

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 918**

51 Int. Cl.:

A61K 31/12 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2004 E 04735029 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 1641444**

54 Título: **Tratamiento de la fatiga muscular**

30 Prioridad:

02.06.2003 GB 0312603
13.06.2003 GB 0313760

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

23.06.2016

73 Titular/es:

ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)
EWERT HOUSE, EWERT PLACE
SUMMERTOWN, OXFORD OX2 7SG, GB

72 Inventor/es:

CLARKE, KIERAN;
SCHEUERMANN-FREESTONE, MICHAELA y
MURRAY, ANDREW, JAMES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 574 918 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la fatiga muscular

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al tratamiento de la fatiga o disfunción muscular, en particular al tratamiento de la enfermedad cardiovascular y, en particular, de la insuficiencia cardíaca.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad cardiovascular es la causa principal de muerte en pacientes con diabetes tipo 2,¹ la cual ha reducido la supervivencia tras infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva e isquemia silente en comparación con participantes de control no diabéticos.^{1,2} La diabetes mellitus tipo 2 es un trastorno metabólico crónico caracterizado por la resistencia a la insulina, hiperglucemia, hiperinsulinemia y elevada concentración en plasma de ácidos grasos libres, con escaso control glucémico asociado a un aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca.^{2,3} Las intervenciones terapéuticas que normalizan el metabolismo de los lípidos y la glucosa reducen la incidencia de la enfermedad cardiovascular en pacientes con diabetes,⁴ siendo el control metabólico de las diabetes el factor predictivo más importante de la morbilidad y mortalidad cardiovasculares.¹

15 En el corazón adulto normal se metabolizan ácidos grasos libres, glucosa y lactato para la producción de ATP en las mitocondrias. Sin embargo, en el corazón diabético la oxidación de glucosa y lactato disminuye^{5,6} y aumenta la oxidación de los ácidos grasos,⁷ aumentando el requerimiento de oxígeno por molécula de ATP producida.^{2,4,7,8} Los estudios de tomografía por emisión de positrones han demostrado que los pacientes con diabetes tipo 2 han reducido las velocidades de flujo sanguíneo miocárdico en reposo⁹ y han disminuido las velocidades de captación de la fluorodesoxiglucosa,¹⁰ aunque poco se sabe del metabolismo cardíaco de los fosfatos de alta energía en estos pacientes. Análogamente, el flujo sanguíneo músculo esquelético,¹¹ y el transporte transmembrana y la oxidación de la glucosa² se reducen en la diabetes. Los pacientes con diabetes tipo 2 tienen una tolerancia limitada al ejercicio,^{2,12,13} que se ha asociado a una disminución del control glucémico¹² y a la enfermedad microvascular.¹³

20 El documento WO00/64876 desvela derivados de triaril ácido que modulan la función de receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR), para reducir los niveles de triglicéridos y, por tanto, para tratar trastornos asociados a altos niveles de triglicéridos, incluyendo la diabetes.

El documento WO01/74834 desvela compuestos específicos que inhiben a los transportadores de glucosa dependientes del sodio y se pueden usar, por tanto, para tratar la diabetes y complicaciones asociadas.

30 El documento WO02/028857 desvela compuestos específicos que pueden actuar como antidiabéticos. Se indica que los compuestos tienen múltiples actividades que incluyen la reducción de triglicéridos y ácidos grasos libres en el plasma.

El documento WO99/24451 desvela derivados de la adenosina que inhiben la lipólisis y, por tanto, reducen los niveles de ácidos grasos libres.

35 El documento WO01/51645 desvela polipéptidos que reducen los niveles de ácidos grasos libres, con el fin de reducir la masa corporal.

Si bien el estado de la técnica desvela que la reducción de los niveles de ácidos grasos libres es deseable en el tratamiento o la prevención de la diabetes y sus complicaciones asociadas, no hay mención alguna de que tal reducción de los niveles de ácidos grasos libres se pueda usar para el tratamiento de la fatiga o disfunción muscular.

Sumario de la invención

40 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el metabolismo cardíaco de los fosfatos de alta energía se ve modificado significativamente en pacientes con diabetes tipo 2, a pesar de una función y una morfología cardíaca aparentemente normales. Las modificaciones del metabolismo de los fosfatos se correlacionan con las concentraciones de ácidos grasos libres circulantes y de glucosa. Por el contrario, la oxigenación y la energía músculo esquelética son normales en reposo, pero la desoxigenación y la pérdida de fosfocreatina son más rápidas durante el ejercicio y la reoxigenación y la recuperación de fosfocreatina son más lentas tras el ejercicio. Estos descubrimientos sugieren que las modificaciones de la energía músculo esquelética y cardíaca aparecen precozmente en la patofisiología de la diabetes tipo 2 y están asociadas a modificaciones de los sustratos metabólicos. Los descubrimientos sugieren que una reducción de los ácidos grasos libres puede ser útil en el tratamiento de la disfunción muscular en general, y de la disfunción muscular cardíaca, en particular. Asimismo, la reducción de los ácidos grasos libres puede ser un objetivo deseable en el tratamiento de trastornos asociados a la disfunción mitocondrial. El tratamiento de la disfunción muscular cardíaca es distinto del tratamiento de la enfermedad cardiovascular, que es causada por el desarrollo de placas arteroescleróticas en la vasculatura; la presente invención, por el contrario, implica la reparación (o la prevención del daño) del músculo cardíaco.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se usa un compuesto que reduce el nivel de ácidos grasos libres

circulantes en el plasma de un sujeto para el tratamiento o la prevención de la fatiga o disfunción muscular (particularmente cardíaca o músculo esquelética), comprendiendo el compuesto un éster de cuerpos cetónicos.

