

estudio.

Para controlar la ingesta de proteínas en la alimentación de los participantes, un nutricionista recomendó dietas que favorecen la ingesta de proteínas y se pueden utilizar registros nutricionales en forma de recordatorios de 24 horas sobre la ingesta de alimentación y analizarlos a las semanas 0, 4 y 8.

Se pueden computar los valores promedio a las semanas 0, 4 y 8. Se puede evaluar el cambio del punto de referencia en cada momento y dentro de cada grupo mediante el uso de la medición ANOVA repetida (o ANOVA unidireccional si hay únicamente dos momentos).

15

Además, se puede calcular el cambio del punto de referencia ($\Delta T_x - T_0$) para cada variable y los cambios promedio pueden compararse entre grupos mediante el uso de ANOVA de múltiples vías.

20

Se espera que los resultados muestren un aumento de masa muscular, de fuerza muscular (1RM), del tamaño de fibra muscular y del contenido de proteínas. Se espera que la suplementación aumente el tiempo al agotamiento/resistencia

al ejercicio y mejore el umbral de la fatiga mental.

**EJEMPLO 19: ANÁLISIS DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE *RHODIOLA* O
DEL EXTRACTO DE *RHAPONTICUM* O UNA COMBINACIÓN DE AMBOS EN LA
5 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS MUSCULARES DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO DE
RESISTENCIA EN EL MODELO ANIMAL**

Se analizó el extracto de *Rhodiola* o el extracto de
Rhaponticum por sí solos o la combinación de ambos extractos
con respecto a su efecto en la estimulación de síntesis de
10 proteínas musculares después de un ejercicio de entrenamiento
de resistencia intenso.

Se adquirieron ratas Wistar Han de 11 semanas de edad de
Charles River (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Rhône,
15 Francia) y se alojaron a una humedad y temperatura ambiente
constante y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de
12/12h. Se alimentaron con 30 g/día de alimento de bajas
proteínas especial para ratas, sin proteínas, antioxidantes
ni vitaminas (ver tablas más adelante que muestran la lista
20 de ingredientes y los valores nutricionales de la
alimentación) para acercarse a una alimentación para humanos
sin fortificar activos de forma recreativa y obtenida por
SAFE (siglas en inglés correspondientes a Alimentos e
ingeniería científica animal, Augy, Francia) y se proporcionó

agua *ad libitum*. Las ratas tenían 12 semanas al comienzo del experimento y luego se consideraron totalmente como adultos.

Tabla 19: Lista de ingredientes de la alimentación de bajas proteínas A04 especial de SAFE (Augy, Francia)

	CD_FORM	U8220P
	CD_VER	0264
	10 % PROTEÍNAS BAJAS A04	
	Líneas de etiqueta	Suma de QT_DOS
10	CEBADA SELECCIONADA	391
	TRIGO	300
	MAÍZ	200
	SALVADO	50
	FOSFATO DICÁLCICO	12
15	BICARBONATO OLIGOS PM	10
	PCR DE SOJA TTX	10
	CARBONATO CÁLCICO	10
	VITAMINA A03 / A04	7
	ACEITE DE SOJA	5
20	PESCADO SOLUBLE DESGRASADO	5
	Total	1000

Tabla 20: Valores nutricionales de la alimentación de bajas

proteínas A04 especial de SAFE (Augy, Francia)

	COMPOSICIÓN _ g/100 g	Sobre bruto
5	Agua	12.8
	Materia seca	87.2
	Proteína (Nx5,8) (Nx6,25)	10.5
	Grasa (hidrólisis)	2.6
10	Minerales	4.7
	Celulosa	3.45
	Almidón	52.82
	Azúcares	6.5
	ENA	65.9
15	ATWATER Kcal/Kg	3291.1
	ATWATER MJ/kg	13.8

El experimento se llevó a cabo en 8 grupos de 8 ratas, que recibieron el tratamiento correspondiente tal como se indica a continuación:

Grupo 1 (grupo de control): CMC (carboximetilcelulosa) al 0.5 % como vehículo y control negativo.

Grupo 2: 0.21 mg/ml de proteína de suero Milical

Grupo 3: 10 mg/ml de extracto de raíz de *Rhodiola rosea*

5 Grupo 4: 10 mg/ml de extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides*

Grupo 5: 20 mg/ml *Rhodiola* / *Rhaponticum*, relación 50:50
(p/p)

10

Grupo 6: 10 mg/ml *Rhodiola* / *Rhaponticum*, relación 50:50
(p/p)

15

Grupo 7: 5 mg/ml *Rhodiola* / *Rhaponticum*, relación 50:50
(p/p)

Grupo 8: 2 mg/ml *Rhodiola* / *Rhaponticum*, relación 50:50
(p/p)

20 Se informan las correspondientes dosis equivalentes en humanos (en mg/kg de peso corporal y en mg/día) así como también la dosificación correspondiente en mg/kg del peso corporal de ratas en la Tabla 21 a continuación.

Tabla 21: Dosis equivalentes en humanos utilizadas para alimentar los diferentes grupos de animales en el estudio del
Ejemplo 19

5	Conversión de la dosis en humanos a ratas	HED (mg/día)	HED (mg/kg) *	Dosis diaria en ratas (mg/kg del peso corporal)
	Grupo 1 - vehículo:	-	-	-
10	Grupo 2 - proteína de cebada	10400	173	910
	Grupo 3 - <i>Rhodiola</i>	500	8.33	43.5
	Grupo 4 - <i>Rhaponticum</i>	500	8.33	43.5
15	Grupo 5 <i>Rhodiola/Rhaponticum</i> , relación 50:50 (p/p), dosis 1	1000	16.67	87.1
20	Grupo 5 <i>Rhodiola/Rhaponticum</i> , relación 50:50 (p/p), dosis 2	500	8.33	43.5
	Grupo 5 <i>Rhodiola/Rhaponticum</i> , relación 50:50 (p/p), dosis 3	250	4.17	21.8

5	Grupo 5 <i>Rhodiola/Rhaponticum</i> , relación 50:50 (p/p), dosis 4	100	1.67	8.7
---	--	-----	------	-----

*Fórmula de la FDA, 2005: Dosis equivalente en humanos HED
(mg/kg) = dosis animal en mg/kg x (peso animal en kg/peso
humano en kg)^{0.33}

10

Se obtuvo el extracto seco de la raíz de *Rhaponticum*
carthamoides (F0 - EtOH al 50 % polvo seco) mediante
extracción con etanol al 50 % (v/v) en agua tal como se
describió en el Ejemplo 1. Preferentemente, el extracto puede
15 contener aproximadamente (% p/p) 20HE al 0.395 %,
ecdisteroides totales al 0.79 % y polifenol total al 13.4 %
(Folin ciocalteu) en función del peso total en seco del
extracto vegetal.

20 El extracto etanólico de la raíz de *Rhodiola rosea* puede
obtenerse de modo de preferentemente comprender
aproximadamente (% p/p) salidrosidias al 2.45%, rosavina al
1.14% y rosavinas al 2.43 % (como suma de rosarina, rosavina
y rosina) en función del peso total en seco del extracto

vegetal.

Ambos extractos se encontraban en forma de polvo con < 5 % de humedad. Los extractos se mezclaron a una relación de 50:50
5 (p/p) en función del peso total de la composición. En algunas pruebas, no se agregaron excipientes adicionales ni portador.

Esta combinación de los dos extractos de raíz de *Rhodiola rosea* y raíz de *Rhaponticum carthamoides* se analizó con
10 respecto a compuestos objetivo.

Entrenamiento

Luego de una semana de adaptación, 16 ratas se dividieron de forma aleatoria en 2 grupos de 8 ratas. 72 horas antes del
15 entrenamiento, las ratas realizaron una sesión de aprendizaje para familiarizarse a la escalera y ayunaron 24 horas antes del experimento.

En el día del experimento, 4 ratas del mismo grupo se
20 entrenaron de manera oportuna en una escalera de un metro de altura. Cada grupo de 4 ratas escaló 10 veces con una carga que alcanzó sucesivamente 0 % de su masa corporal, 50 % y 75 % de su masa corporal. Entre cada escalada, se permitió que las ratas descansaran durante 2 min y 5 minutos entre

cada serie.

Se sujetaron bolsas con peso a la base de la cola con cinta.

- 5 Luego del entrenamiento, las ratas continuaban en ayunas y no recibieron nuevos alimentos.

Administración de fármaco

- Se administraron fármacos inmediatamente luego de cada sesión
10 de entrenamiento por sonda oral.

Las soluciones se prepararon de manera improvisada en CMC al 0.5 %.

15 Disección y extirpación de los músculos

- Dos horas después del entrenamiento, se inyectó a las ratas de forma intraperitoneal 10 mM puromicina 100 µL/25g (SigmaAldrich, Número de catálogo P8833) y se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de 150 mg.kg⁻¹ de
20 pentobarbital (PENTOBARBITAL ®).

Luego de menos de 30 minutos después de la inyección de puromicina, se cosecharon el músculo flexor común profundo del dedo derecho (FDP), el músculo deltoides y el bíceps y se

colocaron en una solución de isopentano, se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis bioquímico.

5 **Dosificación y extracción de proteína**

Se homogeneizaron 20 mg de cada muestra en 10 volúmenes de amortiguador de lisis (Tris 20 mM, pH 6.8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 al 1 %) con cócteles de proteasa inhibitoria (P8340, Sigma Aldrich). Las proteínas de músculo
10 totales se extraen con IKA ULTRA TURRAX T25 digital. El homogeneizado se giró durante 10 min a 4 °C y se recolectó el sobrenadante.

Cuantificación de síntesis de proteínas

15 La síntesis de proteínas totales se analizó mediante análisis de transferencia Western con antipuuromicina.

Se desnaturalizaron muestras de proteínas de 50 µg, se separaron en SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una
20 membrana de nitrocelulosa. Se aplicó el anticuerpo primario de antipuuromicina (anticuerpo antipuuromicina, clon 12D10 de EMD Millipore (1/3000)) durante la noche a 4 °C y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ECL IgG antirrátón, de GE

Healthcare UK Limited).

La cuantificación de la incorporación de puromicina en las cadenas de proteínas (a través de la formación de un enlace peptídico) mediante análisis cuantitativo de imagenología de transferencia Western representa la síntesis de proteínas *de novo* (inducción de la síntesis de proteínas) en músculos *in vivo* y representa la estimulación de la síntesis de proteínas luego de una sesión de entrenamiento en función de la administración del fármaco (Goodman y Hornberger, 2013). Por lo tanto, la síntesis de proteínas se expresa como la tasa relativa de síntesis de proteínas como un % de la condición de control (grupo de animales alimentados con vehículo) u otras condiciones.

15

Todos los valores se expresan como promedio $\pm$ SEM. Se utilizó ANOVA de LSD de Fisher para comparar datos. La importancia se estableció en $p < 0.05$.

20

Tal como se ilustra en la Figura 35a, que muestra el análisis de transferencia Western del músculo flexor común profundo de los dedos (FDP) de los ocho animales para cada tratamiento, y en la Figura 35b, que muestra las unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga total de

proteínas cuantitativa y el grupo de control negativo, el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo, pero no el extracto de raíz de *Rhodiola rosea*, fue capaz de estimular significativamente la síntesis de proteínas y a un menor
5 grado que cualquiera de las concentraciones (con dosis decrecientes) de la combinación de ambos extractos.

La combinación de los extractos (para las cuatro dosis decrecientes analizadas: de HED = 1000 mg/día a 100 mg/día)
10 fue, de hecho, significativamente superior al extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo y al extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo, tal como se muestra en las Figuras 35d y 35e respectivamente (que muestran unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la
15 carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de *Rhodiola* o el grupo de *Rhaponticum* respectivamente). Asimismo, el efecto de la combinación de los extractos (para las cuatro dosis decrecientes analizadas: de HED = 1000 mg/día a 100 mg/día) también fue significativamente superior
20 a las proteínas de suero, tal como se muestra en la Figura 35c (que muestra unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de proteínas de suero). La Tabla 22 ilustra la diferencia entre los resultados obtenidos mediante

el uso de dosis diferentes de la combinación en comparación con lo que se podría haber esperado de los resultados del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo o del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo. De forma inesperada, la combinación de la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* mostró un mejor efecto que *Rhodiola* o *Rhaponticum* a concentración completa por sí solos sobre el efecto en la estimulación de la síntesis de proteínas en el FDP. Esto es sinergia. Además, el efecto de la combinación de la mitad de la concentración de *Rhodiola* y la mitad de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (1.9 veces más) que el esperado. Aun adicionalmente, el efecto de la combinación de un cuarto de la concentración de *Rhodiola* y un cuarto de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (3.0 veces más) que el esperado. Finalmente, el efecto de la combinación de 10 veces menos concentración de *Rhodiola* y 10 veces menos concentración de *Rhaponticum* también mostró un efecto mayor (5.8 veces más) que el esperado. Estos resultados claramente demuestran la sinergia de la combinación de los extractos en la estimulación de la síntesis de proteínas en el músculo FDP luego de un ejercicio de resistencia intenso a 500 mg/día, 250 mg/día y 100 mg/día de la relación de combinación 50:50

(p/p) .

Tabla 22: Síntesis de proteínas en el músculo FDP (como unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de control negativo)

10	HED del extracto de raíz de <i>Rhodiola rosea</i> (mg/día)	HED del extracto de raíz de <i>Rhaponticum carthamoides</i> (mg/día)	Efecto esperado (% de síntesis de proteínas)	Efecto medido (% de síntesis de proteínas)	Relación medida en comparación con esperada
15	500	0		154	
	0	500		212	
	500	500	366	314	
	250	250	183	346*	x 1.9
	125	125	92	280*	x 3.0
	50	50	46	266*	x 5.8

*: resultados importantes no esperados con la combinación del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides*, relación 50:50 (p/p)

Tal como se ilustra en la Figura 36a, que muestra el análisis de transferencia Western del músculo deltoides de los ocho

animales para cada tratamiento, y en la Figura 36b, que muestra las unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de control negativo, ni el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo ni el extracto de raíz de *Rhodiola rosea* fueron capaces de estimular significativamente la síntesis de proteínas, si bien la combinación de ambos extractos estimularon significativamente la síntesis de proteínas a la HED decreciente 1000 mg/día, 500 mg/día y 250 mg/día.

La combinación de extractos (para tres HED decrecientes: 500 mg/día a 100 mg/día) fue de hecho significativamente superior al extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo, tal como se muestra en la Figura 36d (que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de *Rhodiola*). La combinación de extractos (de HED: 1000mg/día a 100 mg/día) también fue superior al extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo, tal como se muestra en la Figura 36e (que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de *Rhaponticum*). Asimismo, el efecto de la combinación de los extractos (para HED = 1000 mg/día y

500 mg/día) también fue significativamente superior a las proteínas de suero, tal como se muestra en la Figura 36c (que muestra unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de proteínas de suero). La Tabla 23 (a continuación) ilustra la diferencia entre los resultados obtenidos mediante el uso de dosis diferentes de la combinación en comparación con lo que se podría haber esperado de los resultados del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo o del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo. De forma inesperada, la combinación de la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* mostró un mejor efecto que *Rhodiola* o *Rhaponticum* a concentración completa por sí solos sobre el efecto en la estimulación de la síntesis de proteínas en el deltoides. Esto es sinergia. Además, el efecto de la combinación de la mitad de la concentración de *Rhodiola* y la mitad de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (1.6 veces más) que el esperado. Aun adicionalmente, el efecto de la combinación de un cuarto de la concentración de *Rhodiola* y un cuarto de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (3.4 veces más) que el esperado. Finalmente, el efecto de la combinación de 10 veces menos concentración de *Rhodiola* y 10

veces menos concentración de *Rhaponticum* también mostró un efecto mayor (5.4 veces más) que el esperado. Estos resultados claramente demuestran la sinergia de la combinación de los extractos en la estimulación de la síntesis de proteínas en el músculo deltoides luego de un ejercicio de resistencia intenso a 500 mg/día, 250 mg/día y 100 mg/día de la relación de combinación 50:50 (p/p).

Tabla 23: Síntesis de proteínas en el músculo deltoides (como unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de control negativo)

HED del extracto de raíz de <i>Rhodiola rosea</i> (mg/día)	HED del extracto de raíz de <i>Rhaponticum carthamoides</i> (mg/día)	Efecto esperado (% de síntesis de proteínas)	Efecto medido (% de síntesis de proteínas)	Relación medida a esperada
500	0		99	
0	500		170	
500	500	269	198	
250	250	135	219*	x 1.6
125	125	67	228*	x 3.4
50	50	34	185*	x 5.4

*: resultados importantes no esperados con la combinación del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides*, relación 50:50 (p/p)

5 Tal como se ilustra en la Figura 37a, que muestra el análisis de transferencia Western del músculo bíceps de los ocho animales para cada tratamiento, y en la Figura 37b, que muestra las unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y
10 el grupo de control negativo, ni el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo ni el extracto de raíz de *Rhodiola rosea* fueron capaces de estimular significativamente la síntesis de proteínas, si bien la combinación de ambos extractos estimula significativamente la síntesis de
15 proteínas a la HED decreciente 1000 mg/día, 500 mg/día y 250 mg/día.

La combinación de extractos (HED: 1000mg/día y 500 mg/día) fue de hecho significativamente superior al extracto de raíz
20 de *Rhodiola rosea* solo, tal como se muestra en la Figura 37d (que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de *Rhodiola*). La combinación de extractos (HED: 1000 mg/día y 500 mg/día) también fue superior al extracto de

raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo, tal como se muestra en la Figura 37e (que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de *Rhaponticum*). Asimismo, el efecto de la combinación de los extractos (para HED = 1000 mg/día y 500 mg/día) también fue significativamente superior a las proteínas de suero, tal como se muestra en la Figura 37c (que muestra unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de proteínas de suero). La Tabla 24 (a continuación) ilustra la diferencia entre los resultados obtenidos mediante el uso de dosis diferentes de la combinación en comparación con lo que se podría haber esperado de los resultados del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo o del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo. De forma inesperada, la combinación de la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* mostró un mejor efecto que *Rhodiola* o *Rhaponticum* a concentración completa por sí solos sobre el efecto en la estimulación de la síntesis de proteínas en el bíceps. Esto es sinergia. Además, el efecto de la combinación de la mitad de la concentración de *Rhodiola* y la mitad de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (2.0 veces más) que el esperado. Aun

adicionalmente, el efecto de la combinación de un cuarto de la concentración de *Rhodiola* y un cuarto de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (2.5 veces más) que el esperado. Finalmente, el efecto de la combinación de 10 veces menos concentración de *Rhodiola* y 10 veces menos concentración de *Rhaponticum* también mostró un efecto mayor (5.0 veces más) que el esperado. Estos resultados claramente demuestran la sinergia de la combinación de los extractos en la estimulación de la síntesis de proteínas en el músculo bíceps luego de un ejercicio de resistencia intenso a 500 mg/día, 250 mg/día y 100 mg/día de la relación de combinación 50:50 (p/p).

