



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 239 908**

② Número de solicitud: 200400755

⑤ Int. Cl.:
A61K 36/63 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **26.03.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2005**

Fecha de la concesión: **28.11.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2006**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.12.2006

⑦ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Zaragoza**

⑧ Inventor/es: **Ruiz Gutiérrez, Valentina;
Sánchez Perona, Javier y
Osada García, Jesús de la**

⑨ Agente: **No consta**

⑩ Título: **Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado como retardador de la aterosclerosis.**

⑪ Resumen:

Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado como retardador de la aterosclerosis.

El objeto de la invención es la aplicación nutricional-farmacológica del aceite de orujo de oliva de centrifugación refinado. Se describe la influencia del aceite de orujo de centrifugación refinado sobre el desarrollo de la lesión arteriosclerótica, para considerar a este aceite como alimento funcional ya que presenta unas propiedades sanitarias más allá de su función nutricional al ser un alimento natural destinado a mejorar el estado de poblaciones con riesgo de aterosclerosis.

ES 2 239 908 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado como retardador de la aterosclerosis.

5 Objeto de la invención

El objeto de la invención es la aplicación nutricional-farmacológica del aceite de orujo de oliva de centrifugación refinado. Se describe la influencia del aceite de orujo de centrifugación refinado sobre el desarrollo de la lesión arteriosclerótica, para considerar a este aceite como alimento funcional ya que presenta unas propiedades sanitarias más allá de su función nutricional al ser un alimento natural destinado a mejorar el estado de poblaciones con riesgo de aterosclerosis.

Estado de la técnica

El aceite de orujo de oliva es el que se obtiene a partir de los residuos de las aceitunas, una vez extraído el aceite de oliva virgen por presión. Mediante métodos mecánicos es posible separar el aceite de oliva virgen de las otras fases de la pasta de aceitunas, tanto líquida (alpechín) como sólidas (orujo). El orujo contiene todo el aceite no extraído por la centrifugación, denominándose alperujo. Tradicionalmente, este aceite ha sido siempre recuperado mediante el empleo de hexano. Se obtiene así un aceite de orujo de oliva crudo, que posteriormente se refina, obteniéndose aceite de orujo de oliva refinado que se puede consumir encabezado con aceite de oliva virgen.

En la patente de invención publicada como ES 2 048 667 (Oleícola El Tejar) se da a conocer un procedimiento para la extracción de aceite de orujo de oliva sin utilización de disolventes orgánicos, denominado de 2ª centrifugación ó de repaso [J. Alba Mendoza, F. Hidalgo Casado, Mª A. Ruíz Gómez, F. Martinez Roman, Mª J. Moyano Pérez, A. Cert Ventulá, Mª C. Pérez-Camino y Mª V. Ruíz-Méndez. "Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación" Grasas y aceites, 47. 163-181 (1996)]. Ciertos aceites obtenidos mediante dicho procedimiento, denominados "de segunda centrifugación" ó "repaso", una vez refinados, presentan las siguientes características:

30 Acidez: $\leq 0,3$

Índice de peróxidos (meq. O₂/Kg) max: ≤ 5

Restos de disolventes (mg/Kg) = 0,0

35 Alcoholes alifáticos (mg/Kg): ≥ 1000

Ceras (mg/kg): 3000-6000

40 Ácidos grasos saturados en sn-2: $\leq 2,0\%$

Tocoferoles totales (mg/kg): ≥ 200

Eritrodiol+uvaol (mg/Kg): ≥ 200

45 Esteroles totales (mg/Kg): ≥ 1600

Ácido oleanólico (mg/Kg): ≥ 50

50 Ácido maslínico (mg/Kg): ≥ 100

Un aceite de orujo de estas características es el que se ha empleado en la presente invención.

55 Explicación de la invención

El objeto de la presente invención es la utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis. Asimismo dicho aceite de orujo se puede emplear en la preparación de nutraceúticos o de fitofármacos con el mismo propósito e incluso en la preparación de un medicamento retardador de la aterosclerosis.