El compuesto se puede usar en pacientes que padecen en particular cualquiera de las siguientes afecciones: diabetes, insuficiencia cardíaca, hipopirexia, hipertiroidismo síndrome metabólico X, fiebre e infección.

- 5 El compuesto se puede administrar en cualquier forma adecuada y por cualquier vía de administración adecuada. En una realización, el compuesto se puede administrar en un complemento para alimentos o bebidas.

En una realización preferente, el éster de cuerpos cetónicos induce una cetosis leve.

- 10 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, una composición líquida para rehidratación durante o después del ejercicio comprende agua, un carbohidrato de tipo azúcar y un compuesto que reduce los ácidos grasos libres circulantes en el plasma sanguíneo que es un éster de cuerpos cetónicos.

Descripción de las figuras

La presente invención se describe con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 15 La Figura 1 muestra un espectro normal de RM ³¹P cardíaco procedente de un control normal (espectro superior) y de un paciente con diabetes tipo 2 (espectro inferior), que muestra la menor relación PCr/ATP en el paciente; 2,3-DGP, (2,3-difosfoglicerato), PDE (fosfodiésteres), PCr (fosfocreatina) α , β y γ indican los tres grupos fosfatos del ATP;

La Figura 2 es un gráfico que muestra los niveles de fosfatos de alta energía, expresados como la relación de la PCr con respecto al ATP (PCr/ATP); se muestran las líneas de tendencia para guiar al observador;

- 20 La Figura 3 es un gráfico que muestra la tolerancia al ejercicio músculo esquelético, expresada como el tiempo de ejercicio, en pacientes con diabetes tipo 2 (n = 21) y en participantes control (n = 15); el número de participantes que hacen ejercicio se representa para cada minuto de ejercicio, mostrando que los pacientes fueron incapaces de hacer ejercicio durante el mismo tiempo que los controles;

25 La Figura 4 es un gráfico que muestra los espectros normales de RM ³¹P del músculo de la pantorrilla procedentes de un participante control y de un paciente con diabetes tipo 2 en reposo (cuadro superior, número de barridos = 64), del mismo paciente al final del ejercicio y el mismo participante control equivalente en un tiempo equivalente (5,1 min) de ejercicio (cuadro inferior, número de barridos = 16); Pi (fosfato inorgánico), PDE (fosfodiésteres), PCr (fosfocreatina), α , β y γ indican los tres grupos fosfatos del ATP; el pH citosólico se calculó a partir del desplazamiento químico del Pi con respecto a la PCr; la abscisa muestra el desplazamiento químico en partes por millón (ppm); y

- 30 La Figura 5 muestra los tiempos de ejercicio relacionados con los niveles de HbA1c y con las velocidades de desoxigenación músculo esquelética durante el ejercicio en pacientes con diabetes tipo 2 (n = 14) y en participantes control (n = 12); se muestran las líneas de tendencia para guiar al observador.

Descripción de la invención

- 35 El término "PCr" usado en el presente documento se refiere a la fosfocreatina; el término "PDE" se refiere a fosfodiésteres; y el término "ATP" se refiere al adenosín trifosfato, como apreciará el experto en la materia.

40 La presente invención muestra que el metabolismo de los fosfatos de alta energía está alterado significativamente en el músculo esquelético y cardíaco en pacientes con diabetes tipo 2 que tienen una función y una morfología cardíaca aparentemente normales. Las relaciones PCr/ATP se correlacionan de forma negativa con los ácidos grasos libres circulantes en todos los participantes del ensayo y de forma positiva con la glucosa en plasma en pacientes con diabetes. Asimismo, se encontró una pérdida más rápida de la PCr músculo esquelética junto con una disminución del pH y una desoxigenación durante el ejercicio en pacientes con diabetes y una recuperación más lenta de la PCr tras el ejercicio; los tiempos medios de recuperación de la PCr se correlacionan con los tiempos de reoxigenación para todos los participantes.

Metabolismo cardíaco

- 45 La hiperinsulinemia, la hiperglucemia y un aumento de anomalías de los lípidos y las lipoproteínas asociados a la diabetes tipo 2 pueden influir de forma negativa en el rendimiento miocárdico,⁴ si bien en las etapas tempranas de la diabetes mellitus, la función sistólica se mantiene con frecuencia a pesar de los cambios en el metabolismo del sustrato cardíaco.^{5,6} Se desconoce si los cambios en el sustrato en la diabetes mellitus^{2,4-7} modifican el metabolismo miocárdico de los fosfatos de alta energía. La ERM ³¹P es la única herramienta no invasiva para la medición del metabolismo de los fosfatos de alta energía en el corazón humano, si bien se limita a la medición de la relación PCr/ATP en estudios rutinarios en pacientes. A pesar de la información limitada que se puede obtener del corazón humano, en comparación con la ERM ³¹P de corazón aislado⁶ y del músculo esquelético,¹⁵ un estudio de ERM ³¹P de pacientes con cardiomiopatía dilatada ha mostrado que una baja relación PCr/ATP cardíaca es un fuerte factor predictivo de la mortalidad total y cardiovascular, superior a la medición de la fracción de eyección.¹⁸ Los estudios de la presente invención revelaron que la relación PCr/ATP miocárdica era un 35 % inferior en pacientes con diabetes
- 50
- 55 tipo 2, los cuales tenían una función cardíaca normal, que en los controles sanos. La relación PCr/ATP se

correlacionaba de forma negativa con las concentraciones en plasma de ácidos grasos libres en todos los participantes ya que las concentraciones de ácidos grasos libres no estaban bajo un estricto control metabólico (Figura 2). Un aumento de la disponibilidad de ácidos grasos da como resultado un aumento de la captación y oxidación de ácidos grasos libres en las mitocondrias,^{2,7} y un aumento de la expresión de proteínas desacoplantes (UCP) mitocondriales,¹⁹ disminuyendo ambos la cantidad de ATP producido por molécula de oxígeno consumida en la cadena de transporte electrónico mitocondrial^{2,19} Por tanto, el corazón diabético presenta un aumento del requerimiento de oxígeno.⁸