Tabla 24: Síntesis de proteínas en el músculo bíceps (como unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de control negativo)

20

HED del extracto de raíz de <i>Rhodiola rosea</i> (mg/día)	HED del extracto de raíz de <i>Rhaponticum carthamoides</i> (mg/día)	Efecto esperado (% de síntesis de proteínas)	Efecto medido (% de síntesis de proteínas)	Relación medida a esperada
500	0		171	
0	500		217	
500	500	388	315	

250	250	194	380*	x 2.0
125	125	97	246*	x 2.5
50	50	49	247*	x 5.0

5

***: resultados importantes no esperados con la combinación del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides*, relación 50:50 (p/p)**

10 Tal como se muestra en la Figura 38, que muestra unidades arbitrarias de niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y el grupo de control negativo para todos los músculos combinados (FDP + deltoides + bíceps), el extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides*

15 solo, pero no el extracto de raíz de *Rhodiola rosea*, fue capaz de estimular significativamente la síntesis de proteínas y a un menor grado que cualquiera de las concentraciones (con dosis decreciente) de la combinación de ambos extractos. La combinación de los extractos fue

20 significativamente superior al extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo para las cuatro dosis decrecientes analizadas (de HED = 1000 mg/día a 100 mg/día) y fue significativamente superior al extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* solo a HED = 1000 mg/día y 500 mg/día. Asimismo, todas las dosis

de la combinación de extractos analizada (de HED = 1000 mg/día a 100 mg/día) fueron significativamente superior a las proteínas de suero.

5 La Tabla 25 a continuación ilustra la diferencia entre los resultados obtenidos mediante el uso de dosis diferentes de la combinación en comparación con lo que se podría haber esperado de los resultados del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* solo o del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides*
10 solo. De forma inesperada, la combinación de la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y la mitad de la concentración del extracto de raíz de *Rhaponticum carthamoides* mostró un mejor efecto que *Rhodiola* o *Rhaponticum* a concentración completa por sí solos sobre el
15 efecto en la estimulación de la síntesis de proteínas en todos los músculos. Esto es sinergia. Además, el efecto de la combinación de la mitad de la concentración de *Rhodiola* y la mitad de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (1.8 veces más) que el esperado. Aun adicionalmente, el
20 efecto de la combinación de un cuarto de la concentración de *Rhodiola* y un cuarto de la concentración de *Rhaponticum* mostró un efecto mayor (3.0 veces más) que el esperado. Finalmente, el efecto de la combinación de 10 veces menos concentración de *Rhodiola* y 10 veces menos concentración de

Rhaponticum también mostró un efecto mayor (5.4 veces más) que el esperado. Estos resultados claramente demuestran la sinergia de la combinación de los extractos en la estimulación de la síntesis de proteínas en todos los músculos (FDP + deltoides + bíceps combinados) luego de un ejercicio de resistencia intenso a una dosis de 500 mg/día, 250 mg/día y 100 mg/día de la relación de combinación 50:50 (p/p).

Tabla 25: Síntesis de proteínas en los músculos FDP, deltoides y bíceps combinados (como unidades arbitrarias de los niveles de puromicina normalizados con la carga de proteínas totales cuantitativa y al grupo de control negativo)

HED del extracto de raíz de <i>Rhodiola rosea</i> (mg/día)	HED del extracto de raíz de <i>Rhaponticum carthamoides</i> (mg/día)	Efecto esperado (% de síntesis de proteínas)	Efecto medido (% de síntesis de proteínas)	Relación medida a esperada
500	0		141	
0	500		200	
500	500		276	
250	250	171	315*	x 1.8
125	125	85	251*	x 3.0
50	50	43	232*	x 5.4

*: resultados importantes no esperados con la combinación del
 extracto de raíz de *Rhodiola rosea* y el extracto de raíz de
 5 *Rhaponticum carthamoides*, relación 50:50 (p/p)

Las modalidades descritas son pasibles de diversas
 modificaciones y formas alternativas, y los ejemplos
 específicos de la presente se mostraron a modo de ejemplo en
 10 los dibujos y se describen en detalle en la presente. Sin
 embargo, debe comprenderse que las modalidades descritas no
 se limitan a las formas o métodos particulares descritos,
 sino, por el contrario, la presente descripción abarca todas
 las modificaciones, equivalentes y alternativas.

15

REFERENCIAS

Goodman CA, Hornberger TA. Measuring protein synthesis with
 SUnSET: a valid alternative to traditional techniques?
 Exercise and sport sciences reviews. 2013;41(2):107-115.
 20 doi:10.1097/JES.0b013e3182798a95, que se incorpora a la
 presente mediante referencia.

REIVINDICACIONES

Se reivindica:

1. Una composición que comprende un extracto de
5 *Rhaponticum* y un extracto de *Rhodiola*.

2. Una composición que comprende ecdisteroides y i)
rosavinas o ii) salidrosidias.

10 3. La composición de la reivindicación 1, donde la
relación de masa del extracto de *Rhaponticum* y el extracto de
Rhodiola es alrededor de entre 99:1 y 1:99.

4. La composición de la reivindicación 1, donde la
15 relación de masa del extracto de *Rhaponticum* y el extracto de
Rhodiola es alrededor de 75:25.

5. La composición de la reivindicación 1, donde la
composición comprende ecdisteronas a alrededor de 0.1 % a 10 %.
20

6. La composición de la reivindicación 1, donde la
composición comprende ecdisteronas a alrededor de 0.5 % a 3 %.

7. La composición de la reivindicación 1, donde el

extracto de *Rhaponticum* comprende ecdisteroides a alrededor de 0.1 % - 10 %.

8. La composición de la reivindicación 1, donde el
5 extracto de *Rhaponticum* comprende ecdisteroides a alrededor de 0.4 % a 5 %.

9. La composición de la reivindicación 1, donde la
composición comprende 20-hidroxiecdisona a alrededor de 0.1 %
10 a 5.0 %.

10. La composición de la reivindicación 1, donde el
extracto de *Rhodiola* comprende salidrosidias a alrededor de 1 %
a 4 %.

15

11. La composición de la reivindicación 1, donde el
extracto de *Rhodiola* comprende rosavinas a alrededor de 1 % a
10 %.

20 12. La composición de la reivindicación 1, donde el
extracto de *Rhodiola* comprende rosavina a alrededor de 1 % a
10 %.

13. La composición de la reivindicación 1, donde la

composición comprende extracto de *Rhodiola* a alrededor de 1 % a 99 %.

14. La composición de la reivindicación 1, donde el
5 extracto de *Rhodiola* comprende:

salidrosidias a alrededor de 1 % a 4 %,
rosavina a alrededor de 0.5 % a 10 % y
rosavinas totales a alrededor de 0.5 % a 10 %, y

10 donde el extracto de *Rhaponticum* comprende:

20-hidroxiecdisona a alrededor de 0.1 % a 5.0 %

y

ecdisteronas totales a alrededor de 0.1 % a
10 %.

15

15. Un método para aumentar la síntesis de proteínas en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende la composición de la reivindicación 1.

20

16. El método de la reivindicación 15, donde se administra al sujeto alrededor de 0.5 - 100 mg/kg/día de la composición.

17. El método de la reivindicación 15, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 500 mg/día de la composición.

5 18. El método de la reivindicación 15, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 2000 mg/día de la composición.

19. El método de reivindicación 15, donde la formulación
10 comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

20. Un método para reducir la proteólisis de proteínas en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende la composición de la
15 reivindicación 1.

21. El método de la reivindicación 20, donde se administra al sujeto alrededor de 0.5 - 100 mg/kg/día de la composición.

20

22. El método de la reivindicación 20, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 500 mg/día de la composición.

23. El método de la reivindicación 20, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 2000 mg/día de la composición.

5 24. El método de la reivindicación 20, donde el sujeto es un ser humano.

25. El método de la reivindicación 20, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente
10 aceptable.

26. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de la reivindicación 1, donde dicha formulación se formula para administración oral.
15

27. La formulación farmacéutica de la reivindicación 26, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

20 28. Una composición que comprende:
 ecdisteroides totales a alrededor de 0.1 % a 10 %;
 salidrosidias a alrededor de 1 % a 4 %; y
 rosavinas totales a alrededor de 1 % a 6 %.

29. La composición de la reivindicación 28, que comprende ecdisteroides totales a alrededor de 0.4 % a 5 %.

5 30. La composición de la reivindicación 28, que comprende 20-hidroxiecdisona al 0.1 % a 5.0 %.

31. La composición de la reivindicación 28, que comprende rosavina a alrededor de 1 % a 5 %.

10

32. La composición de la reivindicación 28, que comprende:

ecdisteroides a alrededor de 0.4 % a 5 %;

20-hidroxiecdisona a alrededor de 0.1 % a 5.0 %

15

y

rosavina a alrededor de 1 % a 5 %.

20

33. Un método para aumentar la síntesis de proteínas en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende una composición seleccionada del grupo que consiste en:

(i) la composición de la reivindicación 28,

(ii) extracto de *Rhaponticum* y extracto de *Rhodiola* y

(iii) ecdisteroides y (a) rosavinas o (b) salidrosid.

34. El método de la reivindicación 33, donde se administra al sujeto alrededor de 5 - 50 mg/kg/día de la composición.

5

35. El método de la reivindicación 33, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 500 mg/día de la composición.

10

36. El método de la reivindicación 33, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 2000 mg/día de la composición.

15

37. El método de la reivindicación 33, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

20

38. Un método para reducir la proteólisis de proteínas en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende la composición de la reivindicación 28.

39. Un método para reducir la sarcopenia en un sujeto, que comprende administrar de forma oral una composición

seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) la composición de la reivindicación 28,
- (ii) extracto de *Rhaponticum* y extracto de *Rhodiola* y
- (iii) ecdisteroides y (a) rosavinas o (b) salidrosidias.

5

40. Un método para inhibir la reducción de la masa corporal en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende una composición seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 (i) la composición de la reivindicación 28;
 - (ii) extracto de *Rhaponticum* y extracto de *Rhodiola* y
 - (iii) ecdisteroides y (a) rosavinas o (b) salidrosidias, y
- donde la composición opcionalmente tiene un portador farmacéutico adecuado.

15

41. Un método para reducir la atrofia muscular o el desuso o deacondicionamiento en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende la composición seleccionada del grupo que consiste

20 en:

- (i) la composición de la reivindicación 28;
 - (ii) extracto de *Rhaponticum* y extracto de *Rhodiola* y
 - (iii) ecdisteroides y (a) rosavinas o (b) salidrosidias, y
- donde la composición opcionalmente tiene un portador

farmacéutico adecuado.

42. El método de la reivindicación 39, donde se administra al sujeto alrededor de 0.5 - 50 mg/kg/día de la
5 composición.

43. El método de la reivindicación 39, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 500 mg/día de la
composición.

10

44. El método de la reivindicación 39, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 2000 mg/día de la
composición.

15 45. El método de la reivindicación 39, donde el sujeto es un ser humano.

46. El método de la reivindicación 39, donde el sujeto es un animal.

20

47. El método de la reivindicación 39, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

48. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de la reivindicación 28, donde dicha formulación se formula para administración oral.

5 49. La formulación farmacéutica de la reivindicación 48, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

10 50. Un método para aumentar la masa muscular en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende la composición de la reivindicación 28.

15 51. El método de la reivindicación 50, donde se administra al sujeto alrededor de 5 - 50 mg/kg/día de la composición.

20 52. El método de la reivindicación 50, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 500 mg/día de la composición.

53. El método de la reivindicación 50, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 2000 mg/día de la composición.

54. El método de la reivindicación 50, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

5

55. Un método para aumentar la fuerza muscular en un sujeto, que comprende administrar de forma oral al sujeto una formulación que comprende la composición de la reivindicación 28.

10

56. El método de la reivindicación 55, donde se administra al sujeto alrededor de 5 - 50 mg/kg/día de la composición.

15

57. El método de la reivindicación 55, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 500 mg/día de la composición.

20

58. El método de la reivindicación 55, donde se administra al sujeto alrededor de 50 - 2000 mg/día de la composición.

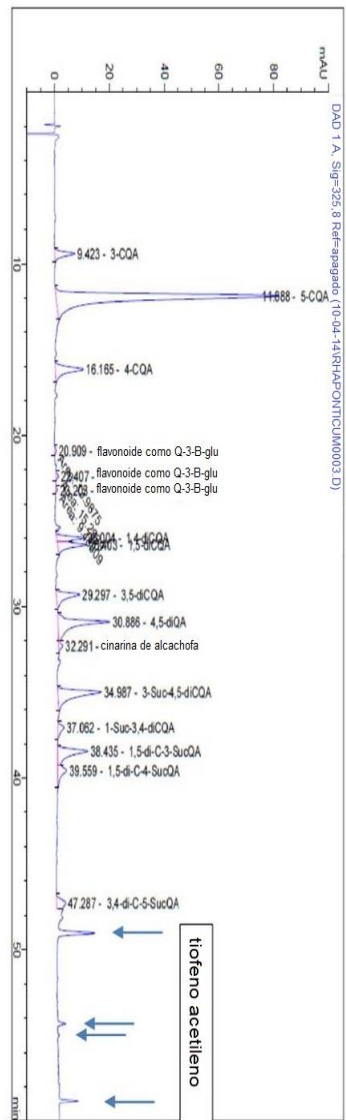
59. El método de la reivindicación 55, donde la formulación comprende además un portador farmacéuticamente

acceptable.

RESUMEN

Una composición para mejorar el metabolismo muscular en un sujeto y métodos para su fabricación y utilización. Las
5 modalidades incluyen composiciones con un extracto de *Rhaponticum* y un extracto de *Rhodiola*. Un extracto de *Rhaponticum* puede incluir cantidades de ecdisteronas que incluyen 20-hidroxiecdisona. Un extracto de *Rhodiola* puede incluir salidrosidias y rosavinas, que incluyen rosavina. Las
10 dosificaciones de ingesta adecuadas de la composición pueden funcionar para aumentar la síntesis de proteínas y reducir la proteólisis de proteína en un sujeto.

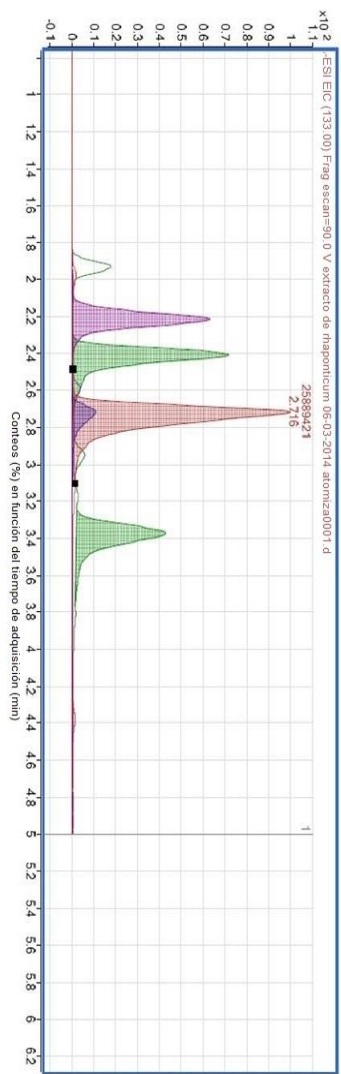
Compuesto fenólico/Flavonoide:



Compuestos fenólicos totales identificados: cinarina, ácidos clorogénicos y derivados clorogénicos: **14.04 %**

Fig. 1a

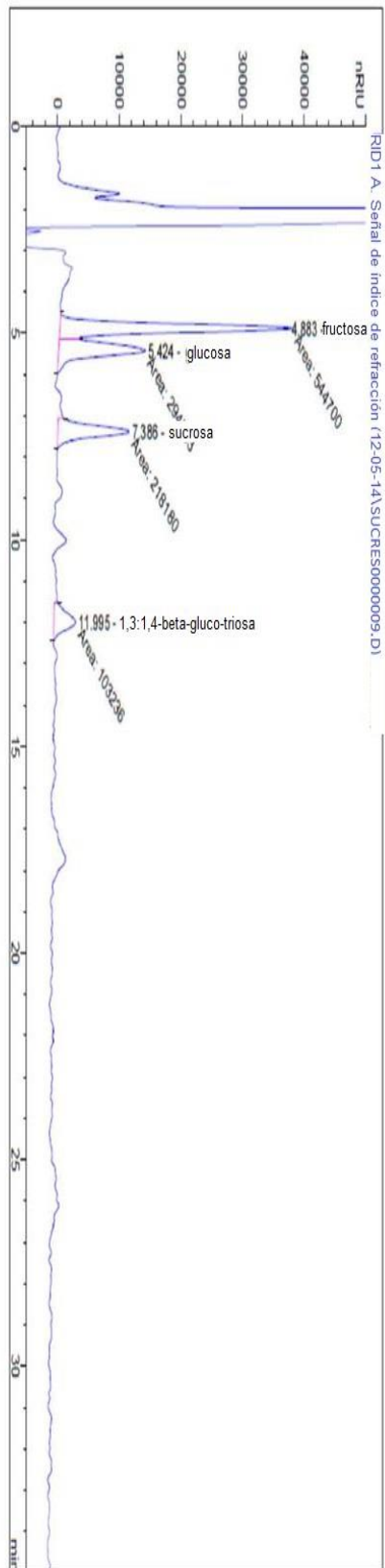
Ácidos orgánicos:



Ácidos orgánicos totales: ácido glucónico, quínico, málico y cítrico = **2.49%**

Fig. 1b

Carbohidratos libres:



Carbohidratos libres totales: fructosa, glucosa, diosa, triosa = **21.9 %**

Fig. 2

Extracto F0 aminoácidos bajos

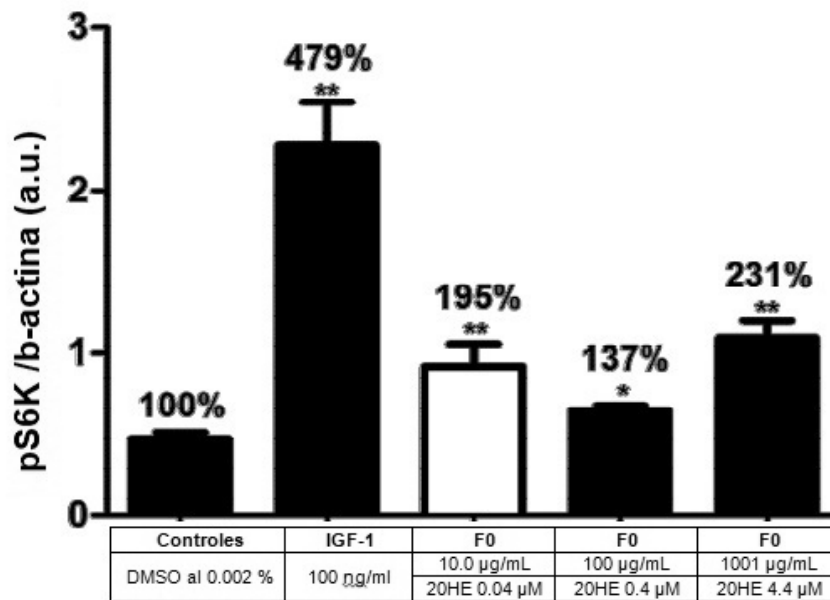


Fig. 3a

Extracto F0 aminoácidos normales

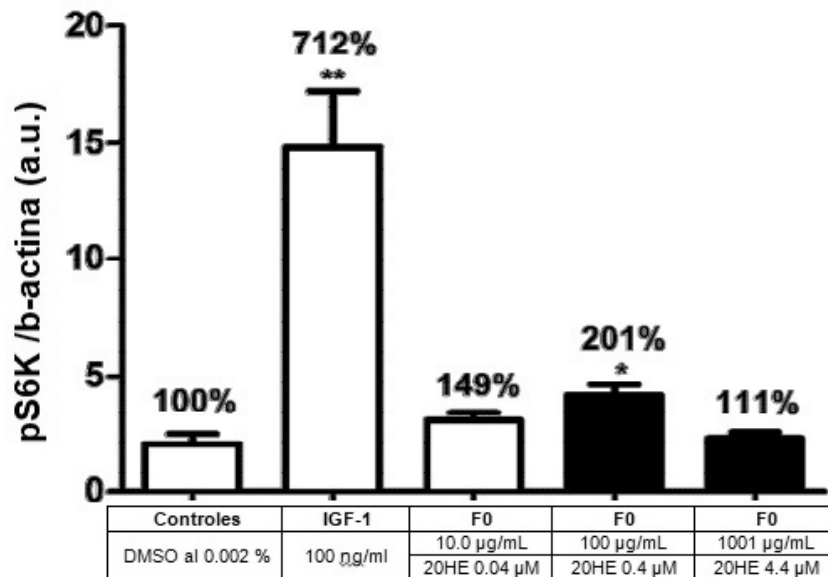
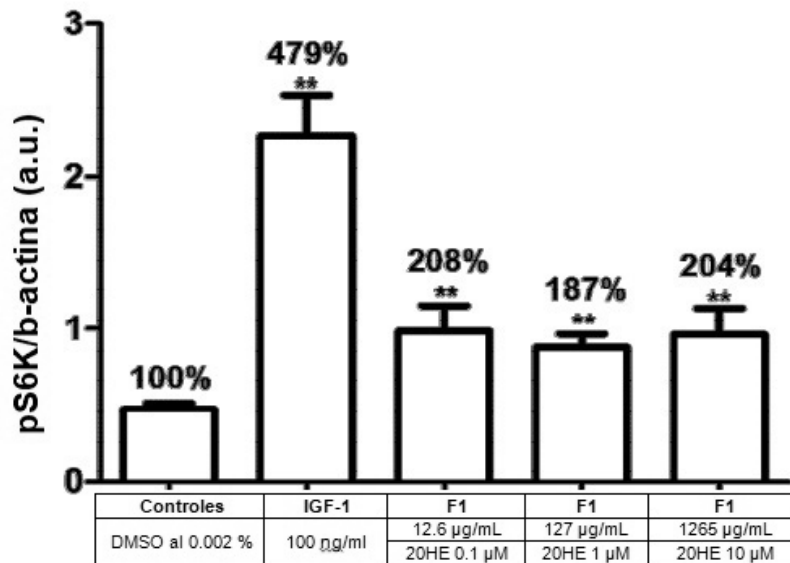