El aceite de orujo de centrifugación refinado se puede utilizar para dicho propósito tal cual se obtiene o bien encabezándolo con hasta un 5% de aceite de oliva virgen. Es igualmente posible el añadir al aceite de orujo de centrifugación refinado, encabezado o no con aceite de oliva virgen, cantidades complementarias de otros compuestos, en particular tocoferoles hasta llegar a una cantidad total de al menos 1000 mg de tocoferoles totales por cada Kg de aceite y de ácido oleanólico hasta un total de 100 ppm.

El efecto retardador de la aterosclerosis se manifiesta a través de la disminución de triglicéridos y de lipoproteínas

VLDL y HDL en ratones carentes de apolipoproteína E y también a través de la disminución de leucocitos circulantes en sangre que expresan la integrina Mac-1 en esos mismos ratones.

Breve descripción de las figuras

5

Fig 1. *Perfil de lipoproteínas plasmático obtenido por FPLC en los ratones carentes de apo E con las diferentes dietas.* Fracciones 4-8 15 corresponden a TRL, 9-17 a LDL y fracciones 18-24 a HDL.

10

Fig 2. *Porcentaje de leucocitos que expresan Mac-1 tras la administración de las diferentes dietas.* Mediante citometría de flujo, se calculó el porcentaje de leucocitos que expresaron la integrina Mac-1 (CD11b) tras la tinción con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia.

15

Fig 3. *Áreas de lesiones aórticas de los ratones carentes de apo E alimentados con las diferentes dietas.* Resultados son media \pm SEM de cada grupo. Los análisis estadísticos se efectuaron mediante la U de Mann-Whitney.^{a,b}, $p < 0.05$ vs control y oliva, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

20

25

El objeto de la presente invención es la utilización del aceite de orujo de centrifugación refinado como retardador de la aterosclerosis, por tanto como alimento funcional según la recomendación de la European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSE), quien en la actualidad pretende definir y caracterizar los alimentos funcionales como alimentos que consumidos en cantidades normales en la dieta habitual tienen efectos beneficiosos para la salud. En este sentido, el aceite de orujo de centrifugación refinado es un alimento natural, obtenido en condiciones en las que no se añade ni quita ningún componente mediante medios tecnológicos o biológicos, diferente del que contenga en su extracción natural y que posee propiedades que ayudan a disminuir el riesgo de padecer arteriosclerosis. Se define como "Cardiorujo de oliva" al aceite referido anteriormente a la vista de los resultados obtenidos en ratones transgénicos, concretamente ratones carentes de la apolipoproteína E (apo E knock-out).

30

Animales empleados

35

La tecnología transgénica ha generado una serie de ratones muy útiles para el estudio de la hiperlipidemia y de la arteriosclerosis que se añaden a las ventajas que poseen estos modelos animales tales como la economía en su mantenimiento, ya que requieren pequeñas cantidades tanto de alimento como de agentes de ensayo. Adicionales ventajas son su fácil reproducción en un corto periodo de tiempo y la disponibilidad de razas puras con fenotipos heredables perfectamente conocidos.

40

45

Trabajando con estos animales se está delimitando la influencia de componentes ambientales y genéticos en el desarrollo del proceso arteriosclerótico, más concretamente en los procesos celulares y moleculares que intervienen en el mismo. Ha sido precisamente la generación de ratones modificados genéticamente que presentan lesiones vasculares complejas lo que ha permitido disponer de un sistema de referencia para evaluar la progresión o el retraso de la enfermedad vascular en presencia de diferentes proteínas o agentes ambientales (Functional Food Science in Europe. (1998). *British Journal of Nutrition*, 80(1):S1-S193). Estos ratones, sin los cuales todo este progreso sería imposible, son los ratones carentes de la apolipoproteína E (apo E knock-out). Además, en ellos se ha desarrollado una estandarizada metodología para evaluar el grado de lesión que permite cuantificar exactamente la contribución de un agente (Osada J, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000;11(1):25-9).