La hiperglucemia que aparece en la diabetes se sabe que compensa la capacidad para el transporte de la glucosa miocárdica dañada.⁷ La captación de glucosa es importante para la producción de ATP glucolítico durante la isquemia, ya que una baja captación de glucosa aumenta la lesión isquémica en el corazón.⁶ Los pacientes con diabetes tipo 2 tienen menores velocidades de captación de la fluorodesoxiglucosa,¹⁰ menores flujos sanguíneos miocárdicos en reposo⁹ y una mayor incidencia de isquemia silente.¹ En el estudio que se detalla más adelante, las menores relaciones PCr/ATP en los pacientes que tenían menores concentraciones de glucosa en plasma sugerían que una reducción de la disponibilidad de glucosa podría tener una captación de glucosa limitada. Si bien los niveles de lactato en plasma era un 40 % superiores en los pacientes diabéticos, y el lactato es un sustrato metabólico para el corazón, la falta de una correlación entre los niveles de lactato y la relación PCr/ATP era debida posiblemente a que la oxidación del lactato es inhibida en mayor grado que la oxidación de la glucosa en el corazón diabético.²⁰

Metabolismo músculo esquelético

Aunque el metabolismo cardíaco de los fosfatos de alta energía era anómalo en los pacientes con diabetes, los resultados del estudio descubrieron que el pH, la oxigenación y la energía músculo esquelética era normales en reposo. Todos los participantes se fatigaron tras la misma desoxigenación de los tejidos y con la misma pérdida de PCr, aumento del ADP libre y al mismo pH ácido. Esto sugiere que la disponibilidad o el metabolismo del sustrato y los niveles de glucógeno no estaban limitando los cambios de la energía músculo esquelética. Adicionalmente, se encontró una pérdida más rápida de PCr y una disminución del pH durante el ejercicio con una recuperación de la PCr más lenta tras el ejercicio en los pacientes con diabetes. Los tiempos medios de recuperación de la PCr se correlacionaban con la glucosa y la HbA_{1c} en plasma, pero no con las concentraciones de lactato o ácidos grasos. Sin embargo, la desoxigenación era más rápida durante el ejercicio en los pacientes con diabetes y la reoxigenación era más lenta tras el ejercicio y se correlacionaba con los tiempos medios de recuperación de la PCr, sugiriendo que la disponibilidad de oxígeno en los tejidos estaba limitando la producción de ATP. Se han asociado niveles elevados de HbA_{1c} a complicaciones microvasculares,^{3,21,22} y a una disminución de la capacidad de hacer ejercicio.¹² En el estudio indicado más adelante, los tiempos de ejercicio y los tiempos de reoxigenación se correlacionan con los niveles de HbA_{1c}, indicando que una oxigenación músculo esquelética anómala en los pacientes con diabetes podría estar relacionada con la enfermedad microvascular. En pacientes diabéticos con claudicación intermitente, la reoxigenación músculo esquelética era ~ 4 veces más prolongada que en participantes normales y proporcionaba una medición más sensible de una claudicación de la parte inferior de la pierna que las mediciones de la presión en el tobillo.²³ Consecuentemente, la enfermedad microvascular puede explicar la mayoría, si no todas, de las anomalías en el metabolismo músculo esquelético de los fosfatos de alta energía que se observaron en pacientes con diabetes.

La que sigue es una lista no exhaustiva de las afecciones que están asociadas a altos niveles de ácidos grasos libres. Los pacientes con los trastornos siguientes se podrían beneficiar del tratamiento con compuestos que reducen los niveles de ácidos grasos libres: Enfermedades neurodegenerativas que incluyen, si bien no se limitan a las mismas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington; estados hipóxicos que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, angina de pecho, esfuerzo físico extremo, claudicación intermitente, hipoxia, apoplejía, infarto de miocardio; estados de resistencia a la insulina que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, infección, estrés, obesidad, diabetes, insuficiencia cardíaca; y estados inflamatorios que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, infección, enfermedad autoinmune.

Estudios adicionales han demostrado una correlación positiva entre los ácidos grasos libres (AGL) circulantes y los niveles de proteínas desacoplantes mitocondriales UCP-2 ($r^2 = 0,42$; $P < 0,001$) y UCP-3 ($r^2 = 0,22$; $P < 0,05$) pero no se encontró correlación con ningún otro metabolito plasmático. Esto sugiere que un aumento de los AGL circulantes en humanos aumenta la expresión de las UCP y por tanto, disminuye la eficacia cardíaca. Una reducción de los AGL circulantes en pacientes, por tanto, puede proporcionar un nuevo tratamiento para la insuficiencia cardíaca que aumente la eficacia del trabajo cardíaco hidráulico.