Fig. 3b

Extracto F1 aminoácidos bajos



Fracción F1 a 1264.8 µg/ml final: solubilidad incompleta en Krebs

Fig. 4a

Extracto F1 aminoácidos normales

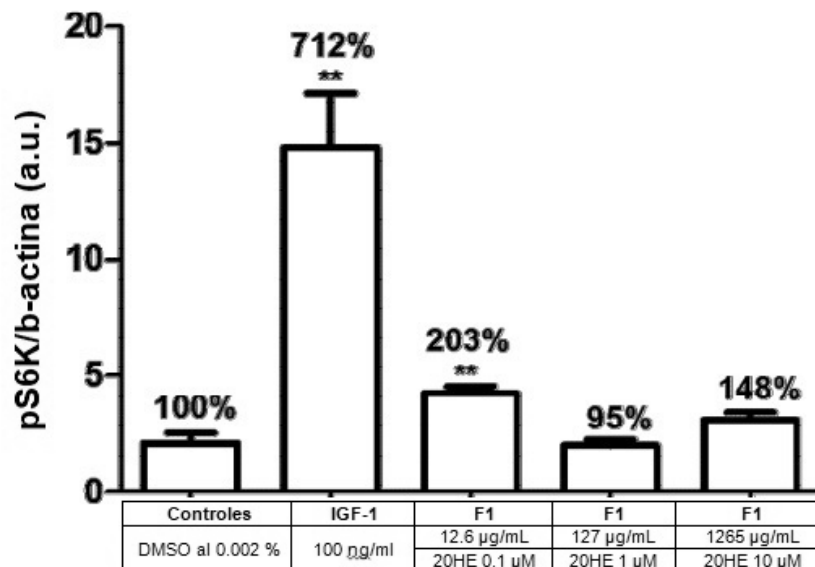


Fig. 4b

Extracto F3 aminoácidos bajos

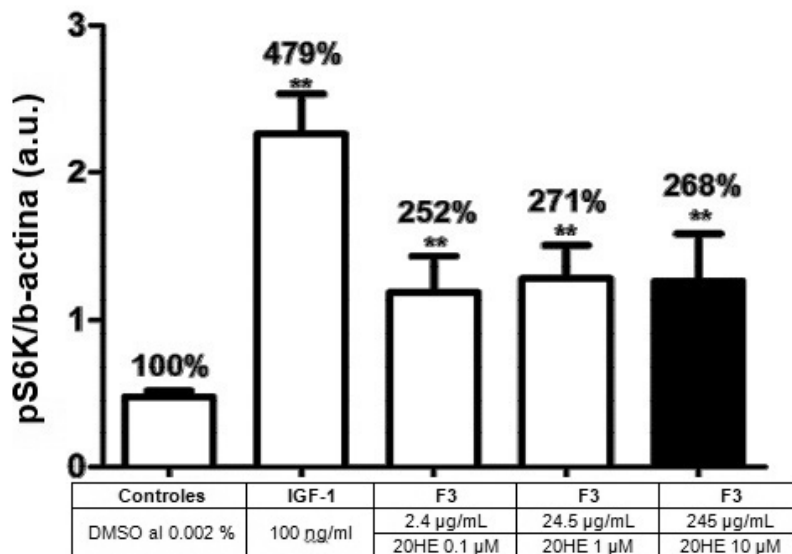


Fig. 5a

Extracto F3 aminoácidos normales

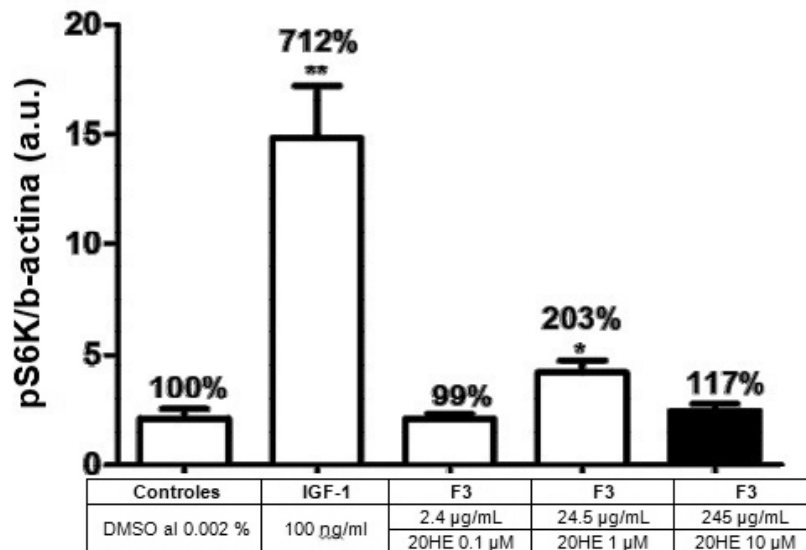


Fig. 5b

Extracto F5 aminoácidos bajos

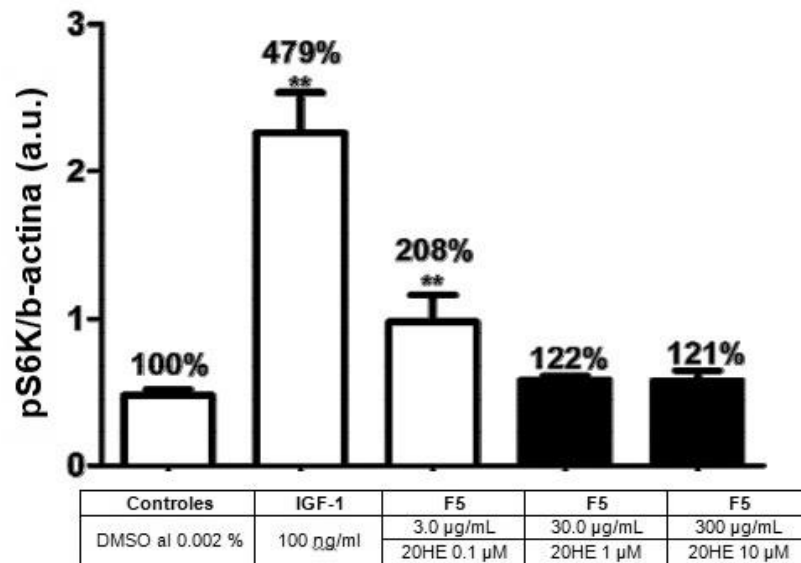


Fig. 6a

Extracto F5 aminoácidos normales

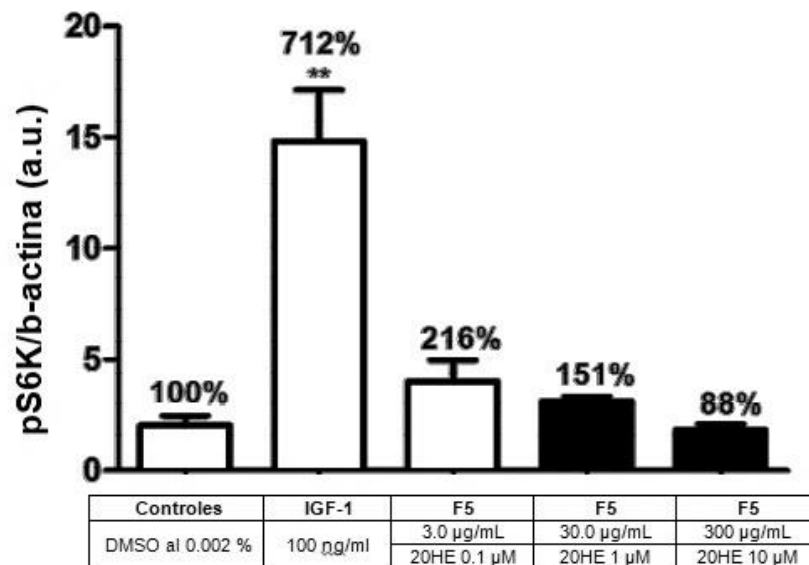
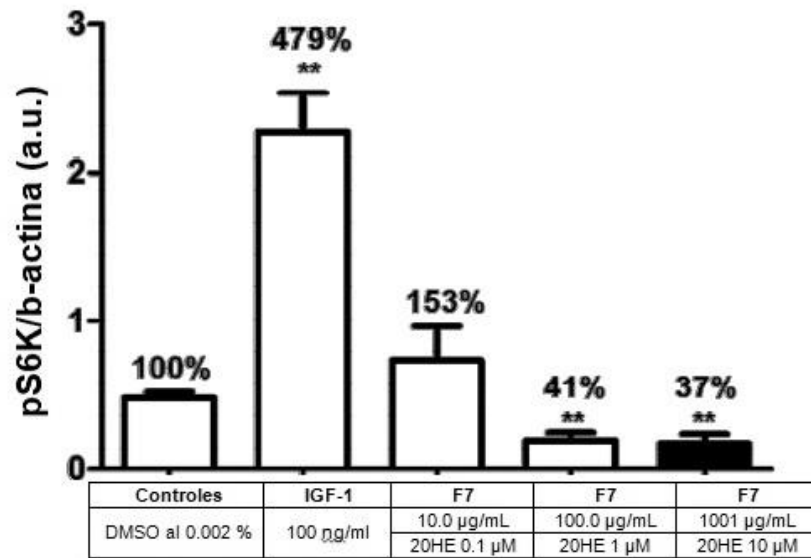


Fig. 6b

Extracto F7 aminoácidos bajos



Fracción F7 a 1001 µg/ml final: solubilidad incompleta en Krebs

Fig. 7a

Extracto F7 aminoácidos normales

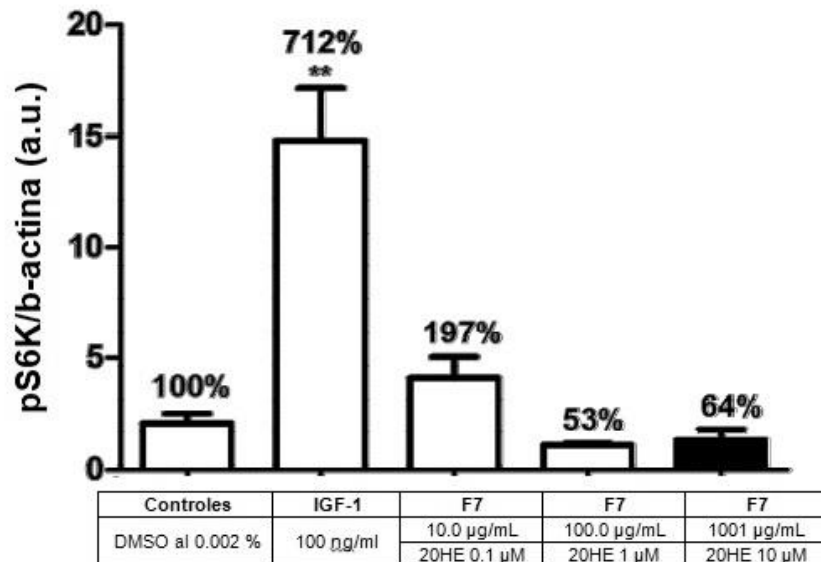


Fig. 7b

Extracto F0 aminoácidos bajos

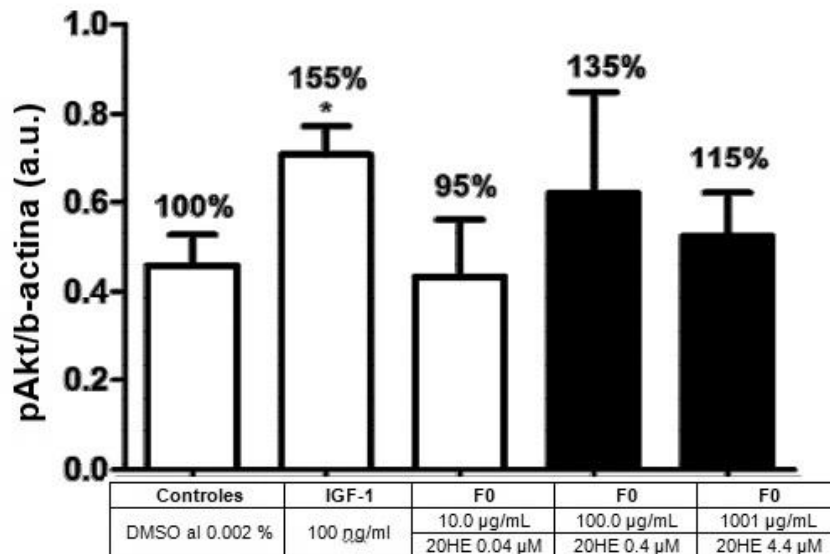


Fig. 8a

Extracto F0 aminoácidos normales

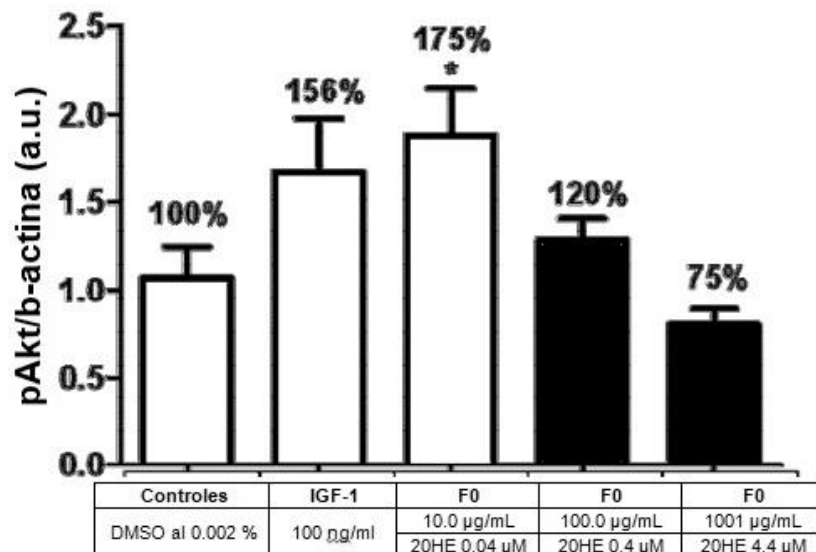
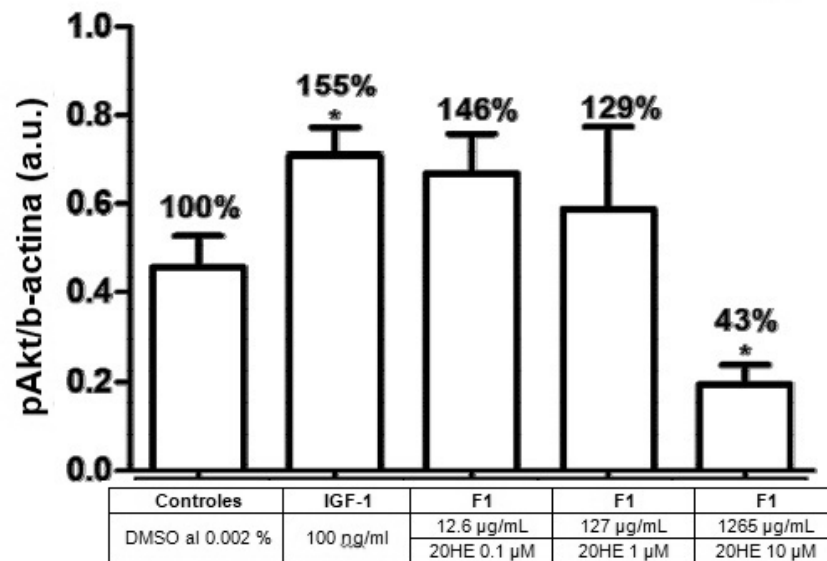