50

55

60

Los ratones carentes de la apolipoproteína E, alimentados con una dieta comercial estándar baja en grasa (4%) y con un 0.01% (p/p) de colesterol, muestran unos niveles de colesterol de 500 mg/dl, mientras que los animales sanos, en las mismas condiciones, se mantienen en 75 mg/dl (Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(11):2336-2345 y Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetala K, Walsh A, Verstuyft JG, *et al.* Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein-E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells. *Cell* 1992;71(2):343-353). Esta elevación de los niveles de colesterol plasmático se debe principalmente al aumento del colesterol transportado por las VLDL, IDL y LDL. El ratón deficiente en apo E, con una dieta normal, desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea (Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein-E. *Science* 1992;258(5081):468-471 y Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. Apo E-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14:133-140). Un análisis cronológico de esta aterosclerosis muestra la misma secuencia de formación de la lesión que la ya establecida en otros modelos animales y en el hombre. Las lesiones se extienden por el entramado arterial, formándose en primer lugar en la base de la aorta y en las arterias coronarias proximales, para continuar luego a lo largo de toda la aorta, con una predisposición especial en los puntos de ramificación de los vasos mayores: las arterias carótidas, las intercostales, las mesentéricas, las renales y las iliacas.

65

Con estos animales se estudiará la influencia sobre el desarrollo de la lesión arteriosclerótica del aceite de orujo de centrifugación refinado.

ES 2 239 908 B1

Aceite empleado

A continuación se definen las características del insaponificable del aceite empleado procedente de Oleícola El Tejar de la campaña 2002-2003:

5	Acidez: 0.1
	Índice de peróxidos (meq. O ₂ /kg) max: ≤ 5
10	Restos de disolventes (mg/kg) 0,00
	Ceras (mg/kg): 3484
15	Alcoholes alifáticos (mg/kg): 3117
	Ácidos grasos saturados en sn-2: 2,0%
	Tocoferoles totales (mg/kg): 468
20	- α-tocoferol (mg/kg): 386
	- β-tocoferol (mg/kg): 38
25	- γ-tocoferol (mg/kg): 44
	Eritrodiol+uvaol (mg/kg): 507
	Esteroles totales (mg/Kg): 2245
30	Ácido oleanólico (mg/kg): 59
	Ácido maslínico (mg/kg): 107
35	Saponificable del aceite:

Composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

40	Laúrico C.12	ND
	Mirístico C.14	0,02
	Palmitico C.16	10,29
45	Palmitoleico C.16:1	0,76
	Esteárico C.18	2,95
50	Oleico C.18:1	74,27
	Linoleico C.18:2	8,07
	Linolénico C. 18:3	0,70
55	Aráquico C.20	0,45
	Gadoleico C.20:1	0,33
60	Behénico C.22:1	0,17
	Erúxico C.22:1	ND
	Lignocérico C.24	0,07

65

Modo de realización de la invención*Animales*

5 Se utilizaron ratones machos híbridos de C57BL/6J y 1290la carentes de apo E homocigotos descendientes de los generados por Piedrahita y cols. (Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4471-4475) y se mantuvieron en la Unidad Mixta de Investigación de Zaragoza, España. A 26 animales de dos meses de edad se les puso en ayuno durante 18 horas. Se les anestesió con isofluorano y se obtuvo su sangre por punción retroorbital para la determinación de colesterol plasmático. Se dividieron al azar en tres grupos de idéntico nivel de colesterol y se mantuvieron en jaulas estériles provistas de filtro en habitaciones con ciclos de 12 horas de luz y las mismas de oscuridad. Los animales tuvieron libre acceso al agua y a la comida. El pienso fue suministrado por Harlan Teklad (Harlan Ibérica, Barcelona). Se hizo un seguimiento del peso de los animales a lo largo del estudio y ninguno de los animales murió durante el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité ético para la experimentación animal de la Universidad de Zaragoza.

15

Dietas

Los tres grupos recibieron: a) la dieta del ratón para el grupo control, b) la dieta del ratón suplementada con un 10% (p/p) de aceite de oliva virgen de reciente preparación y c) la dieta del ratón enriquecida con un 10% (p/p) de aceite de orujo. Las dietas se prepararon semanalmente y se almacenaron en atmósfera de N₂ a 20°C. Las dietas se suministraron durante 11 semanas y fueron bien toleradas.