La que sigue es una lista no exhaustiva de las afecciones que están asociadas a la disfunción mitocondrial. Los pacientes con los trastornos siguientes se podrían beneficiar también del tratamiento con compuestos que reducen los niveles de ácidos grasos libres en la sangre:

- Hipertensión esencial
- Cardiomiopatía
- Distrofia muscular congénita
- Inmune (hipertiroidismo)
- Intolerancia a la fatiga y al ejercicio

- 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
- Hipertensión
 - Enfermedad renal
 - Longevidad (envejecimiento)
 - MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios similares a la apoplejía)
 - Sordera
 - Lipomatosis simétrica múltiple
 - Mialgias
 - Mioglobinuria
 - Síndromes miopáticos
 - Neoplasias (cáncer)
 - Atrofia ótica
 - Rabdomiolisis:ADNmt
 - Muerte súbita del lactante (MSL)
 - Enfermedad de Wilson
- El experto en la materia reconocerá que hay muchos compuestos que son conocidos por reducir los niveles de ácidos grasos en el plasma sanguíneo. Por ejemplo, los compuestos divulgados en las publicaciones de patente internacional (PCT) WO-A00/64876, WO-A-01/74834 y WO-A-02/028857 se pueden usar en combinación con el éster de cuerpos cetónicos de la presente invención. Compuestos adecuados dan como resultado una reducción de los niveles de ácidos grasos libres de al menos un 5 %, más preferentemente de al menos un 20 %, y siendo lo más preferente de al menos un 30 %.
- El medicamento se puede preparar en cualquier formulación convencional para administración por vía oral, mucosa, pulmonar, intravenosa u otra forma de administración. Las cantidades adecuadas serán evidentes para el experto en la materia, dependiendo de la gravedad de la afección que se va a tratar, de la edad y el peso del paciente, tal y como apreciará el experto en la materia.
- En un aspecto de la invención, se proporciona una composición para la rehidratación durante o después del ejercicio, comprendiendo la composición agua, un carbohidrato de tipo azúcar y un compuesto que es un éster de cuerpos cetónicos, que reduce los niveles de ácidos grasos libres en el plasma de un paciente. La composición puede comprender también aromatizantes, colorantes y conservantes adecuados, tal y como apreciará el experto en la materia. El carbohidrato de tipo azúcar está presente como fuente de energía, y los azúcares adecuados son conocidos, incluyendo la glucosa y la trehalosa.
- El éster de cuerpos cetónicos se puede usar en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la fatiga o disfunción muscular, particularmente del músculo esquelético o cardíaco. El procedimiento se lleva a cabo mediante la administración de un éster de cuerpos cetónicos a un sujeto.
- El compuesto se administrará normalmente en una cantidad para conseguir una concentración circulante de 10 nm a 2 um, preferentemente de 100 nm a 500 nm.
- La medición de los ácidos grasos libres se puede conseguir mediante procedimientos conocidos en la técnica, y que se divulgan en el presente documento.
- El siguiente ejemplo ilustra la invención con referencia a las figuras adjuntas.

Ejemplo

40 Participantes y protocolo

45 Se incluyeron en este estudio pacientes con diabetes tipo 2 (n = 21) con edades entre los 18 y los 75 años, sin evidencia de enfermedad cardiovascular ni evidencia de isquemia detectable mediante ECG. Solo a cinco pacientes se les controló la dieta, 6 pacientes fueron tratados cada uno bien con un fármaco de sulfonilurea o bien con metformina, y 4 pacientes fueron tratados con metformina y una sulfonilurea. Se excluyeron los pacientes con terapia de insulina. Los pacientes se emparejaron por edad, sexo e índice de masa corporal con participantes control sanas (n = 15).

50 Todos los procedimientos se efectuaron el mismo día, a la misma hora del día, para cada participante. Los participantes ayunaron por la noche durante 12 h antes de la extracción de las muestras de sangre y las ecocardiografías. Tras un pequeño desayuno, se efectuaron protocolos de espectroscopía de resonancia magnética (ERM) músculo esquelética (ejercicio) y cardíaca (reposo), y los participantes almorzaron después. Para las mediciones de espectrofotometría de infrarrojo cercano (NIRS) de la oxigenación muscular, se repitió el protocolo de ejercicio ERM fuera del imán ya que la sonda de NIRS era magnética. Los episodios de ejercicio ERM y NIRS se separaron mediante 2 horas de reposo ambulatorio y 30 minutos de reposo en posición supina, para asegurar que todas las variables eran estables.

55

Análisis de sangre y ecocardiografías

Se extrajo sangre en ayunas para determinar los niveles de glucosa y de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), los perfiles lipídicos y los niveles de ácidos grasos libres (ensayo enzimático Wako NEFA C, Wako Chemicals, Neuss, Alemania). Puesto que el escáner de resonancia magnética (RM) de los inventores era capaz de efectuar la espectroscopía RM, pero no un análisis preciso de la función ventricular izquierda, los inventores evaluaron la función cardíaca usando un ecocardiógrafo SONOS 5500 (Hewlett Packard, Bracknell, GB). Las dimensiones del ventrículo izquierdo y el índice de masa se obtuvieron usando una ecocardiografía en modo M, y se calculó la fracción de eyección a partir de los volúmenes del ventrículo izquierdo, derivados usando la regla de Simpson modificada. La función diastólica (velocidad de flujo precoz (E) y contracción auricular tardía (A); E:A); se evaluó mediante la adquisición de un trazo de registro Doppler pulsado a través de la válvula mitral, con el volumen de la muestra posicionado justo encima de las puntas de las valvas de la válvula mitral.