Fig. 8b

Extracto F1 aminoácidos bajos



Fracción F1 a 1264.8 µg/ml final: solubilidad incompleta en Krebs

Fig. 9a

Extracto F1 aminoácidos normales

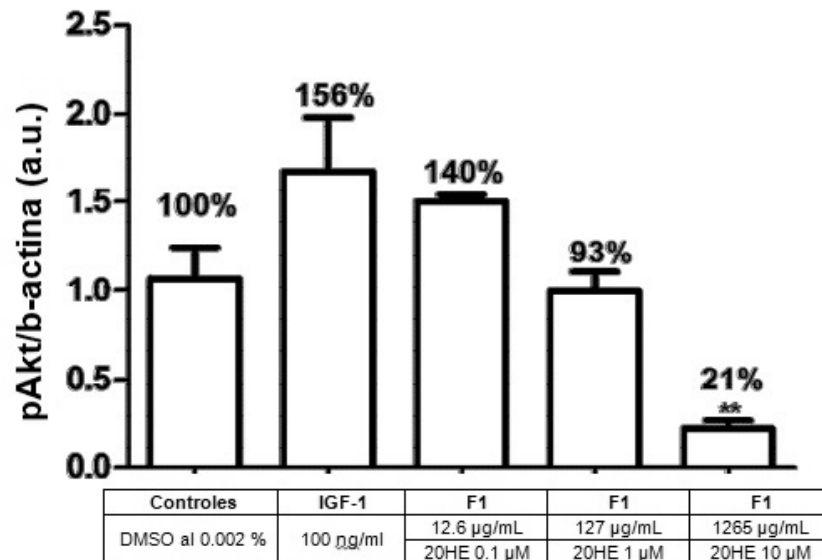


Fig. 9b

Extracto F3 aminoácidos bajos

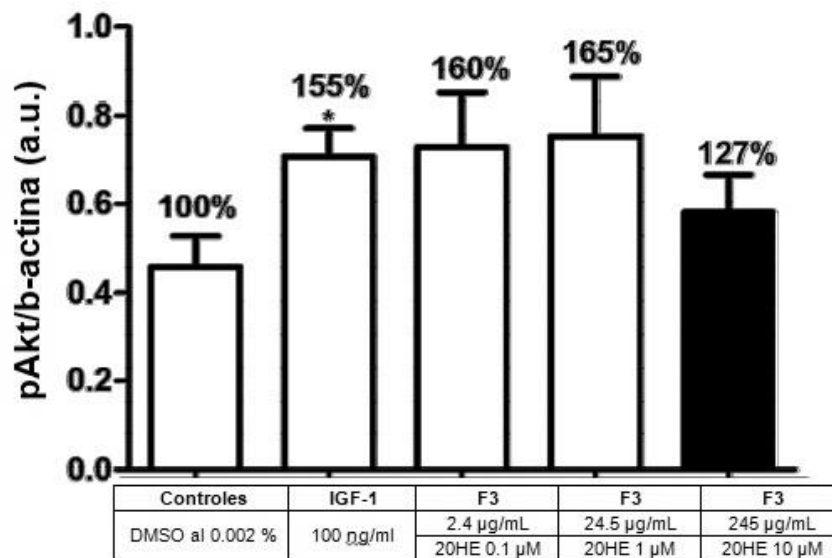


Fig. 10a

Extracto F3 aminoácidos normales

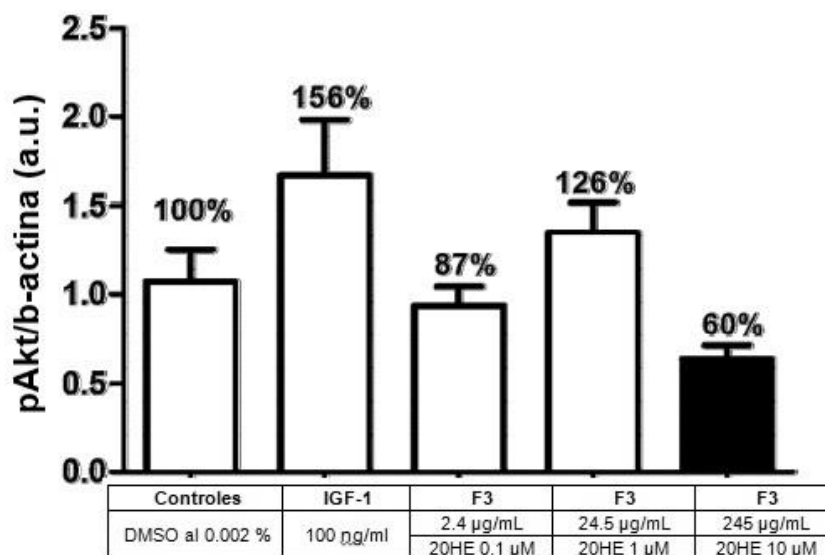


Fig. 10b

Extracto F5 aminoácidos bajos

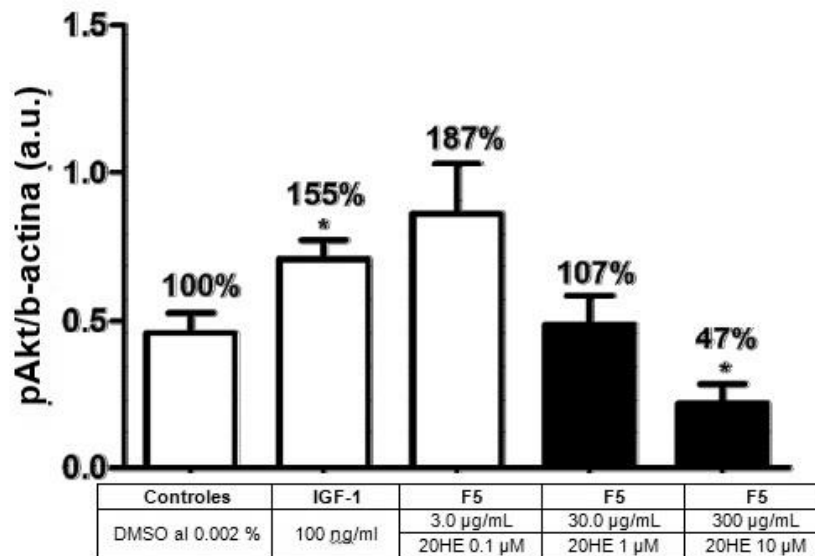


Fig. 11a

Extracto F5 aminoácidos normales

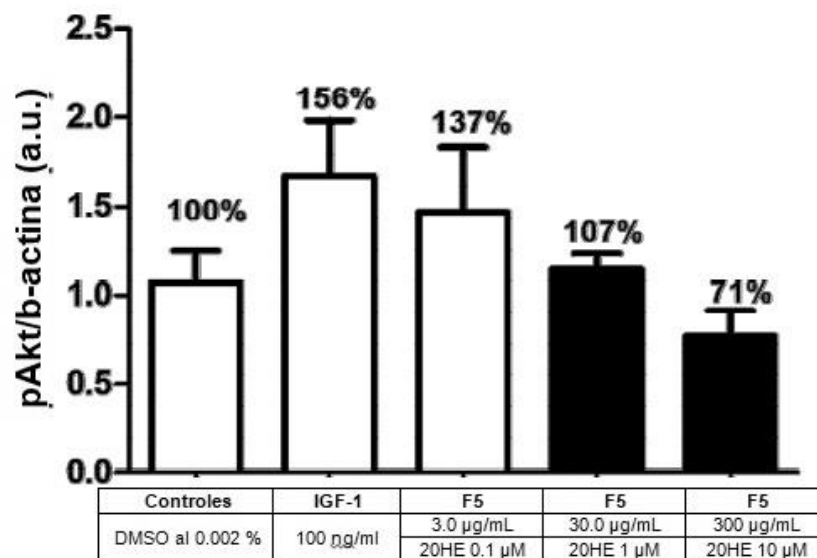
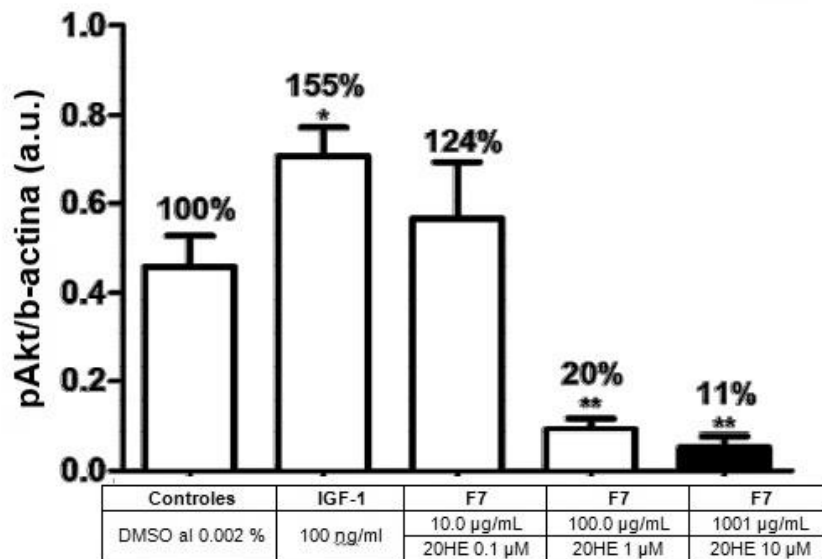


Fig. 11b

Extracto F7 aminoácidos bajos



Fracción F7 a 1001 µg/ml final: solubilidad incompleta en Krebs

Fig. 12a

Extracto F7 aminoácidos normales

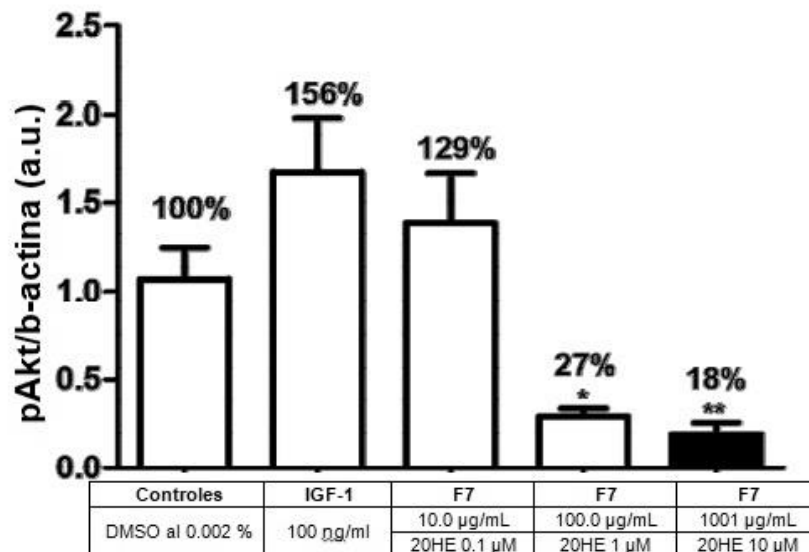


Fig. 12b

Extracto F0 aminoácidos bajos

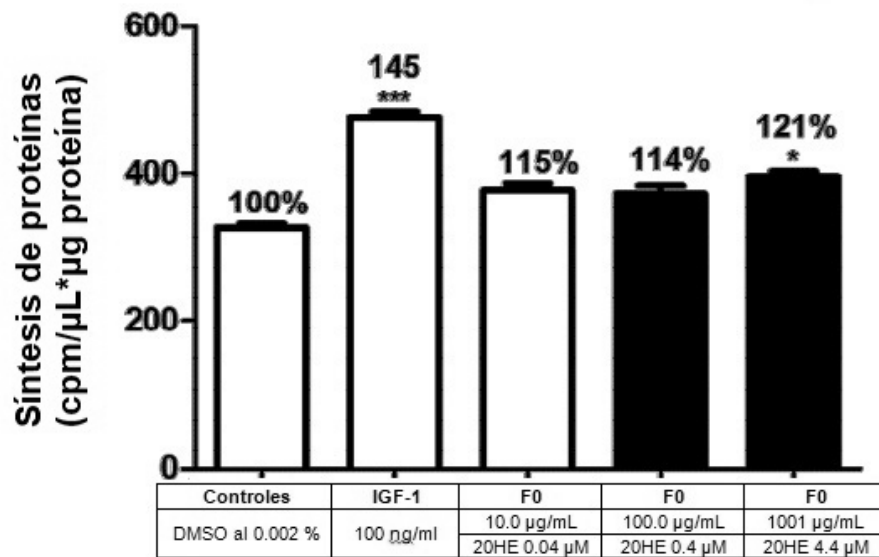


Fig. 13a

Extracto F0 aminoácidos normales

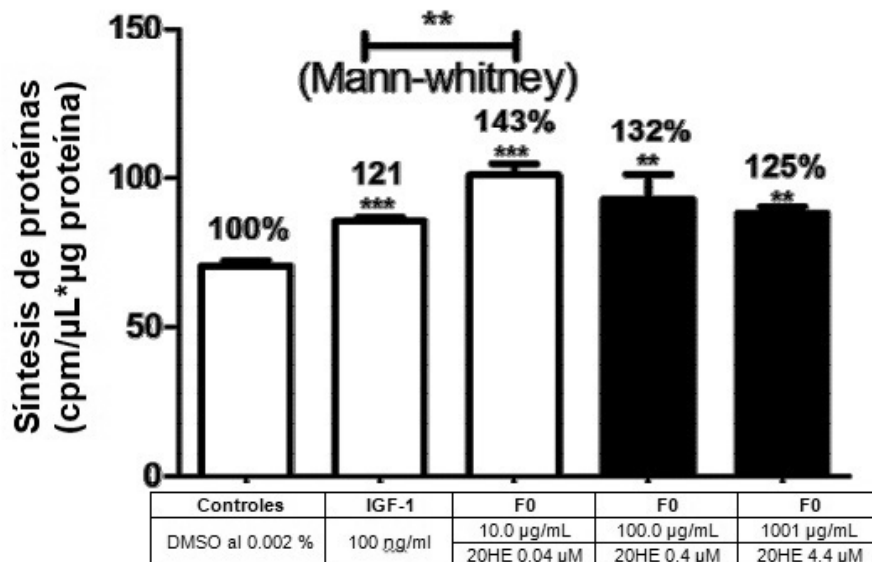
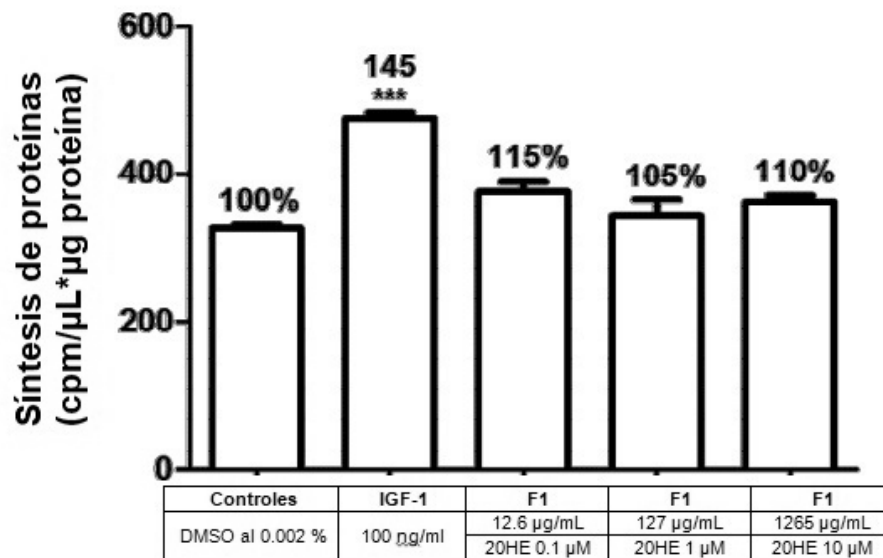