20

Análisis de moléculas de adhesión en células sanguíneas

25 Tras 10 semanas de la dieta, Se tomaron muestras retroorbitales de los animales previamente ayunados y anestesiados con isofluorano. Aproximadamente 1×10^6 leucocitos, se resuspendieron en PBS que contenía 0.1% (w/v) BSA y 10 mmol/l azida sódica. En ellos se estudió la expresión de Mac-1 (CD11b) por citometría de flujo. Los datos se expresan como porcentaje de células marcadas positivamente.

30

Análisis de lípidos y lipoproteínas

Finalizado el periodo experimental los animales fueron sacrificados con una inyección de avertina (Aldrich Chemical Co., Madrid, España) y se obtuvo la sangre por punción cardiaca. Las concentraciones plasmáticas de colesterol total y de triglicéridos se midieron enzimáticamente en placas de microensayo usando kits de Sigma Chemical Co. (Madrid, España) y Boehringer Mannheim GMBH (Barcelona, España). Como control de calidad del proceso se utilizó cardiolipid (Sigma). Para un análisis más detallado de los perfiles lipoproteicos, una mezcla de 100 μ l de plasma de los animales de cada grupo se sometió a cromatografía líquida de filtración por gel en una columna de Superosa 6B (Pharmacia LKB Biotechnology, Barcelona, España) de acuerdo con las condiciones descritas por Calleja y cols (Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19(10):2368-2375). Se recogieron fracciones de 0.5 ml y se midió el colesterol total como se ha descrito anteriormente.

35

40

Evaluación de la lesión aterosclerótica

45 El corazón y el sistema circulatorio arterial se perfundió con tampón fosfato formalina (4% pH 7.4 Panreac, Barcelona, España) a presión fisiológica. Los corazones y las aortas fueron diseccionados, limpiados y almacenados en formaldehído neutro. La zona de las aurículas y la base de la aorta se extrajeron para su análisis y se transfirieron a un tubo con OCT (Bayer Diagnostic, Germany) donde se mantuvieron 24 horas para eliminar burbujas. Los corazones se situaron sobre la base de un criostato (Microm HM505E, Barcelona España) con OCT nuevo. Se recogieron cortes seriados de la aorta proximal y del seno aórtico, se tiñeron con Sudan IV B (Sigma Chemical Company), y un tinte de contraste con hematoxilina y eosina (Sigma Chemical Company). La evaluación morfológica se realizó según el método de Paigen y cols. (Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis 1987;68:231-240) tomando el tamaño medio de la lesión de las cuatro secciones, que comprenden desde la región proximal aórtica hasta el seno aórtico que contenía las tres válvulas completas. Las lesiones fueron capturadas utilizando un microscopio Canon con una videocámara conectada a un ordenador. La cuantificación de la lesión aterosclerótica y el perímetro de los vasos se realizaron con el software NIH Image.

50

55

Análisis estadístico

60 Los datos fueron analizados con el programa InStat para Windows (GraphPad). La mayoría de los parámetros en este estudio no siguen una distribución normal de acuerdo con el test de Shapiro-Wilk. Así pues, para el análisis estadístico se realizó el test de la U Mann-Whitney para los datos no apareados. Las diferencias se consideraron no significativas cuando $P > 0.05$. La asociación entre variables se realizó por el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman.

65

Resultados*Efecto de las diferentes dietas sobre los parámetros somáticos y plasmáticos*

Después de 11 semanas de administración de las dietas, no se observaron cambios en el peso corporal en los diferentes grupos (Tabla I). Tampoco se observaron cambios en el peso del hígado por el enriquecimiento graso de las dietas. Tal como se muestra en la tabla, el colesterol plasmático no experimentó variaciones significativas en ninguna de las intervenciones dietéticas, en concordancia con resultados previos al aportar el contenido de lo graso del 10% a estos animales. Ni el colesterol transportado en HDL, ni los triglicéridos plasmáticos aparecieron afectados en el grupo de aceite de oliva y si aparecieron disminuidos en el grupo de animales alimentados con el aceite de orujo.