Medición del metabolismo muscular cardíaco

Se midió el metabolismo cardíaco de los fosfatos de alta energía usando ERM ³¹P sobre un imán de cuerpo entero de 2 teslas (Oxford Magnet Technology, Eynsham, GB) que estaba interconectado con un espectrómetro Bruker Avance (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania). La ERM ³¹P cardíaca se realizó con el participante en posición prono, tal y como se ha descrito previamente.¹⁴ Brevemente, los participantes se colocaron con el corazón en el isocentro del imán, lo que se confirmó usando imágenes de protón (¹H) espín-eco multicorte convencionales adquiridas con una bobina de superficie rectangular doble colocada alrededor del pecho (tiempo de relajación TR = velocidad cardíaca, tiempo del eco TE = 25 ms, grosor del corte = 10 mm, espaciado de 15 mm). Una vez verificada la posición, la bobina se sustituyó por una bobina de superficie de protón circular (diámetro 15 cm), y el ajuste de homogeneidad se efectuó para optimizar la homogeneidad del campo magnético sobre el corazón. Finalmente, se usó una bobina de superficie de ³¹P (diámetro 8 cm) para adquirir espectros cardíacos usando una secuencia de imágenes de desplazamiento químico unidimensional (1 D-CSI) de corte selectivo, que incluyen la presaturación espacial del músculo lateral (Figura 1). Se excitó entonces un corte transversal de 8 cm de espesor, seguido de la codificación de la fase unidimensional en el pecho para subdividir las señales en 64 capas coronarias, cada una de 1 cm de espesor (TR = velocidad cardíaca, 16 promedios). Todas las adquisiciones de los espectros de ¹H y ³¹P estaban sincronizadas con el ritmo cardíaco y la saturación corregida.¹⁴ A los espectros se les aplicó la transformada de Fourier, y se aplicó una ampliación de la línea de 15 Hz. Los espectros se ajustaron usando un programa de ajuste en el dominio de la frecuencia interactiva diseñado para tal fin. Tras el ajuste, se corrigió el área del pico del ATP por la contaminación sanguínea de acuerdo con la amplitud del pico del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), y las relaciones fosfocreatina (PCr)/ATP y fosfodiéster (PDE)/ATP se calcularon y se corrigieron por la saturación tal y como se ha descrito anteriormente.¹⁴ Las diferencias de desplazamiento químico entre los picos de los α- y β-fosfatos del ATP se usaron como una medición de las concentraciones de magnesio libre intracelular.

Mediciones del metabolismo músculo esquelético

Se efectuó una ERM ³¹P del músculo gastrocnemio derecho usando un imán de 2 teslas (véase más arriba) con el participante en posición supina y una bobina de superficie con un diámetro de 6 cm bajo el músculo, tal y como se ha descrito previamente.¹⁵ Los espectros se adquirieron usando un retardo entre pulsos de 2 s en reposo (64 barridos/espectro) y durante el ejercicio y recuperación (16 barridos/espectro).¹⁵ El músculo se ejercitó mediante flexión plantar frente a un peso normalizado (10 % de la masa corporal magra) a 0,5 Hz a través de una distancia de 7 cm, con un posterior aumento adicional del peso (2 % de la masa corporal magra por minuto), y los participantes se ejercitaron hasta que se fatigaron. Las concentraciones relativas de fosfato inorgánico, PCr y ATP se obtuvieron usando una rutina de ajuste en el dominio del tiempo (VARPRO, R. de Beer, Delft, Holanda) y se corrigieron por la saturación parcial. Las concentraciones absolutas se obtuvieron asumiendo que la concentración del ATP citosólico era de 8,2 mmol.l⁻¹ de agua intracelular y el pH intracelular se calculó a partir del desplazamiento químico del pico del Pi con respecto al de la PCr (δPi, medido en partes por millón, ppm), usando la ecuación:

$$\text{pH} = 6,75 + \log \frac{\delta\text{Pi} - 3,27}{5,69 - \delta\text{Pi}}$$

Las diferencias de desplazamiento químico entre los picos de los α- y β-fosfatos del ATP se usaron como una medición de las concentraciones de magnesio libre intracelular. Se calculó [ADP] citosólico libre a partir del pH y de [PCr] usando una constante de equilibrio de la creatina cinasa¹⁶ (K_{ck}) de 1,66 x 10⁹.M⁻¹ y asumiendo un contenido de creatina total normal de 42,5 mmol.l⁻¹, usando la ecuación:

$$[\text{ADP}] = \frac{[\text{ATP}][\text{creatina total}]}{[\text{PCr}][\text{H}^+]\text{K}_{\text{ck}}}$$

Al final del ejercicio, puesto que la glucogenolisis se había detenido y la resíntesis de la PCr era puramente oxidativa, el análisis de la recuperación de la PCr proporcionó información sobre la función mitocondrial. Los tiempos medios de recuperación de la PCr y del ADP, y las velocidades iniciales de recuperación de la PCr, se calcularon tal y como se ha descrito previamente.¹⁵

5 **Mediciones de la oxigenación músculo esquelética**

La saturación muscular de oxígeno (SmO₂) se midió usando NIRS de longitud de onda dual (INVOS 4100 Oximeter, Somanetics, Troy, EE.UU.), con el emisor de luz y dos sensores situados sobre la cabeza medial del músculo gastrocnemio derecho.¹⁷ La SmO₂ se determinó usando la relación de absorbancia a las longitudes de onda de 733 nm y 809 nm, que estimó la hemoglobina desoxigenada y la suma de la hemoglobina desoxigenada y la hemoglobina oxigenada, respectivamente. La SmO₂ se midió en el tejido profundo, predominantemente a una profundidad de 2 cm, dependiendo esto de la diferenciación entre absorciones a las distancias entre los optrodos de 3 y 4 cm. Según se determinó mediante tal resolución espacial, la SmO₂ era pequeña, si es que había, influida por el flujo sanguíneo cutáneo y subcutáneo.¹⁷ En el músculo, ~ 75 % de la sangre está en vénulas o venas, y el espectrofotómetro INVOS 4100 se había calibrado frente a una saturación tisular de oxígeno en sangre arterial (25 % de la señal) y de la vena yugular interna (75 % de la señal). Con el NIRS de longitud de onda dual del músculo esquelético espacialmente resuelto, la saturación del 100 % se refiere a la oxigenación total de la hemoglobina y la mioglobina, ya que la mioglobina atenúa la luz del infrarrojo cercano con un espectro de absorción comparable al de la hemoglobina. Las mediciones de NIRS se efectuaron en 12 participantes control y en 14 pacientes con diabetes tipo 2.