Fig. 13b

Extracto F1 aminoácidos bajos



Fracción F1 a 1264.8 μg/ml final: solubilidad incompleta en Krebs

Fig. 14a

Extracto F1 aminoácidos normales

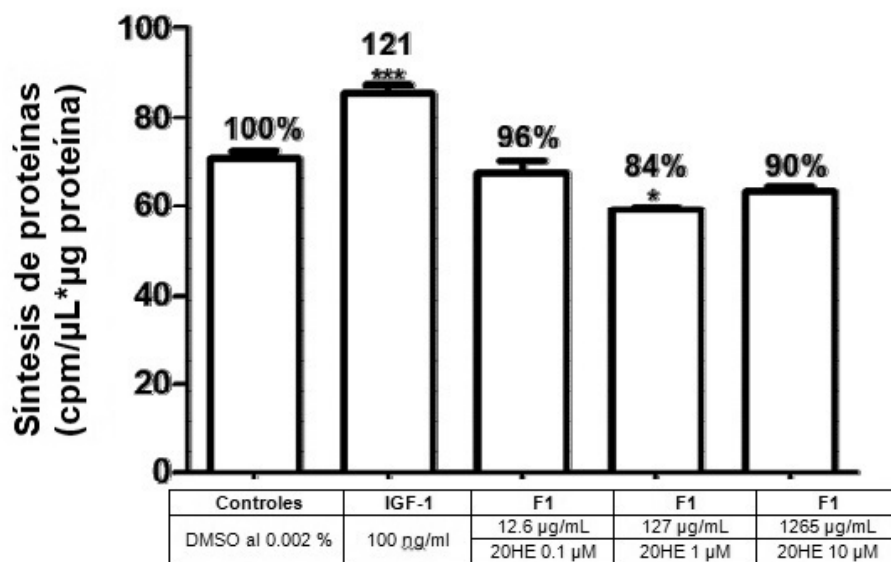


Fig. 14b

Extracto F3 aminoácidos bajos

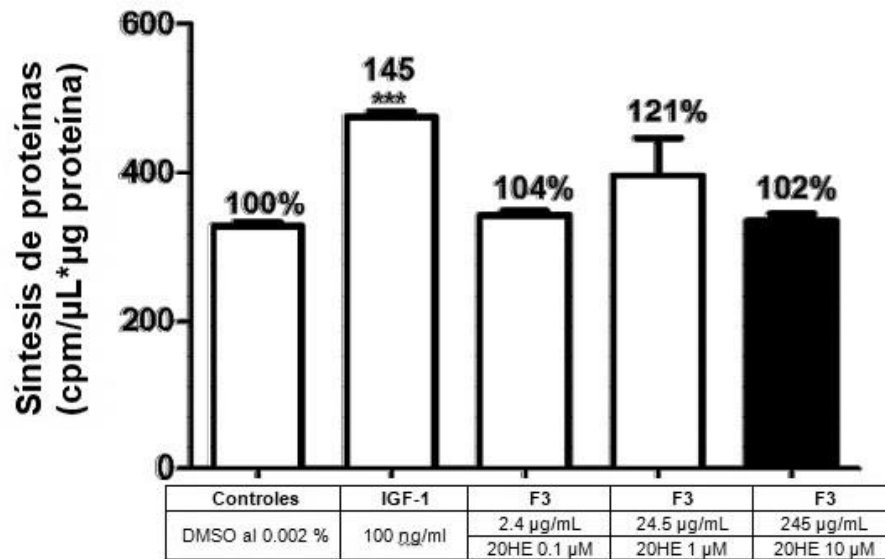


Fig. 15a

Extracto F3 aminoácidos normales

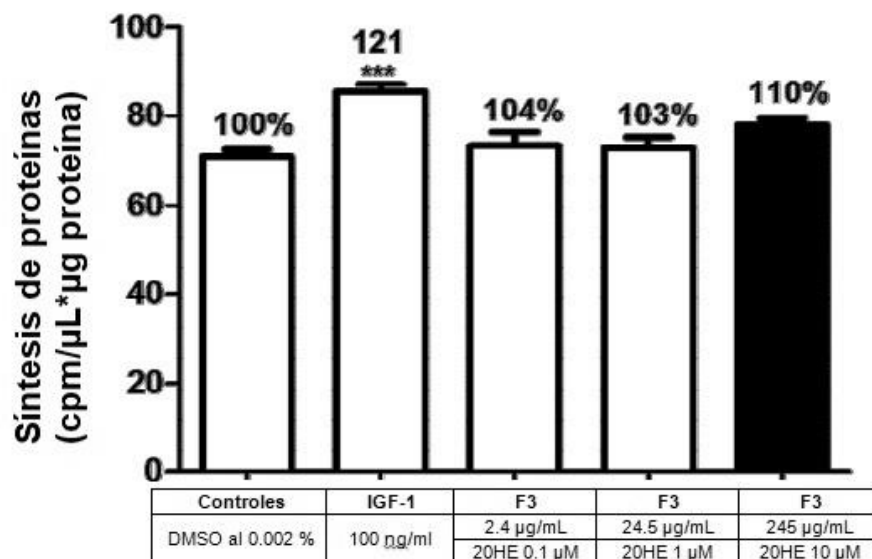


Fig. 15b

Extracto F5 aminoácidos bajos

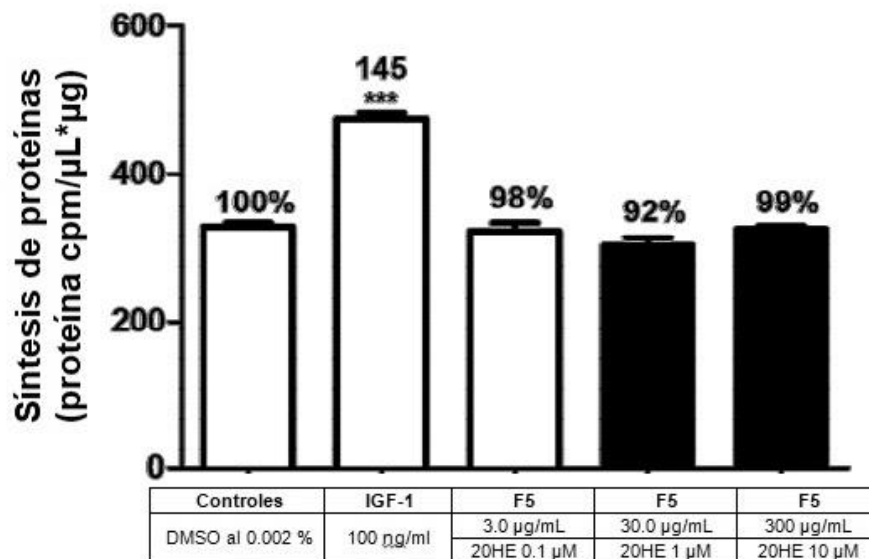


Fig. 16a

Extracto F5 aminoácidos normales

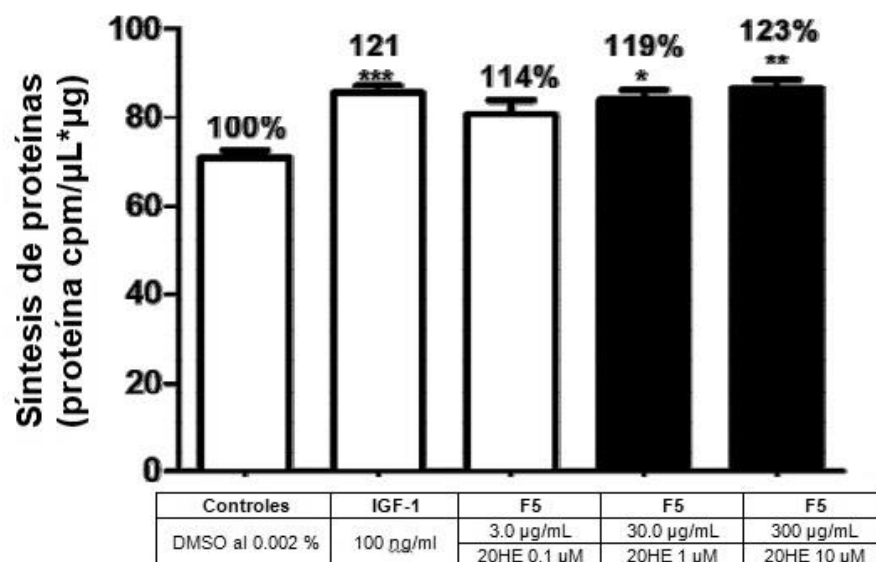
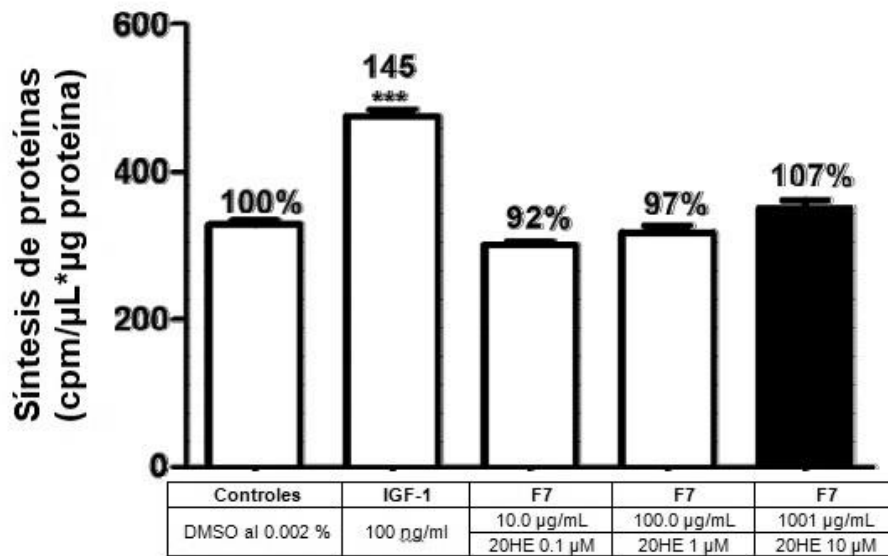


Fig. 16b

Extracto F7 aminoácidos bajos



Fracción F7 a 1001 μg/ml final: solubilidad incompleta en Krebs

Fig. 17a

Extracto F7 aminoácidos normales

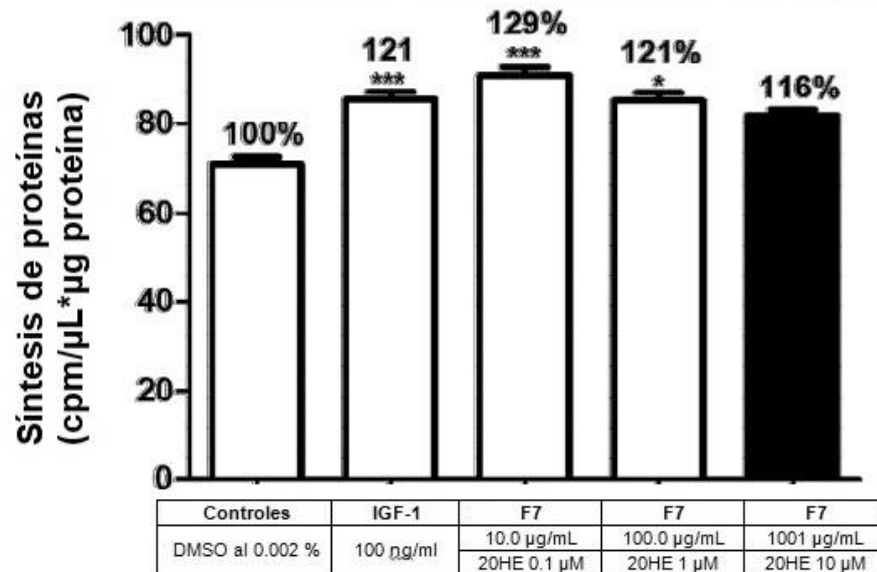


Fig. 17b

Extracto F0 aminoácidos normales

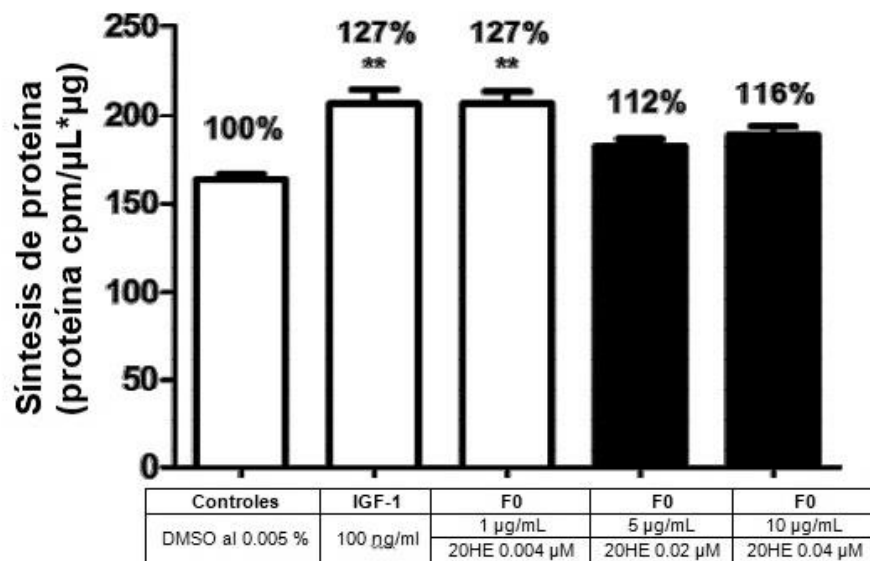


Fig. 18a

Rhodiola aminoácidos normales

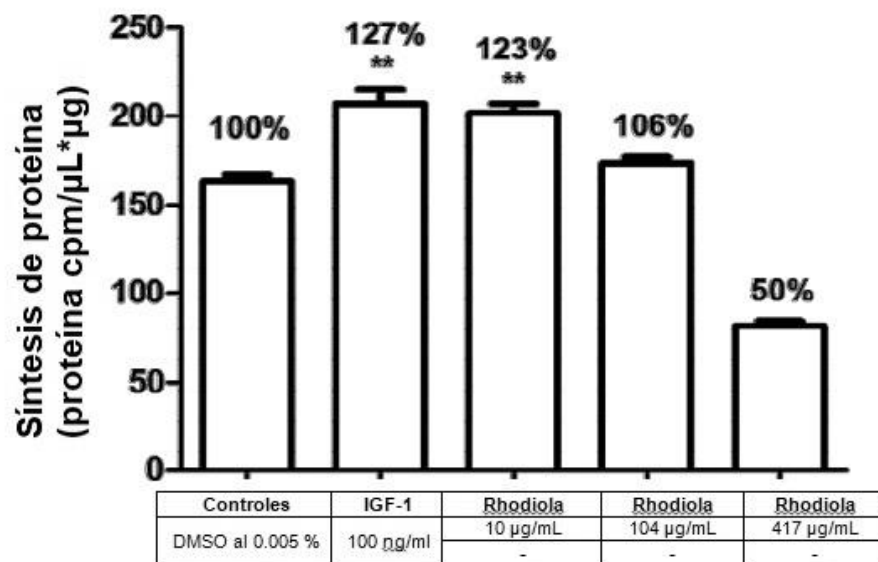


Fig. 18b

Extracto F0 y Rhodiola

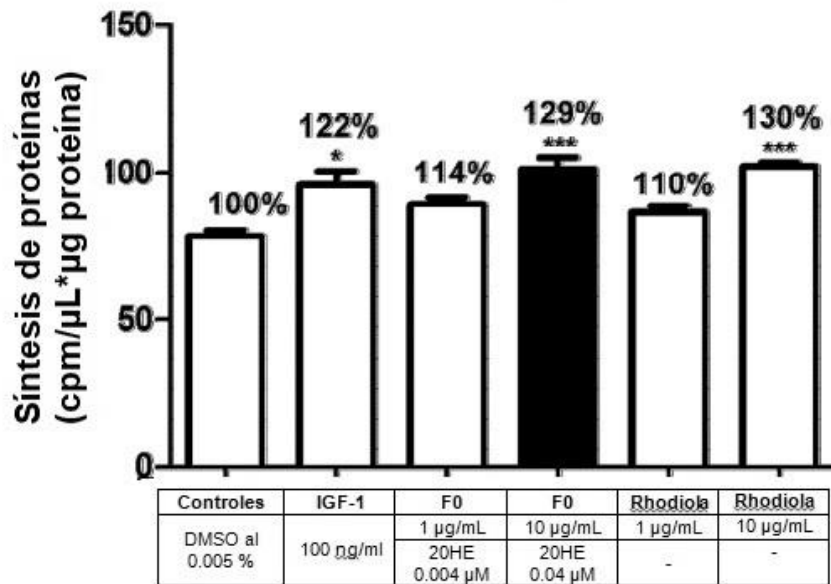


Fig. 19a

Extractos F0 y rhodiola 1:1

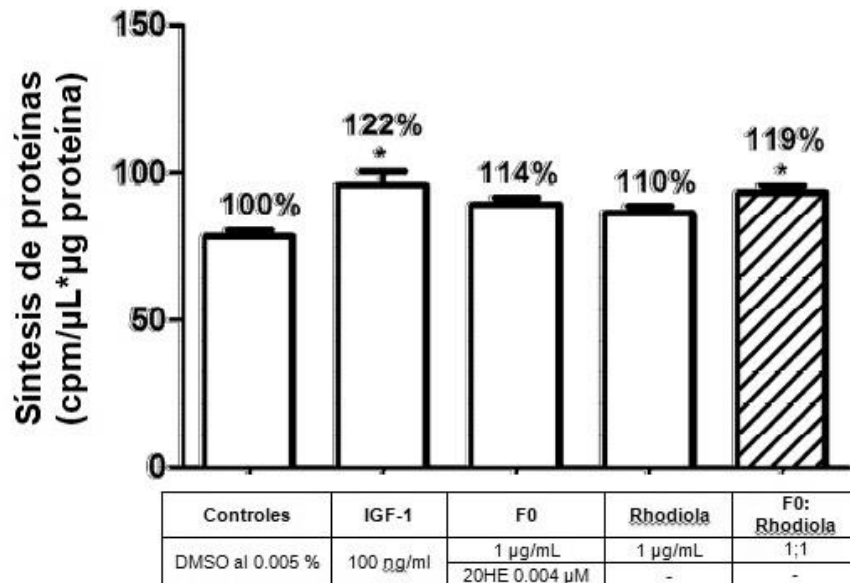
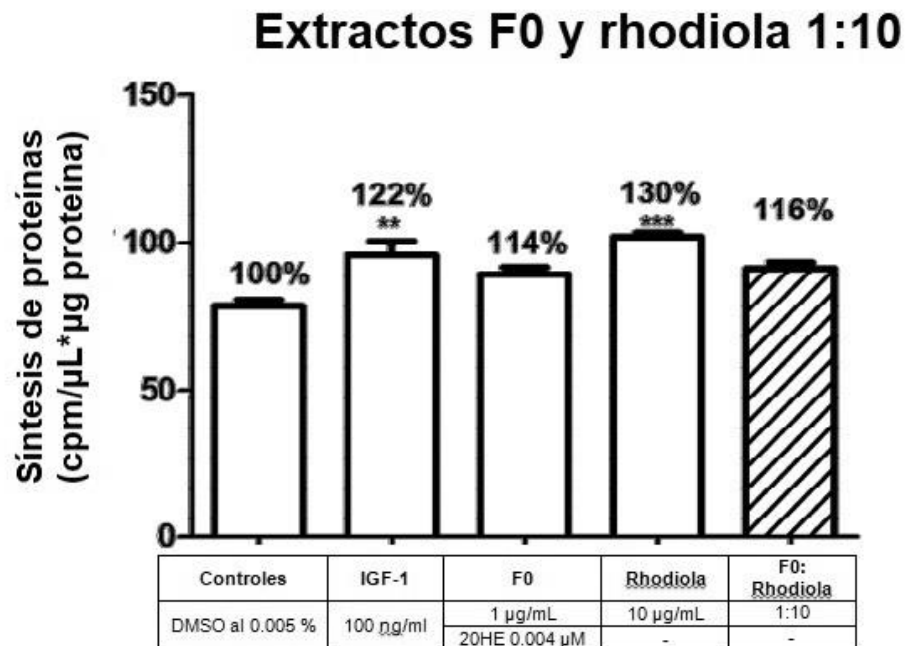
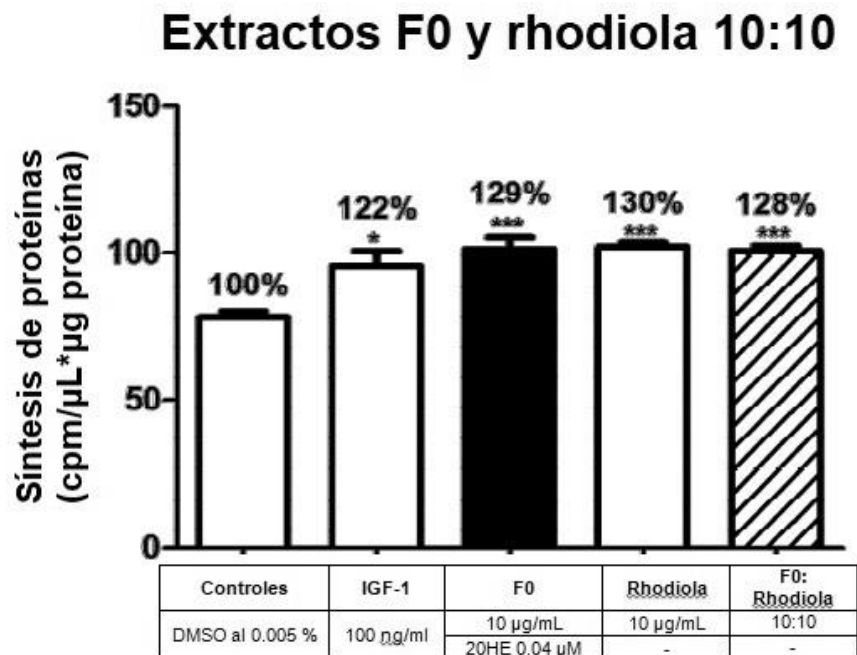