TABLA I

Efecto de las dietas experimentales en ratón carente de ApoE

	Control (n= 9)	Oliva (n= 9)	Orujo (n= 8)
Variación peso corporal (g)	3,4 ± 1,4	4,4 ± 0,8	4,0 ± 1,0
Peso hígado (g)	0,78 ± 0,08	0,79 ± 0,15	0,76 ± 0,08
Colesterol plasmático (mmol.l ⁻¹)	15,5 ± 2,4	17,4 ± 2,4	16,1 ± 3,8
Colesterol en HDL (mmol.l ⁻¹)	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1‡*
Triglicéridos plasmáticos (mmol.l ⁻¹)	1,7 ± 0,4	2,4 ± 1,4	1,1 ± 0,4‡*

Los resultados se expresan como medias ± SD. Las dietas fueron proporcionadas durante 11 semanas. El análisis estadístico se refleja como † P = 0.01, ‡ P = 0.05 vs control, * P=0.05 vs oliva.

La distribución del colesterol plasmático entre las diferentes lipoproteínas plasmáticas fue analizado por cromatografía líquida en una columna de Superose 6B y se muestra en la figura 1. El grupo que recibió el aceite de oliva presentó mayores niveles de lipoproteínas LDL en tanto que el grupo que recibió el aceite de orujo presentó menores niveles de lipoproteínas VLDL y HDL en consonancia con la disminución de triglicéridos (principalmente transportados en VLDL) y el descenso de HDL verificado por el método de precipitación que se presentó en la tabla I. Estos resultados indican que los componentes que diferencian a ambos aceites poseen suficiente potencia para cambiar el comportamiento de los parámetros lipídicos en estos animales.

Efecto de las diferentes dietas sobre el porcentaje de leucocitos activados y potencialmente reclutables a través de la integrina Mac-1

Se analizó el porcentaje de leucocitos circulantes en sangre que expresan Mac-1 para ver la activación de estas células. Debido a que esta integrina permite la interacción de los monocitos circulantes con las moléculas ICAM-1 y 2 del endotelio y así su migración a los focos ateroscleróticos, es una diana importante en el desarrollo de la arteriosclerosis. En la figura 2 se muestra el porcentaje de leucocitos que expresan Mac-1 en los grupos de ratones que consumieron las dietas control, enriquecida en oliva o en orujo. Tal como se aprecia el último grupo presentó los valores más bajos de células potencialmente reclutables comparados con las otras dos dietas.

Efecto de las diferentes dietas sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica

En la figura 3 se muestran los valores cuantitativos de las lesiones ateroscleróticas en los animales tras el consumo de las diferentes dietas. Los animales cuya dieta estuvo enriquecida en el aceite de oliva presentaron mayores valores de lesión que el grupo control. En contraste, el grupo que recibió el aceite de orujo presentó valores significativamente más bajos que los animales alimentados con las otras dos dietas.

ES 2 239 908 B1

Estos resultados globalmente indican que los componentes presentes en el aceite de orujo ensayado tienen suficiente potencia para disminuir el desarrollo de la aterosclerosis en los ratones deficientes en la apolipoproteína E y que en este proceso están implicados procesos celulares tales como la activación de Mac-1 en leucocitos circulantes junto con cambios de triglicéridos circulantes y en menor proporción de lipoproteínas de alta densidad, puesto que el perfil de este último parámetro (descenso de colesterol en HDL) observado para el aceite de orujo fue hallado de características negativas. El aceite de orujo fue perfectamente tolerado por todos los animales y no tuvo repercusiones de sobrepeso, ni aumento de masa hepática en las dosis administradas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado **caracterizado** porque se emplea en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis.

10 2. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho efecto retardador de la aterosclerosis se manifiesta a través de la disminución de triglicéridos y de lipoproteínas VLDL y HDL en ratones carentes de apolipoproteína E.

15 3. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho efecto retardador de la aterosclerosis se manifiesta a través de la disminución de leucocitos circulantes en sangre que expresan la integrina Mac-1 en ratones carentes de apolipoproteína E.

20 4. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado **caracterizado** porque se emplea en la preparación de nutraceúticos retardadores de la aterosclerosis.

5. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado **caracterizado** porque se emplea en la preparación de fitofármacos retardadores de la aterosclerosis.

25 6. Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado **caracterizado** porque se emplea en la preparación de medicamentos retardadores de la aterosclerosis.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

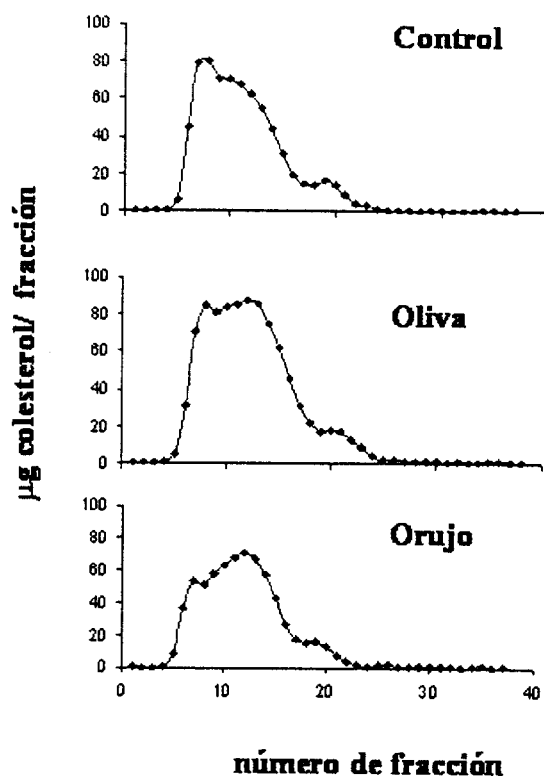


Figura-2

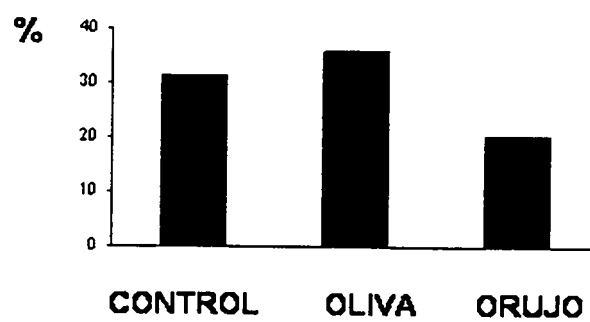
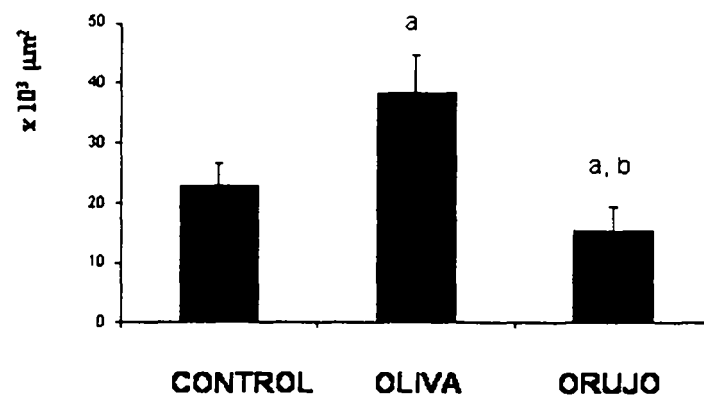


Figura 3





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 239 908

② Nº de solicitud: 200400755

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.03.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 35/78, A61P 9/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	COVAS, M.I. et al.: "Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation", Int. J. Clin. Pharm. Res., (2000), Vol. XX (3/4), páginas 49-54, todo el documento, en particular, resumen.	1-6
A	WO 2004005237 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS y UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 15.01.2004, resumen.	1-6
A	MANGIAPANE, E.H. et al.: "Modulation of the regression of atherosclerosis in the hamster by dietary lipids: comparison of coconut oil and olive oil", British J. Nutr., (1999), Vol. 82, páginas 401-409, todo el documento.	1-6
A	COVAS, M.I. et al.: "Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans", Drugs Exptl. Clin. Res., (2003), Vol. XXIX (5/6), páginas 203-206, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.08.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1