20 **Análisis estadístico**

El análisis de los datos comparando los pacientes con diabetes tipo 2 y los participantes control se efectuó usando el ensayo t de Student y se determinaron las correlaciones entre los grupos de datos usando el coeficiente de correlación de Pearson. Los datos se presentan como la media ± error típico de la media (ETM). Se consideró la significancia estadística a p < 0,05.

25 **Resultados**

Características de los pacientes y resultados de las ecocardiografías

No hubo diferencias significativas en cuanto al sexo, edad o índice de masa corporal entre los pacientes con diabetes tipo 2 y los participantes control (Tabla 1).

30 Tabla 1. *Características de los pacientes y parámetros de las ecocardiografías, y concentraciones de metabolito en sangre en ayunas, en participantes control (n = 15) y pacientes con diabetes tipo 2 (n = 21).*

	Participantes control	Pacientes diabéticos
Número de varones (% de n)	11 (73 %)	15 (71 %)
Edad (años)	52 ± 3	57 ± 2
Índice de masa corporal (IMC, kg.m ⁻²)	25,2 ± 0,4	28,6 ± 0,5
Duración de la diabetes (años)	-	3,3 ± 0,6
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	126 ± 5	133 ± 3
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	76 ± 2	74 ± 2
Velocidad cardíaca media (latidos. min ⁻¹)	70 ± 5	68 ± 2
LVESD (cm)	2,8 ± 0,2	3,0 ± 0,2
LVEDD (cm)	4,3 ± 0,2	4,9 ± 0,2
IVSD (cm)	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1
LVMI (g.m ⁻²)	141 ± 19	141 ± 10
E/A	1,29 ± 0,05	0,98 ± 0,12
FE	0,60 ± 0,02	0,61 ± 0,06
HbA _{1c} (%)	5,7 ± 0,1	8,3 ± 0,4***
Glucosa (mmol.l ⁻¹)	5,1 ± 0,1	9,5 ± 0,6***
Ácidos grasos libres (mmol.l ⁻¹)	0,40 ± 0,05	0,55 ± 0,04*
Lactato (mmol.l ⁻¹)	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1*
Colesterol (mmol.l ⁻¹)	4,9 ± 0,2	4,7 ± 0,3
Triglicéridos (mmol.l ⁻¹)	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Colesterol HDL (mmol.l ⁻¹)	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1

Datos expresados como media ± ETM. LVESD, diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole; LVEDD, diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole; IVSD, diámetro del septum interventricular; LVMI, índice de

masa del ventrículo izquierdo; E/A relación de la velocidad de flujo precoz con respecto a la contracción auricular tardía; FE, fracción de eyección. HbA_{1c}, hemoglobina glucosilada; HDL, lipoproteínas de alta densidad. *, p < 0,05; ***, p < 0,001 vs control. La duración media de la diabetes tipo 2 era de 3,3 ± 0,6 años desde el momento del diagnóstico. Las presiones sanguíneas sistólica y diastólica y las velocidades cardíacas eran similares en los dos grupos. La ecocardiografía mostró una función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo normal en pacientes sin anomalías en el espesor o el diámetro de la cámara del ventrículo izquierdo, o en cualquier otro parámetro (Tabla 1). Los pacientes con diabetes no tenían historial de enfermedad cardiovascular ni signos clínicos de alteración del flujo sanguíneo músculo esquelético o cardíaco.

Parámetros sanguíneos

Los niveles de HbA_{1c} y glucosa en sangre en ayunas eran 1,5 veces y 1,9 veces mayores, respectivamente, en pacientes con diabetes tipo 2 que en los controles (Tabla 1). Los niveles en plasma de ácidos grasos libres eran 1,4 veces mayores en pacientes diabéticos, al igual que los niveles de lactato. El colesterol total, los triglicéridos y el colesterol HDL eran normales en los pacientes con diabetes.

Metabolismo cardíaco de los fosfatos de alta energía

La Figura 1 muestra ejemplos normales de espectros de RM ³¹P cardíacos de un participante normal (PCr/ATP = 2,35) y de un paciente con diabetes tipo 2 (PCr/ATP = 1,35). La relación PCr/ATP cardíaca media era de 2,30 ± 0,12 en los participantes control, pero era un 35 % menor, de hasta 1,50 ± 0,11 (p < 0,001), en pacientes con diabetes. Las relaciones PCr/ATP se correlacionaban de forma negativa con las concentraciones en plasma de ácidos grasos libres en todos los participantes (r² = 0,32; p < 0,01; Figura 2), y de forma positiva con las concentraciones de glucosa en plasma en ayunas en pacientes diabéticos (r² = 0,55; p < 0,05; Figura 2), pero no había correlaciones con los niveles de lactato o HbA_{1c} en plasma. Las relaciones PDE/ATP eran las mismas en los controles (0,51 ± 0,06) y los pacientes diabéticos (0,51 ± 0,12), al igual que las diferencias de desplazamiento químico entre los picos de los α- y β-fosfatos del ATP, siendo de 8,3 ± 0,4 y 8,5 ± 0,1 ppm para los controles y para los pacientes diabéticos, respectivamente.

Metabolismo músculo esquelético de los fosfatos de alta energía

Los inventores descubrieron que los tiempos de ejercicio promedio para los pacientes con diabetes eran un 32 % más cortos, de 7 min, en comparación con los participantes control de 11 min (Tabla 2 y Figura 3).