Fig. 19b

**Fig. 20a****Fig. 20b**

Extractos F0 y rhodiola 10:1

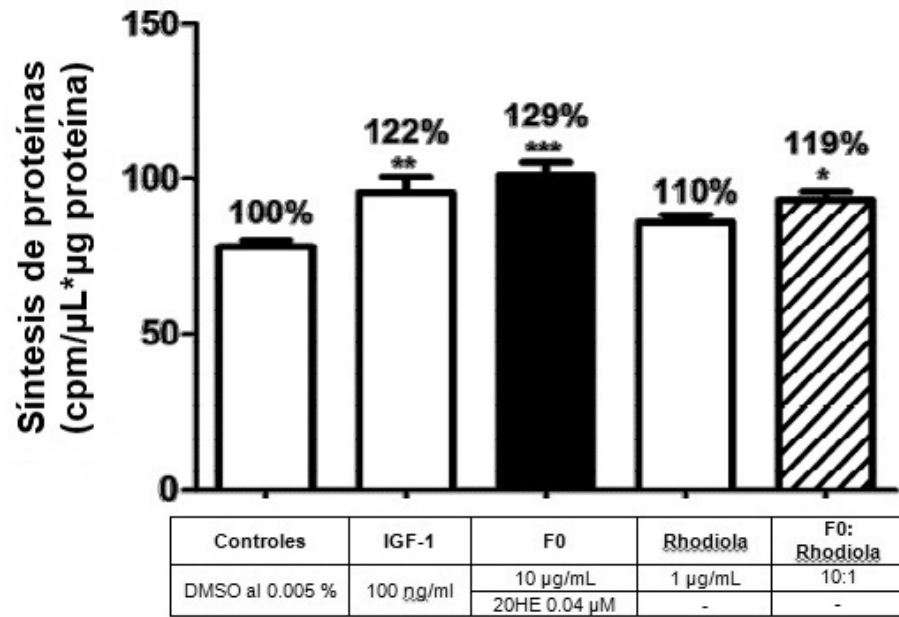


Fig. 21

Extracto F0 y rhodiola Miostatina

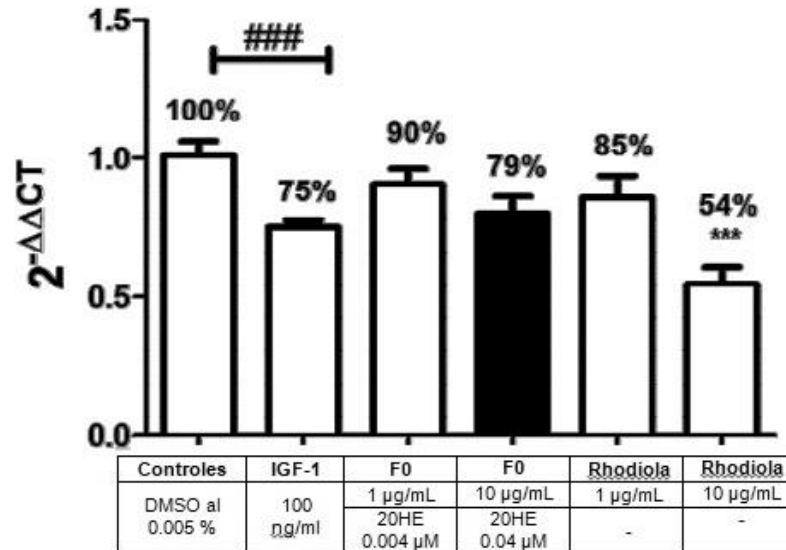


Fig. 22a

Extracto F0 y rhodiola Atrogina

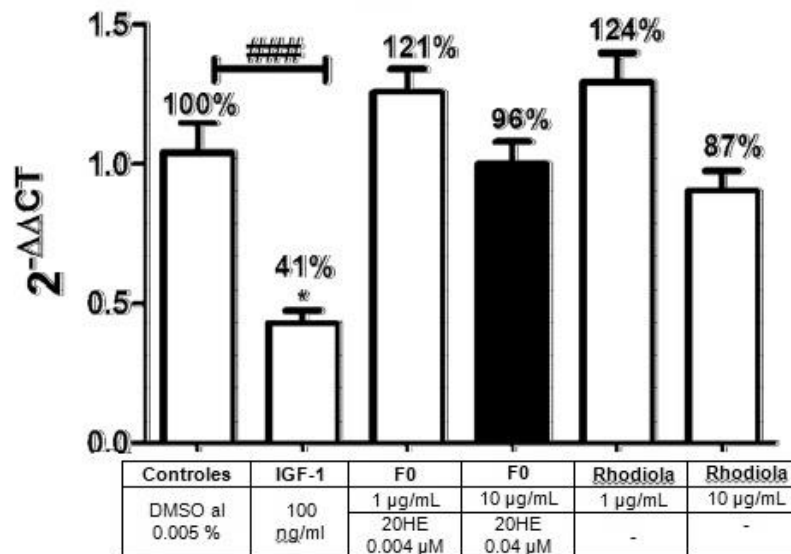


Fig. 22b

Extractos F0 y rhodiola 1:1 Miostatina

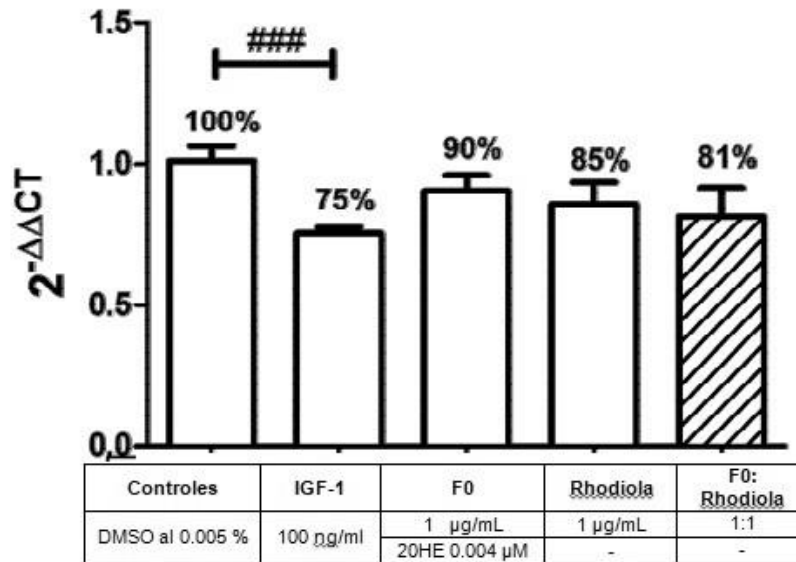


Fig. 23a

Extractos F0 y rhodiola 10:10 Miostatina

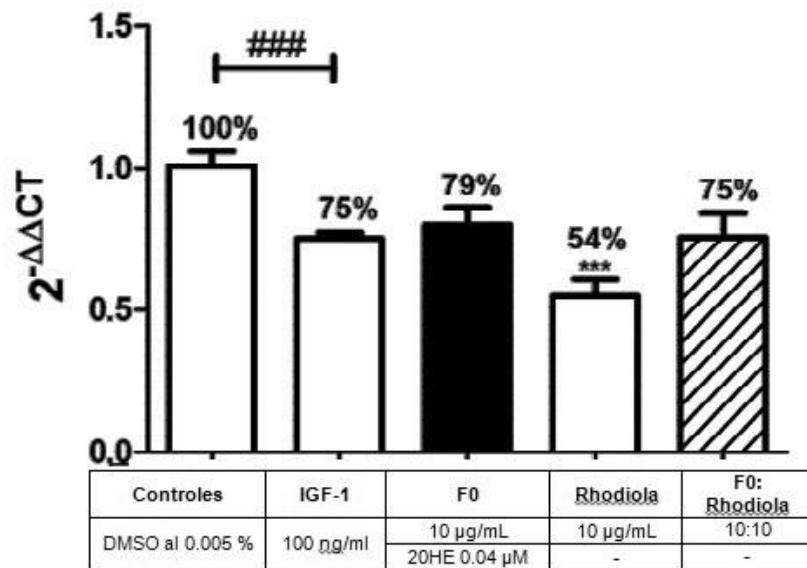


Fig. 23b

Extractos F0 y rhodiola 1:10 Miostatina

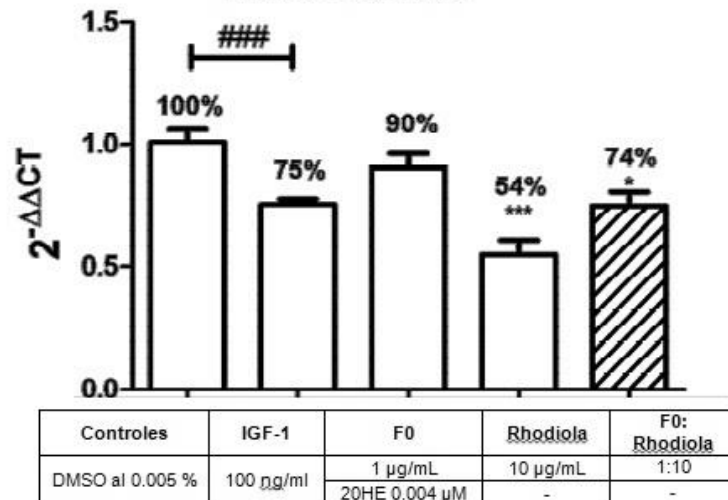


Fig. 24a

Extractos F0 y rhodiola 10:1 Miostatina

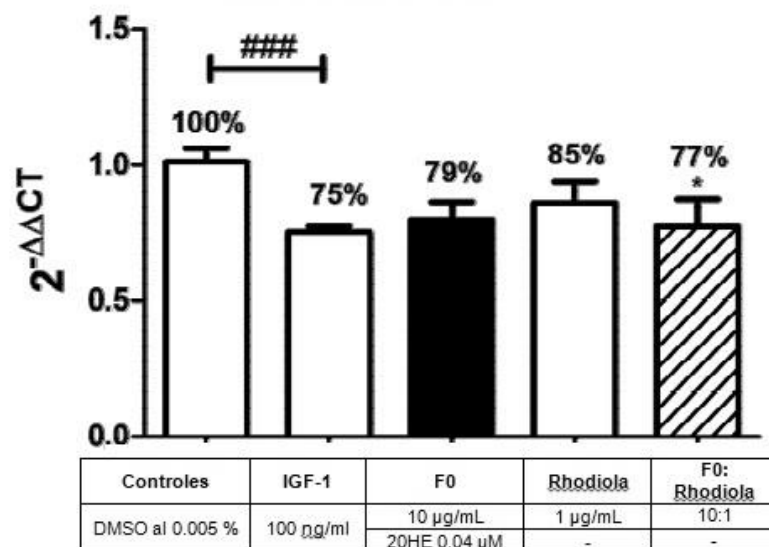


Fig. 24b

Extractos F0 y rhodiola 1:1 Atroquina

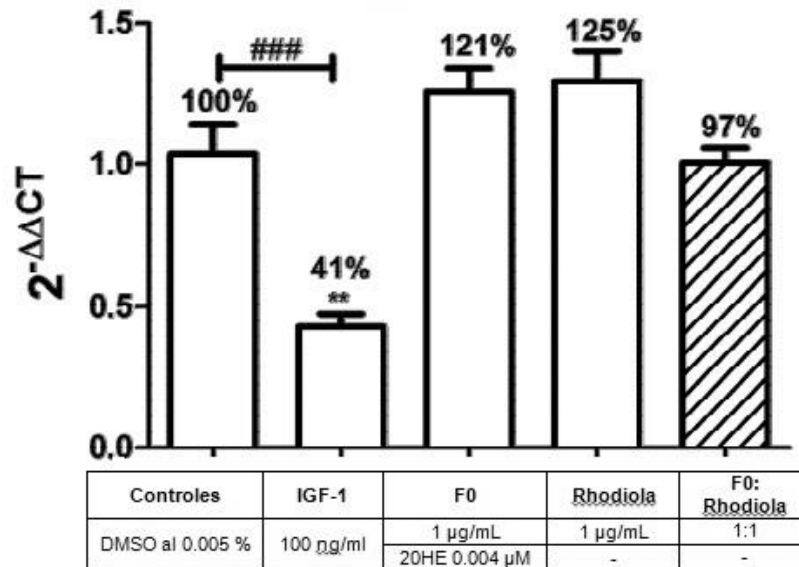


Fig. 25a

Extractos F0 y rhodiola 10:10 Atroquina

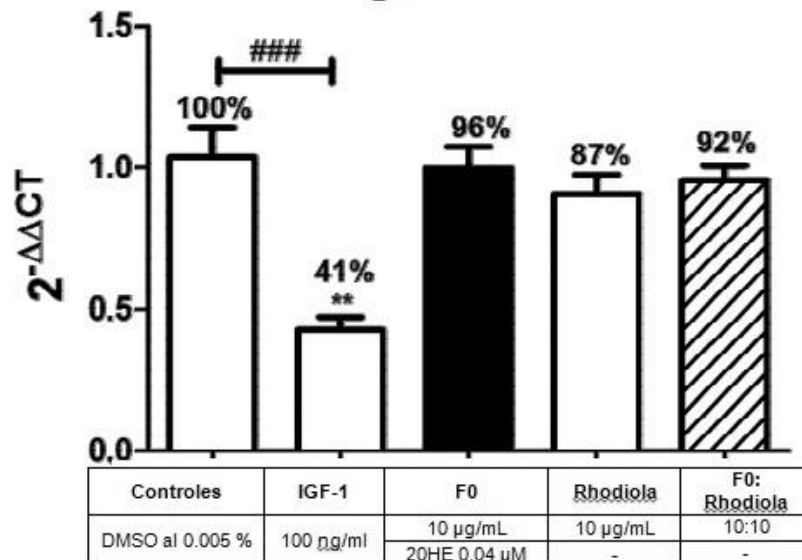


Fig. 25b

Extractos F0 y rhodiola 1:10 Atroquina

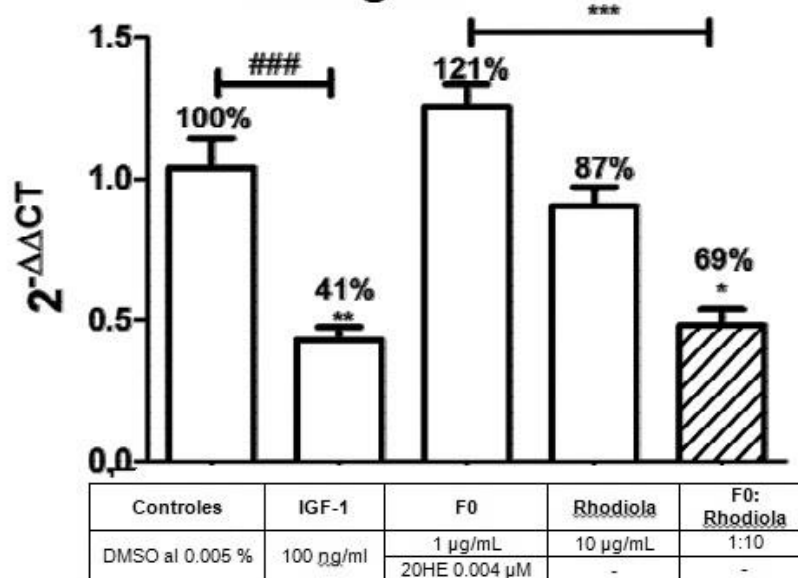


Fig. 26a

Extractos F0 y rhodiola 10:1 Atroquina

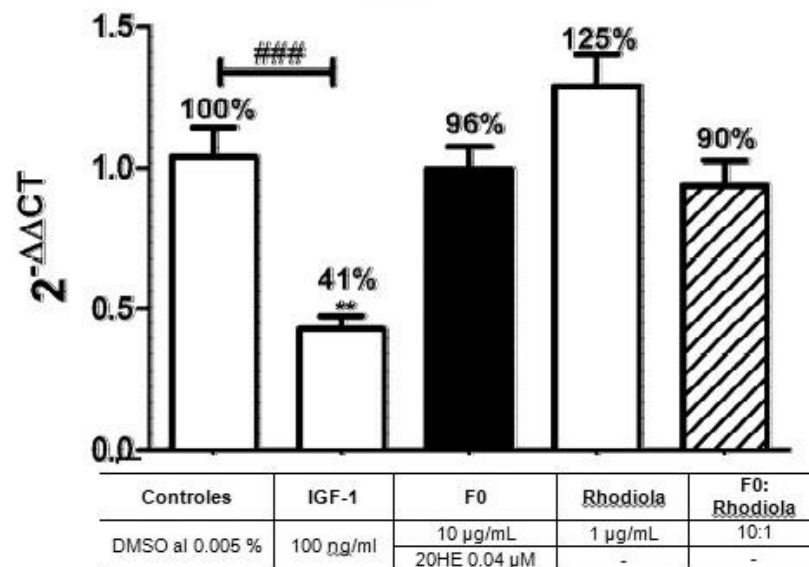


Fig. 26b

Extracto F0 y F0 seco

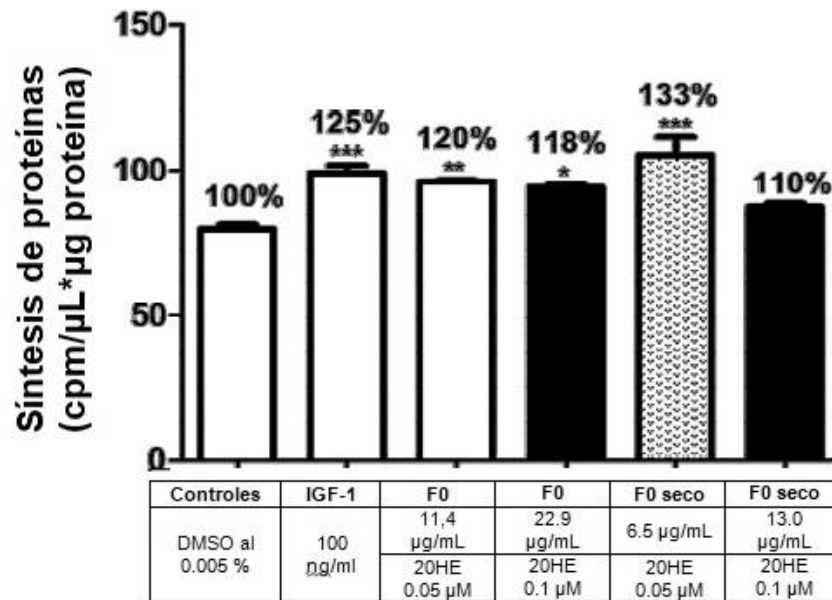


Fig. 27a

Extracto F0 y F1

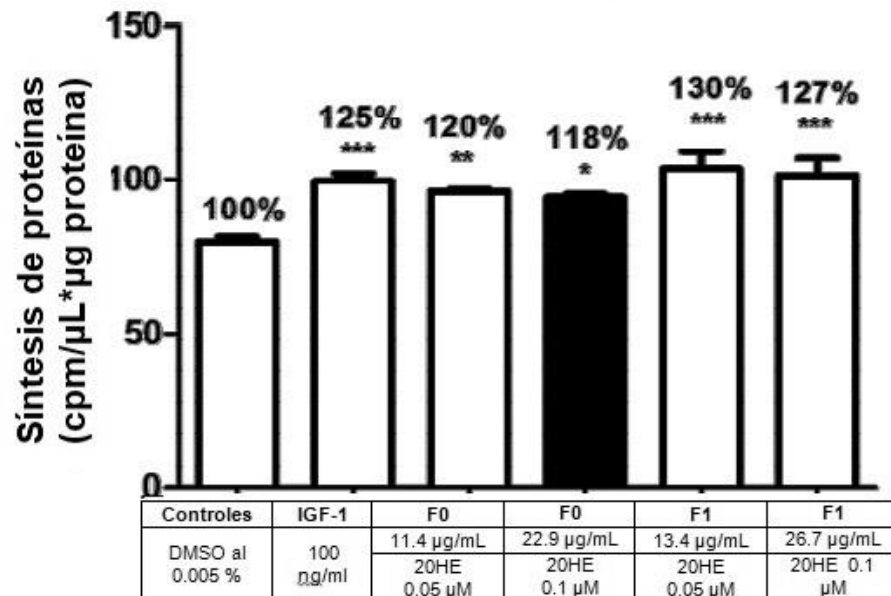


Fig. 27b

5

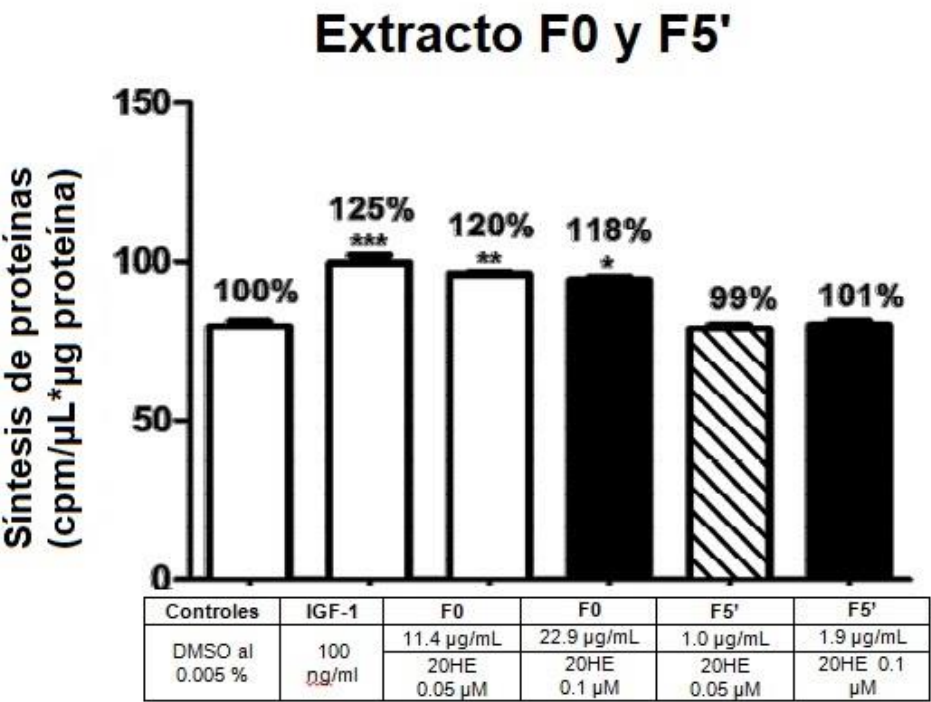
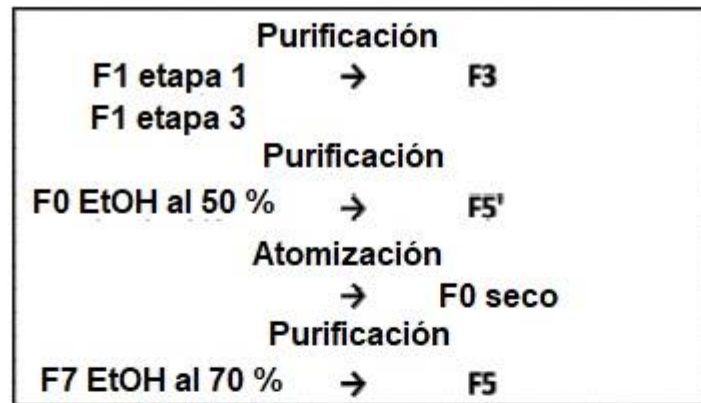
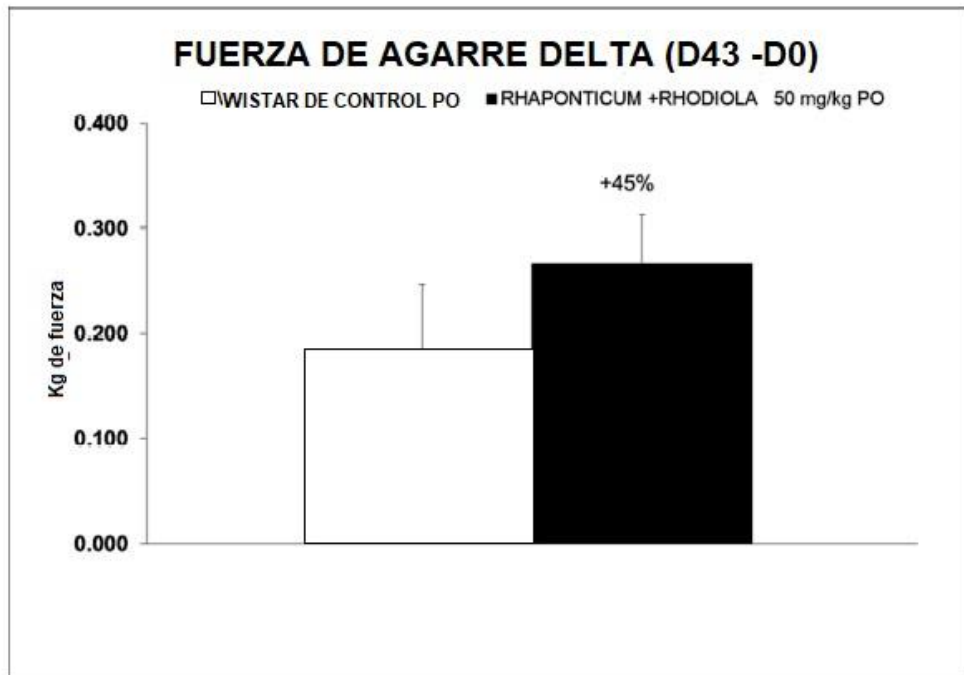
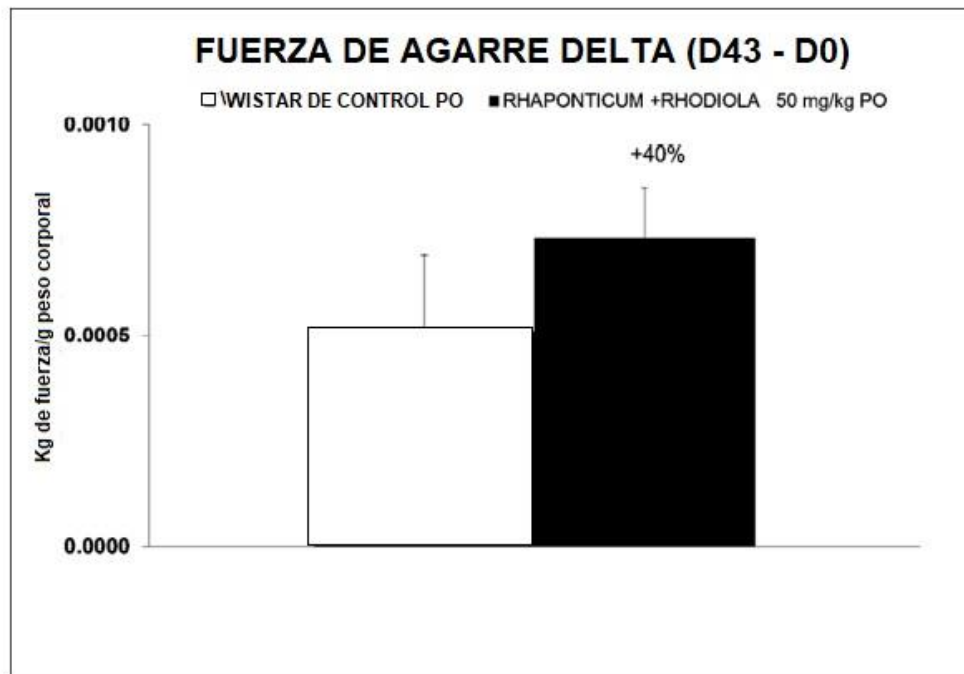


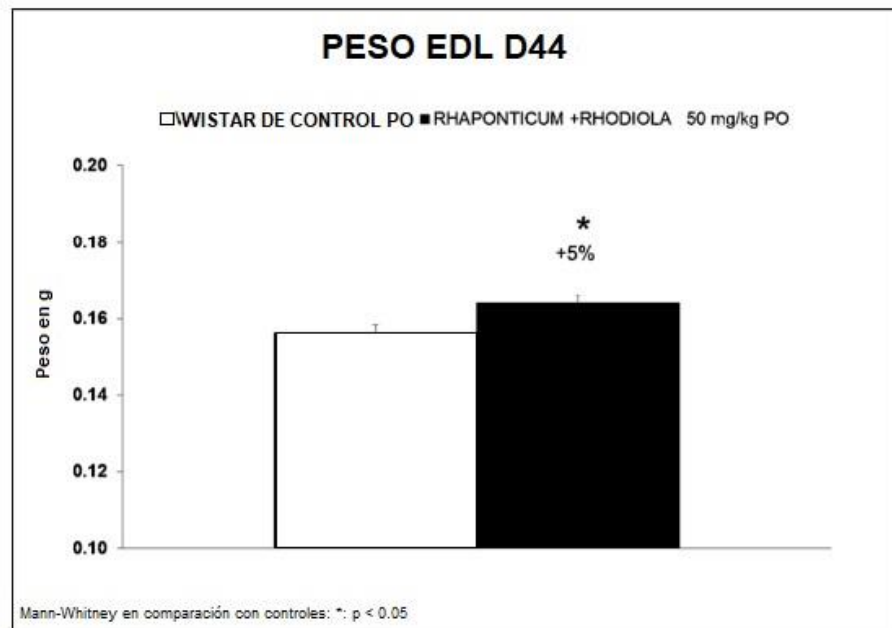
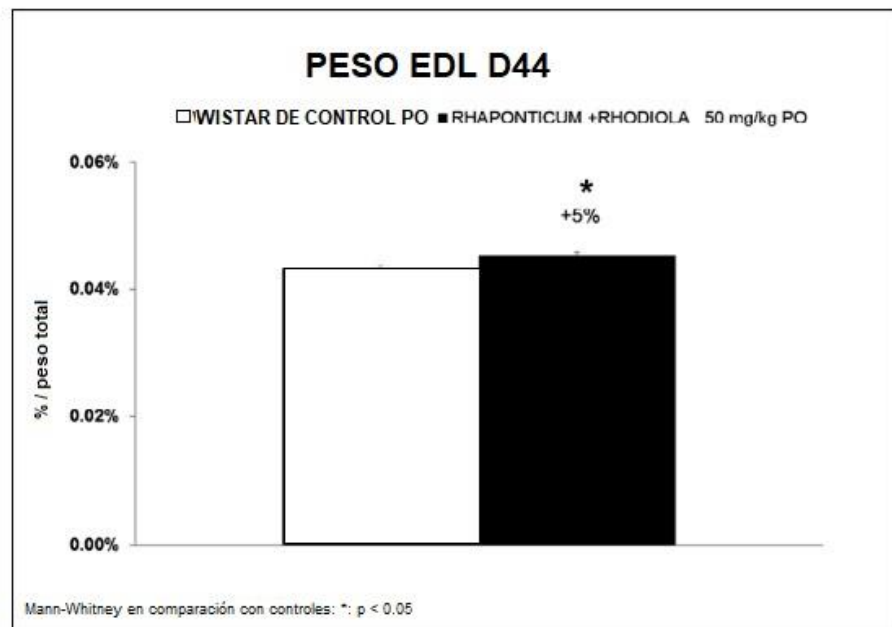
Fig. 28

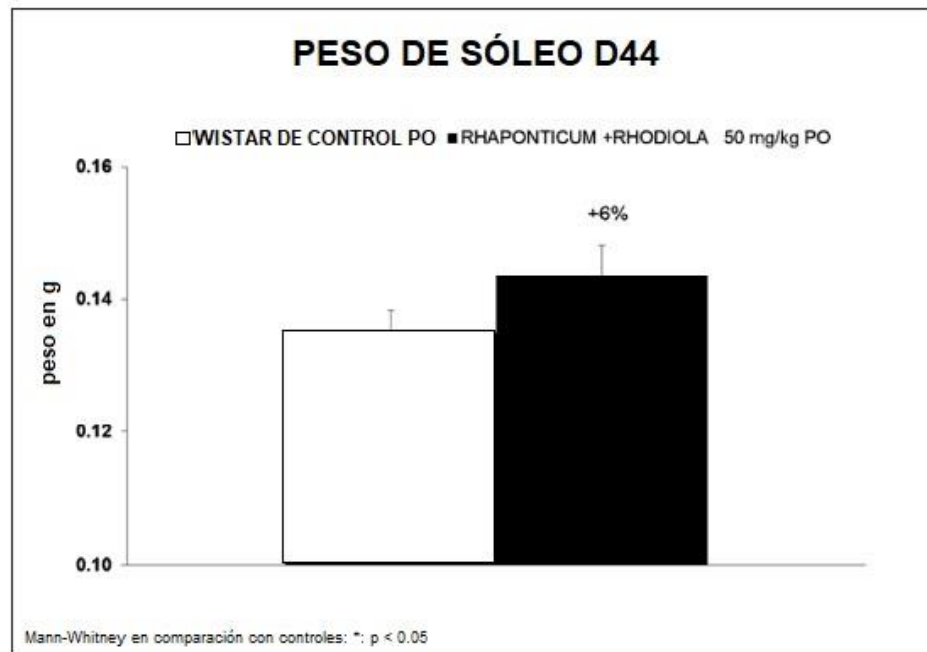
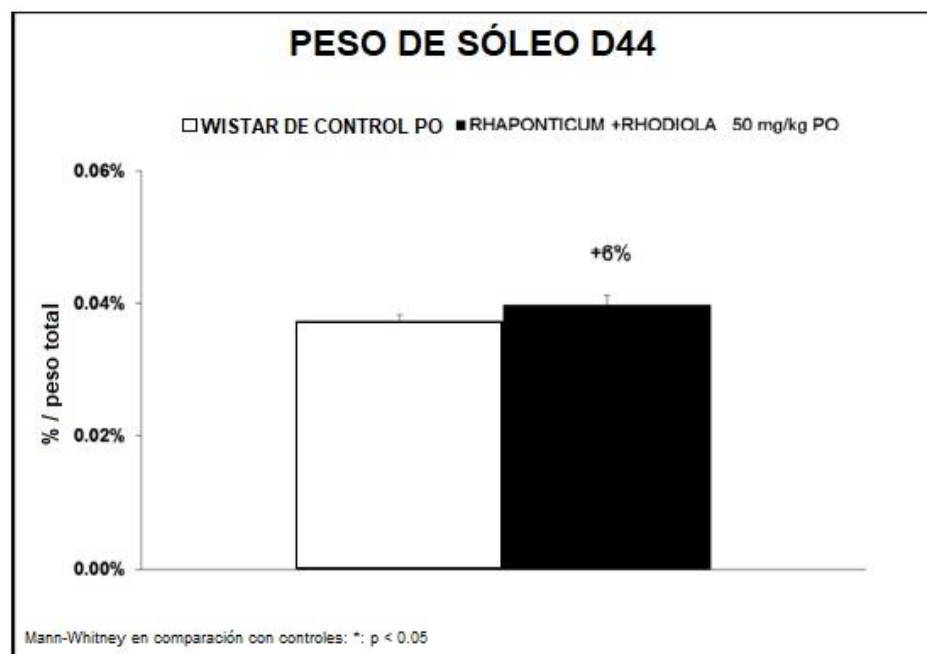
**Fig. 29a**

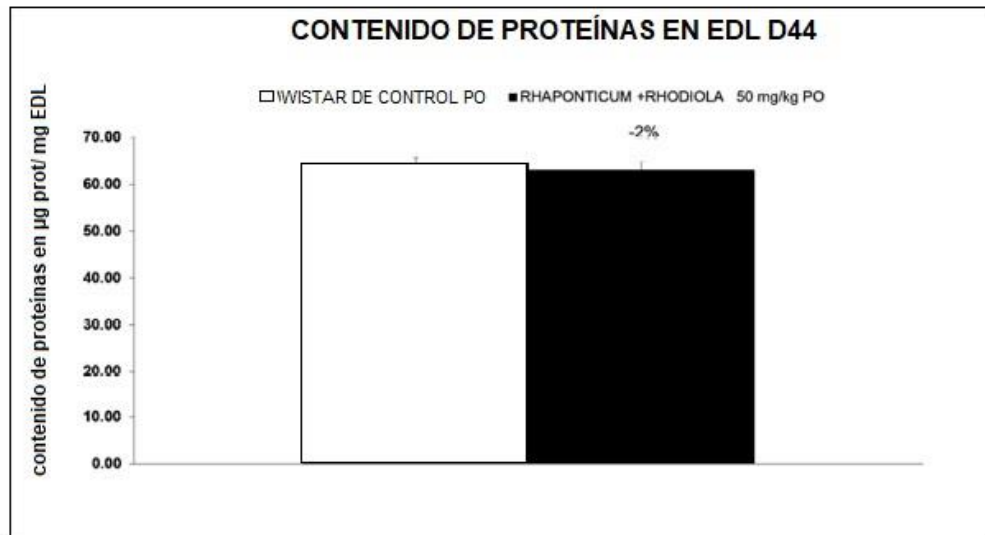
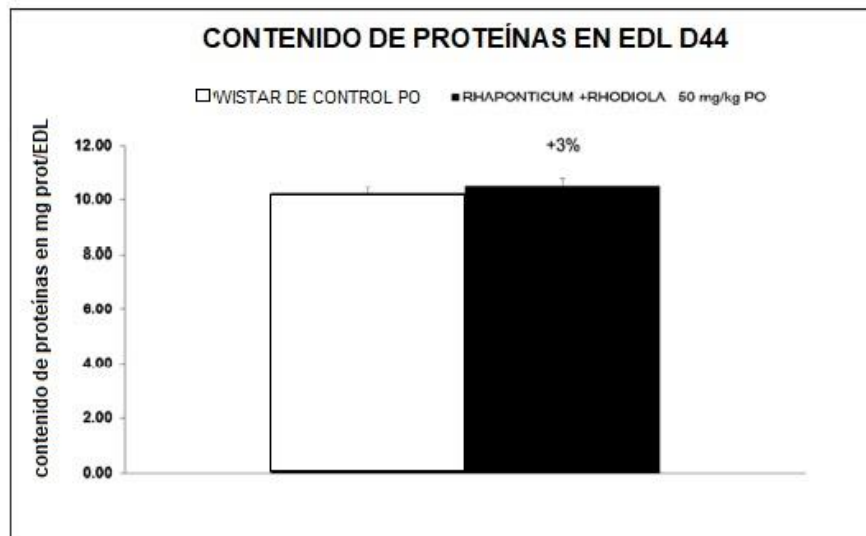
Fracción	Mejor estimulación de síntesis de proteínas
F1 etapa 1	Sin activación
F3 purificado etapa 1	Sin activación
F0 EtOH al 50 % etapa 3	120 % a 11.4 µg/mL
F5' purificado etapa 3	Sin activación
F7 EtOH al 70 % etapa 1	129 % a 3 µg/mL
F5 purificado etapa 1	123 % a 300 µg/mL

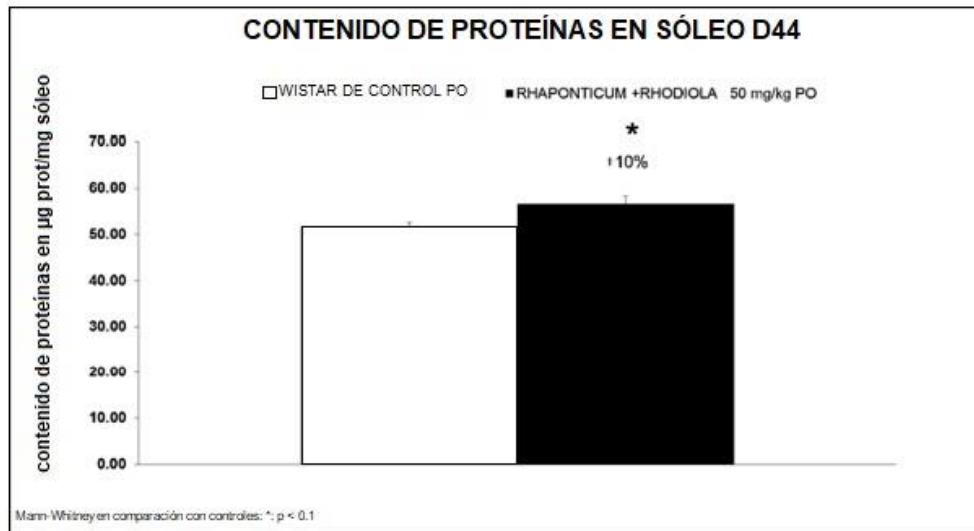
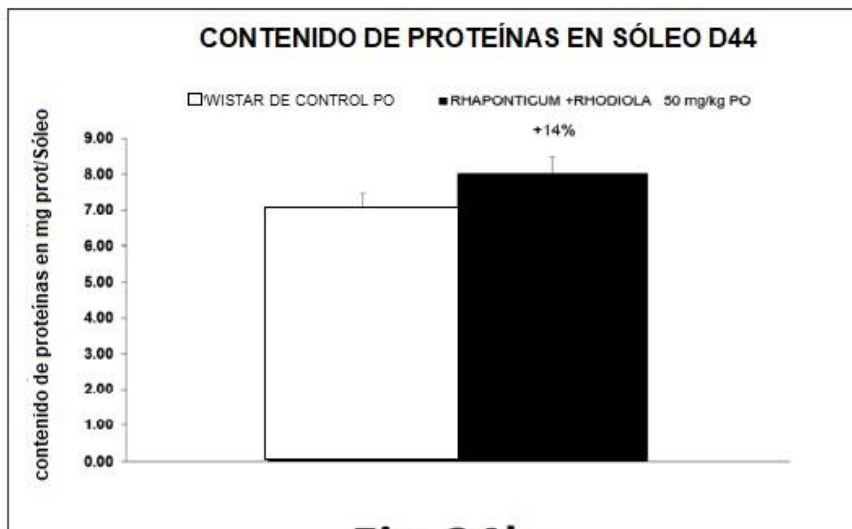
Fig. 29b