Tabla 2. *Metabolitos de la energía músculo esquelética, pH y oxigenación en reposo, durante el ejercicio y al final del ejercicio en participantes control y en pacientes con diabetes tipo 2.*

	Participantes control		Pacientes diabéticos	
	Reposo	Final del ejercicio	Reposo	Final del ejercicio
PCr (mmol.l ⁻¹)	34 ± 1	17 ± 2	35 ± 1	18 ± 2
Pi (mmol.l ⁻¹)	4,6 ± 0,2	-	4,7 ± 0,1	-
pH	7,04 ± 0,01	6,90 ± 0,04	7,04 ± 0,01	6,84 ± 0,05
ADP (μmol.l ⁻¹)	15 ± 2	60 ± 6	11 ± 1	57 ± 8
δ(α-β) ATP (ppm)	8,29 ± 0,01	8,31 ± 0,07	8,28 ± 0,01	8,40 ± 0,07
Saturación de oxígeno (%)	68 ± 3	57 ± 3	71 ± 2	60 ± 3
	Participantes control		Pacientes diabéticos	
			Ejercicio	
Tiempos de ejercicio (min)		10,5 ± 0,6		7,1 ± 0,6***
Hidrolisis de PCr (mmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)		1,6 ± 0,1		3,2 ± 0,6*
Disminución del pH (unidades de pH.min ⁻¹)		0,013 ± 0,003		0,036 ± 0,009*
Producción de ADP libre (mmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)		4,2 ± 0,5		9,5 ± 3,4
Desoxigenación tisular (%.min ⁻¹)		0,8 ± 0,3		2,5 ± 0,4**
			Recuperación	
Formación inicial de PCr (mmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)		20 ± 2		15 ± 2*
Tiempo medio de recuperación de la PCr		32 ± 3		52 ± 7*
Tiempo medio de recuperación del ADP		18 ± 6		19 ± 2
Tiempo de reoxigenación (s)		56 ± 10		140 ± 18***

Datos expresados como media \pm ETM. ADP, adenosín difosfato; PCr, fosfocreatina; Pi, fósforo inorgánico; $\delta(\alpha\text{-}\beta)$ ATP, diferencias de desplazamiento químico entre los picos de los α - y β -fosfatos del ATP. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ vs control.

5 La Figura 4 muestra ejemplos de espectros músculo esqueléticos antes y al final del protocolo de ejercicio normalizado en un paciente con diabetes tipo 2 y en el tiempo equivalente (5,1 min) de ejercicio en un participante control. En condiciones de reposo, el pH y las concentraciones de PCr (PCr/ATP), ADP libre y fosfato inorgánico músculo esqueléticos eran los mismos en los controles y en los pacientes con diabetes tipo 2 (Tabla 2). Durante el ejercicio, la hidrólisis de la PCr era 2 veces más rápida y la disminución del pH era 3 veces más rápida en los pacientes con diabetes en comparación con los participantes control, pero las velocidades de producción del ADP libre no eran significativamente diferentes (Tabla 2). En todos los participantes, la fatiga aparecía cuando la disminución de la PCr era $\sim 50\%$ ($50 \pm 4\%$ en los controles frente a $51 \pm 4\%$ en los diabéticos) y al mismo pH y concentraciones de ADP libre (Tabla 2). Las concentraciones de magnesio libre permanecieron inalteradas durante el ejercicio en todos los participantes (Tabla 2). Tras el ejercicio, la velocidad inicial de recuperación de la PCr era un 25% menor y los tiempos medios de recuperación de la PCr eran 1,6 veces más largos en los pacientes con diabetes tipo 2 que en los controles, pero los tiempos medios de recuperación del ADP libre eran los mismos (Tabla 2).

Los tiempos de ejercicio se correlacionaban de forma negativa con los niveles de HbA_{1c} ($r^2 = 0,32$; $p < 0,01$; Figura 5) y los niveles de glucosa en plasma ($r^2 = 0,23$; $p < 0,01$; correlación no mostrada), pero no había correlaciones con los niveles de ácidos grasos libres o de lactato en plasma. Las velocidades de la hidrólisis de la PCr y la disminución del pH durante el ejercicio no se correlacionaban con ninguna de las concentraciones de los metabolitos en ayunas. Sin embargo, los tiempos medios de recuperación de la PCr se correlacionaban de forma positiva con los niveles de HbA_{1c} ($r^2 = 0,40$; $p < 0,001$; correlación no mostrada), y las concentraciones de glucosa en plasma ($r^2 = 0,16$; $p < 0,05$; correlación no mostrada) para todos los participantes, si bien no había correlaciones con las concentraciones de ácidos grasos libres o lactato en plasma.

25 Oxigenación músculo esquelética

En reposo, la saturación de oxígeno en el músculo gastrocnemio era estable y era la misma para ambos grupos, del 68% en los controles y del 71% en los diabéticos, y todos los participantes dejaron de hacer ejercicio tras una disminución del 11% de la oxigenación tisular medida usando NIRS (Tabla 2). El primer paciente diabético dejó de hacer ejercicio al cabo de 3 min (Figura 4), por tanto, durante los 3 primeros minutos de ejercicio, la velocidad de desoxigenación era 3,1 veces más rápida en los pacientes con diabetes tipo 2 que en los controles (Tabla 2), y se correlacionaba con el tiempo de ejercicio ($r^2 = 0,29$, $p < 0,01$, Figura 5). Análogamente, los tiempos de reoxigenación durante la recuperación tras el ejercicio eran 2,5 veces más largos en los pacientes con diabetes que en los controles (Tabla 2), que se correlacionaban con los niveles de HbA_{1c} ($r^2 = 0,35$; $p < 0,01$; Figura 5) y con los tiempos medios de recuperación de la PCr ($r^2 = 0,25$; $p < 0,01$; Figura 5) en todos los participantes, pero no con los niveles de ácidos grasos libres o lactato en plasma.