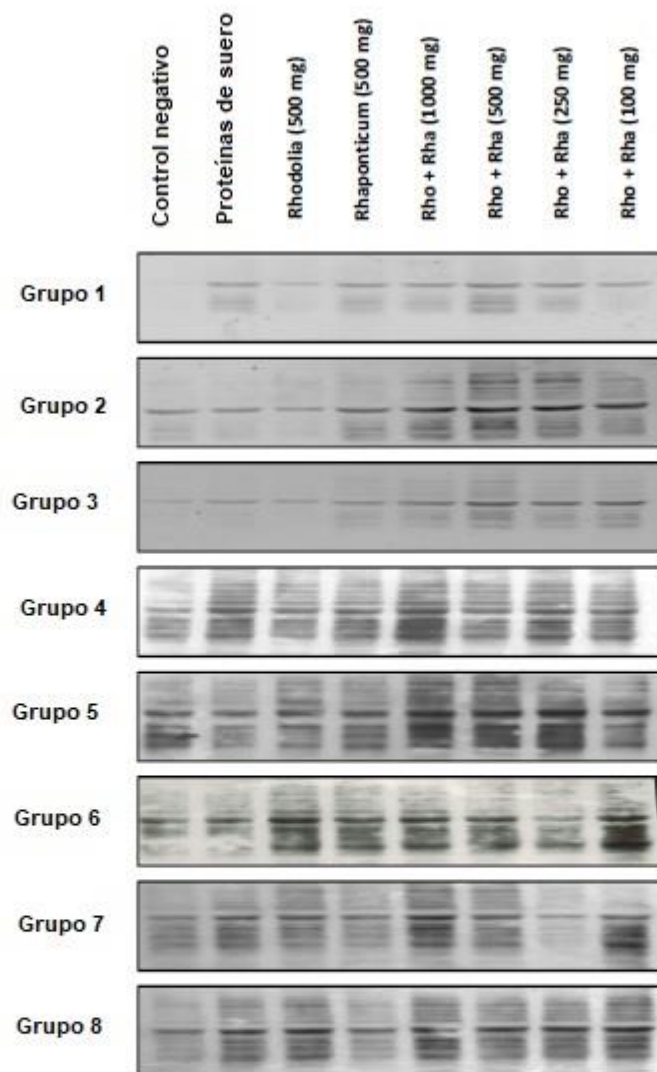
**Fig. 30a****Fig. 30b**

**Fig. 31a****Fig. 31b**

**Fig. 32a****Fig. 32b**

**Fig. 33a****Fig. 33b**

**Fig. 34a****Fig. 34b**

**Fig. 35a**

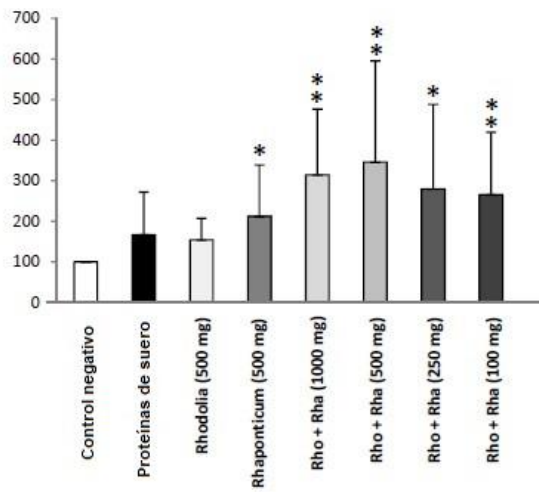


Fig. 35b

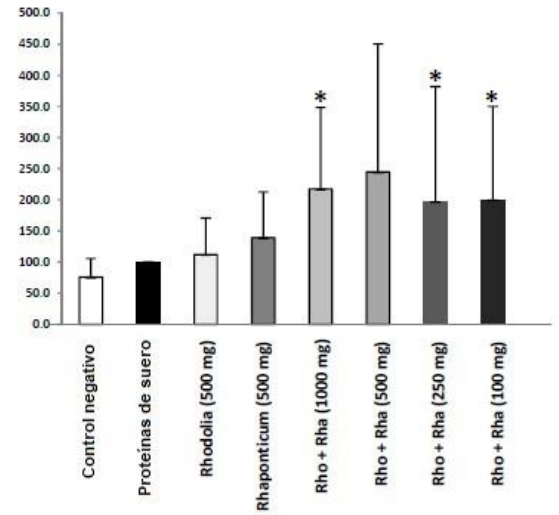


Fig. 35c

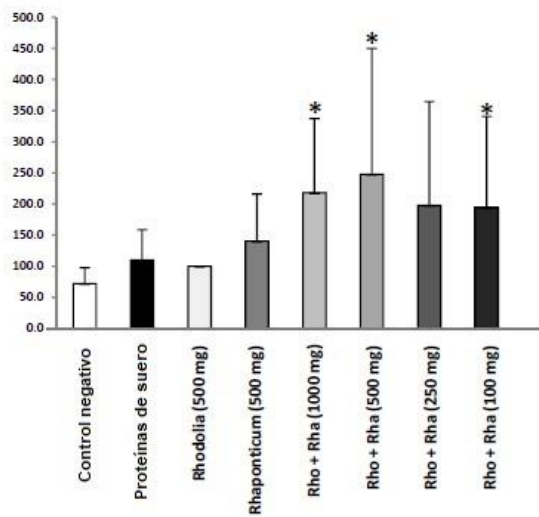


Fig. 35d

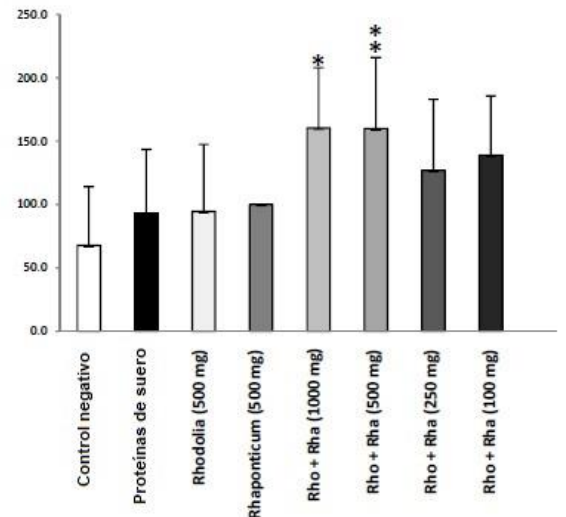
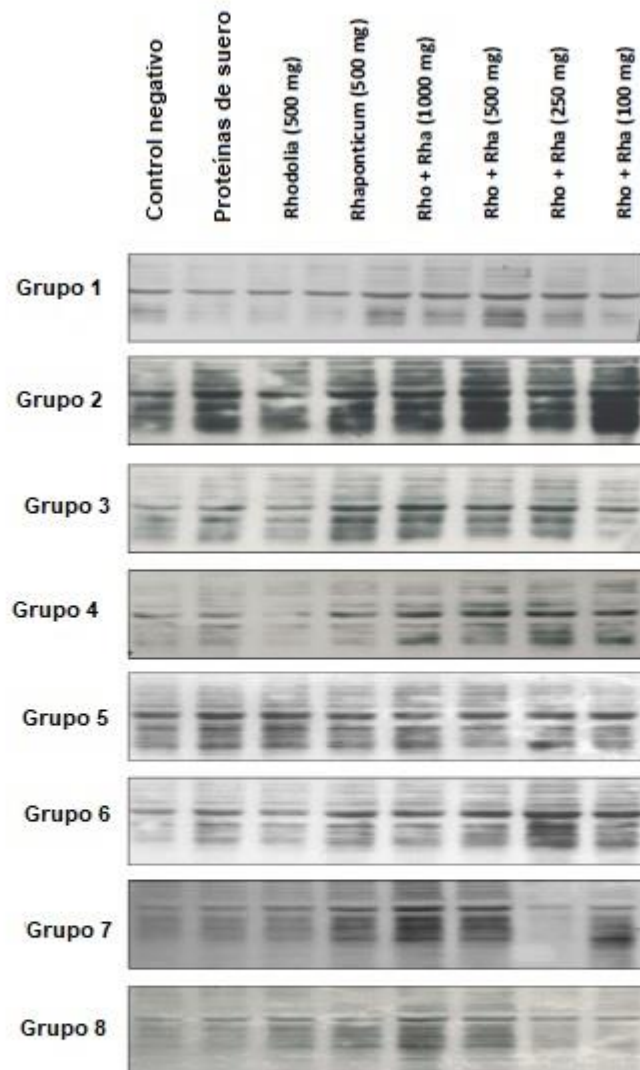


Fig. 35e

**Fig. 36a**

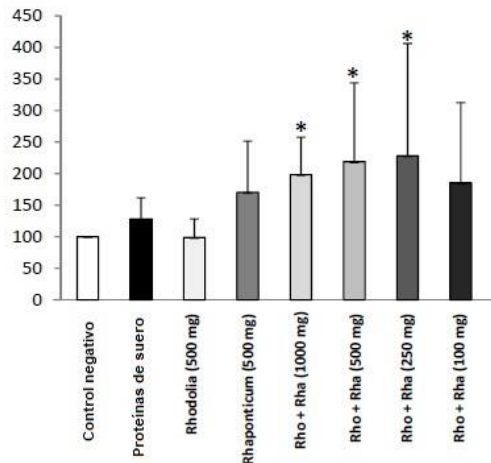


Fig. 36b

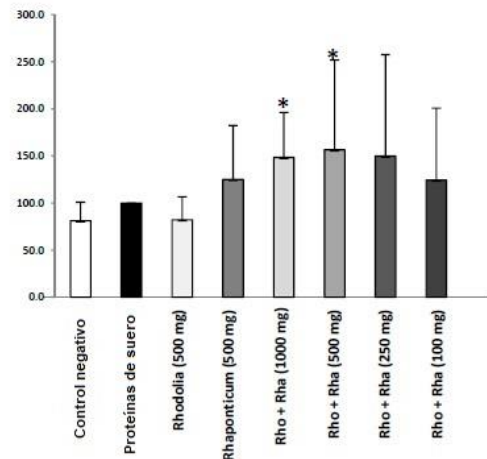


Fig. 36c

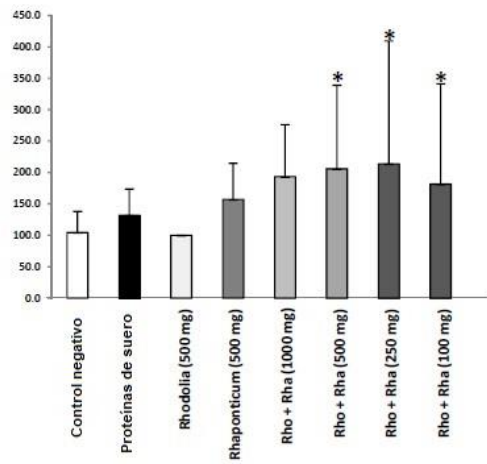


Fig. 36d

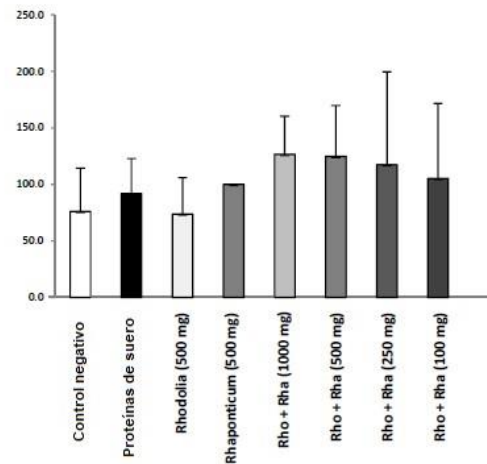
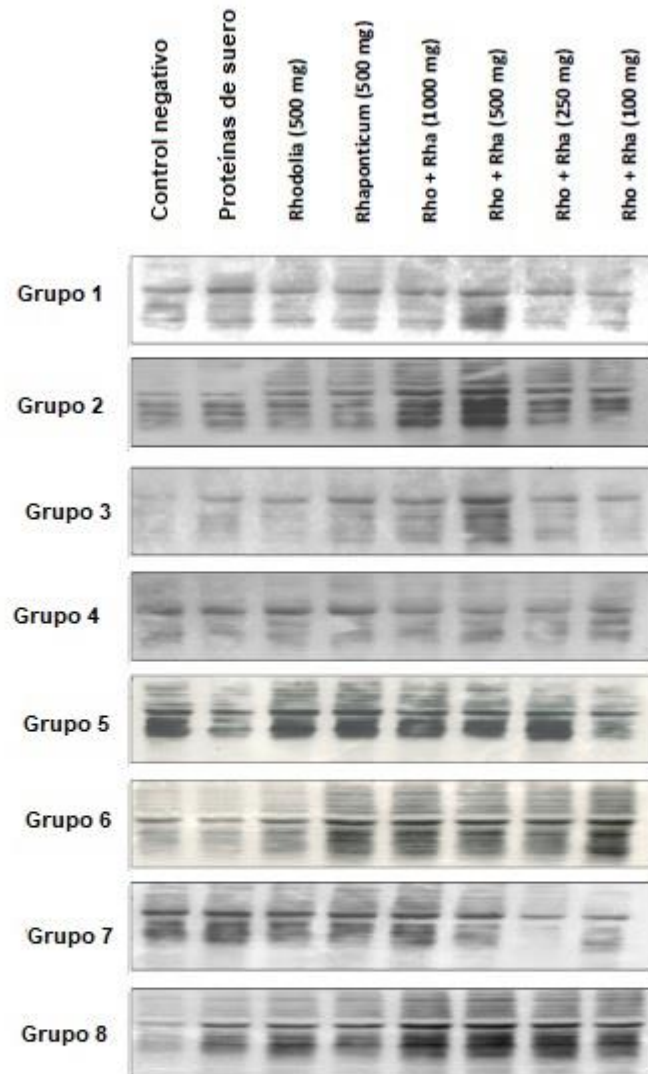


Fig. 36e

**Fig. 37a**

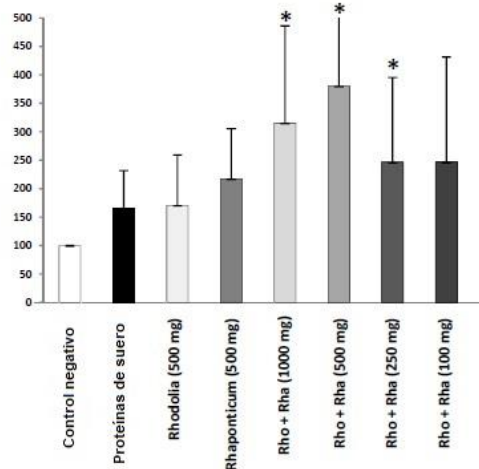


Fig. 37b

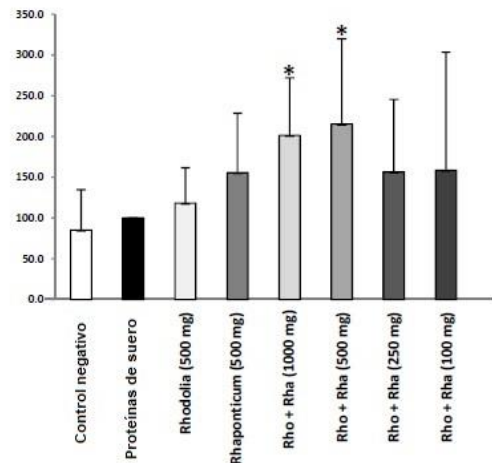


Fig. 37c

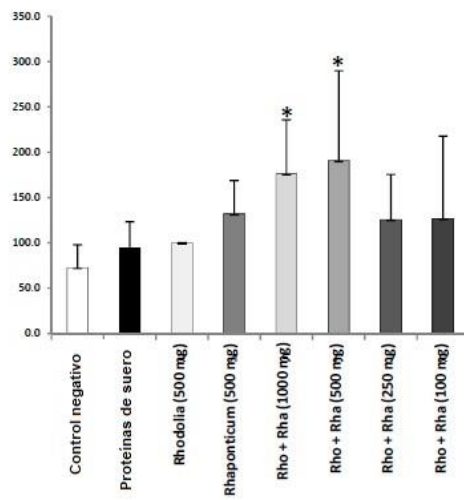


Fig. 37d

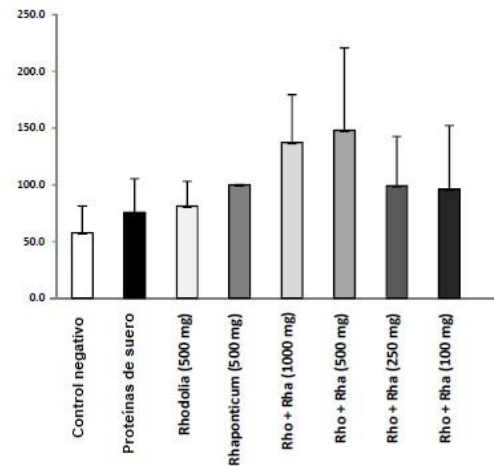
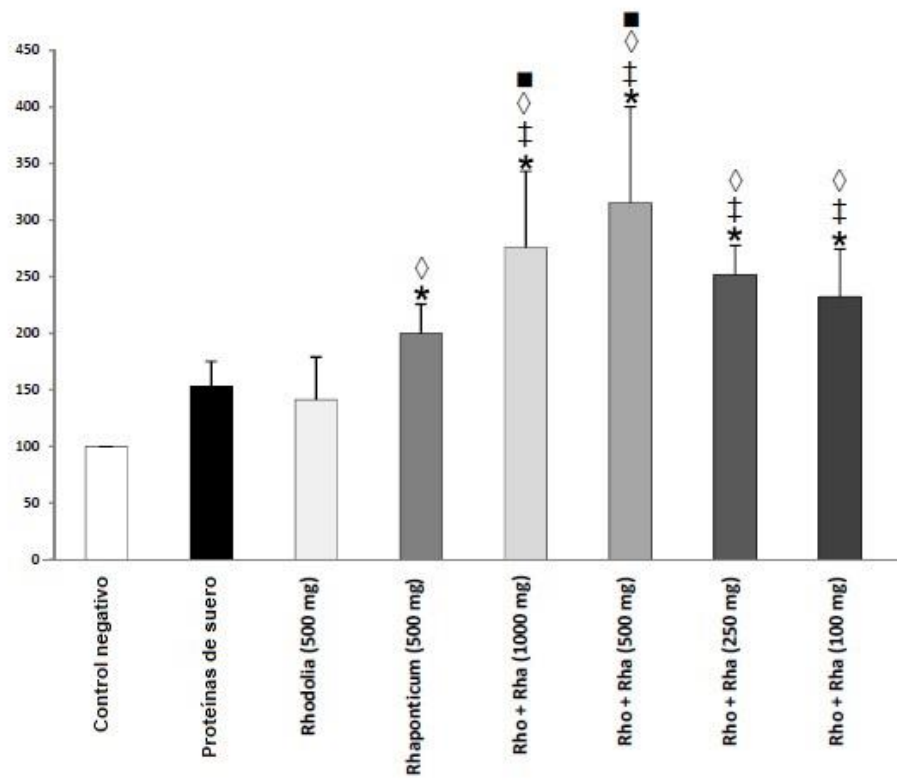


Fig. 37e

**Fig. 38**