Los resultados anteriores demuestran que el aumento de los ácidos grasos libres, asociado a la diabetes tipo 2, puede contribuir a la disfunción muscular, particularmente a la disfunción muscular cardíaca. Estos descubrimientos también son relevantes para otros trastornos/afecciones asociados a niveles elevados de ácidos grasos libres, y por ello la reducción de los ácidos grasos libres puede ser un objetivo general en la reducción de la probabilidad de la disfunción muscular, por ejemplo, de la insuficiencia cardíaca.

Referencias

1. Schemthaler G. "Cardiovascular mortality and morbidity in type-2 diabetes mellitus". *Diabetes Res Clin Pract.* 1996; 31:S3-S13.
2. Taegtmeier H, McNulty P, Young ME. "Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I. General concepts". *Circulation.* 2002; 105:1727-1733.
3. Iribarren C, Karter AJ, Go AS, y col. "Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes". *Circulation.* 2001; 103:2668-2673.
4. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. "Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy". *Mol CellBiochem.* 1998;180:53-57.
5. Chatham JC, SeymourA-ML. "Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats". *Cardiovasc Res.* 2002; 55:104-112.
6. Sidell RJ, Cole MA, Draper NJ, y col. "Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker fatty rat heart". *Diabetes.* 2002; 51:1110-1117.
7. Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. "Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart". *Cardiovasc Res.* 1997;34:25-33.
8. Tune JD, Yeh C, Setty S, y col. "Coronary blood flow control is impaired at rest and during exercise in conscious diabetic dogs". *Basic Res Cardiol.* 2002; 97:248-257.
9. Meyer C, Schwaiger M. "Myocardial blood flow and glucose metabolism in diabetes mellitus". *Am J Cardiol.* 1997; 80:94A-101A.
10. Iozzo P, Chareonthaitawee P, Rimoldi O, y col. "Mismatch between insulin-mediated glucose uptake and

- blood flow in the heart of patients with Type II diabetes". *Diabetologia* 2002; 45:1404-1409.
11. Baron AD, Laakso M, Brechtel G, y col. "Mechanism of insulin resistance in insulin-dependent diabetes mellitus: A major role for reduced skeletal muscle blood flow". *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73:637-643.
- 5 12. Demir I, Ermis C, Altunbas H, y col. "Serum HbA1c levels and exercise capacity in diabetic patients". *Jpn Heart J.* 2001; 42:607-616.
13. Estacio RO, Regensteiner JG, Wolfel EE, y col. "The association between diabetic complications and exercise capacity in NIDDM patients". *Diabetes Care.* 1998; 21:291-295.
14. Crilley JG, Boehm EA, Rajagopalan B, y col. "Magnetic resonance spectroscopy evidence of abnormal cardiac energetics in Xp21 muscular dystrophy". *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36:1953-1958.
- 10 15. Lodi R, Kemp GJ, Muntoni F, y col. "Reduced cytosolic acidification during exercise suggests defective glycolytic activity in skeletal muscle of patients with Becker muscular dystrophy. An in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study". *Brain.* 1999; 122:121-130.
16. Veech RL, Lawson JWR, Cornell NW, y col. "Cytosolic phosphorylation potential". *J Biol Chem.* 1979; 254:6538-6547.
- 15 17. Madsen PL, Secher NH. "Near-infrared oximetry of the brain". *Prog Neurobiol.* 1999; 58:541-560.
18. Neubauer S, Horn M, Cramer M, y col. "Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy". *Circulation.* 1997; 96:2190-2196.
19. Boehm EA, Jones BE, Radda GK, y col. "Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in the palmitateperfused hyperthyroid rat heart". *Am J Physiol.* 2001; 280: H977-H983.
- 20 20. Chatham JC, Gao ZP, Bonen A, y col. "Preferential inhibition of lactate oxidation relative to glucose oxidation in the rat heart following diabetes". *Cardiovasc Res.* 1999; 43:96-106.
21. Libby P, Plutzky J. "Diabetic macrovascular disease. The glucose paradox?" *Circulation.* 2002; 106:2760-2763.
- 25 22. Mahler RJ, Adler ML. "Type 2 diabetes mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment". *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1165-1171.
23. Komiyama T, Shigematsu H, Yasuhara H, y col. "Near-infrared spectroscopy grades the severity of intermittent claudication in diabetes more accurately than ankle pressure measurement". *Br J Surg.* 2000; 87:459-466.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en el tratamiento terapéutico de la disfunción muscular del cuerpo humano o animal mediante la administración de un compuesto a un sujeto que reduce los ácidos grasos libres circulantes en el plasma sanguíneo del sujeto, comprendiendo el compuesto un éster de cuerpos cetónicos.
- 5 2. Un compuesto para su uso en el tratamiento terapéutico de la disfunción muscular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto padece diabetes.
3. Un compuesto para su uso en el tratamiento terapéutico de la disfunción muscular de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sujeto padece diabetes tipo 2.
- 10 4. Un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de la fatiga o disfunción muscular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto es para el tratamiento o la prevención de la fatiga muscular cardíaca o la fatiga muscular esquelética.
5. Un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de la fatiga o disfunción muscular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto está en forma de un complemento alimentario o una composición líquida.
- 15 6. Uso de un compuesto que reduce los ácidos grasos libres circulantes en el plasma sanguíneo de un sujeto, comprendiendo el compuesto un éster de cuerpos cetónicos en el tratamiento no terapéutico de la fatiga o disfunción muscular.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el compuesto es para el tratamiento no terapéutico de la fatiga muscular cardíaca o la fatiga muscular esquelética.
- 20 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el compuesto está en forma de un complemento alimentario o una composición líquida.
9. Una composición líquida para rehidratación durante o después del ejercicio, que comprende agua, un carbohidrato de tipo azúcar y un compuesto que reduce los ácidos grasos libres circulantes en el plasma sanguíneo, siendo el compuesto un éster de cuerpos cetónicos.
- 25 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el carbohidrato de tipo azúcar es glucosa.

Figura 1

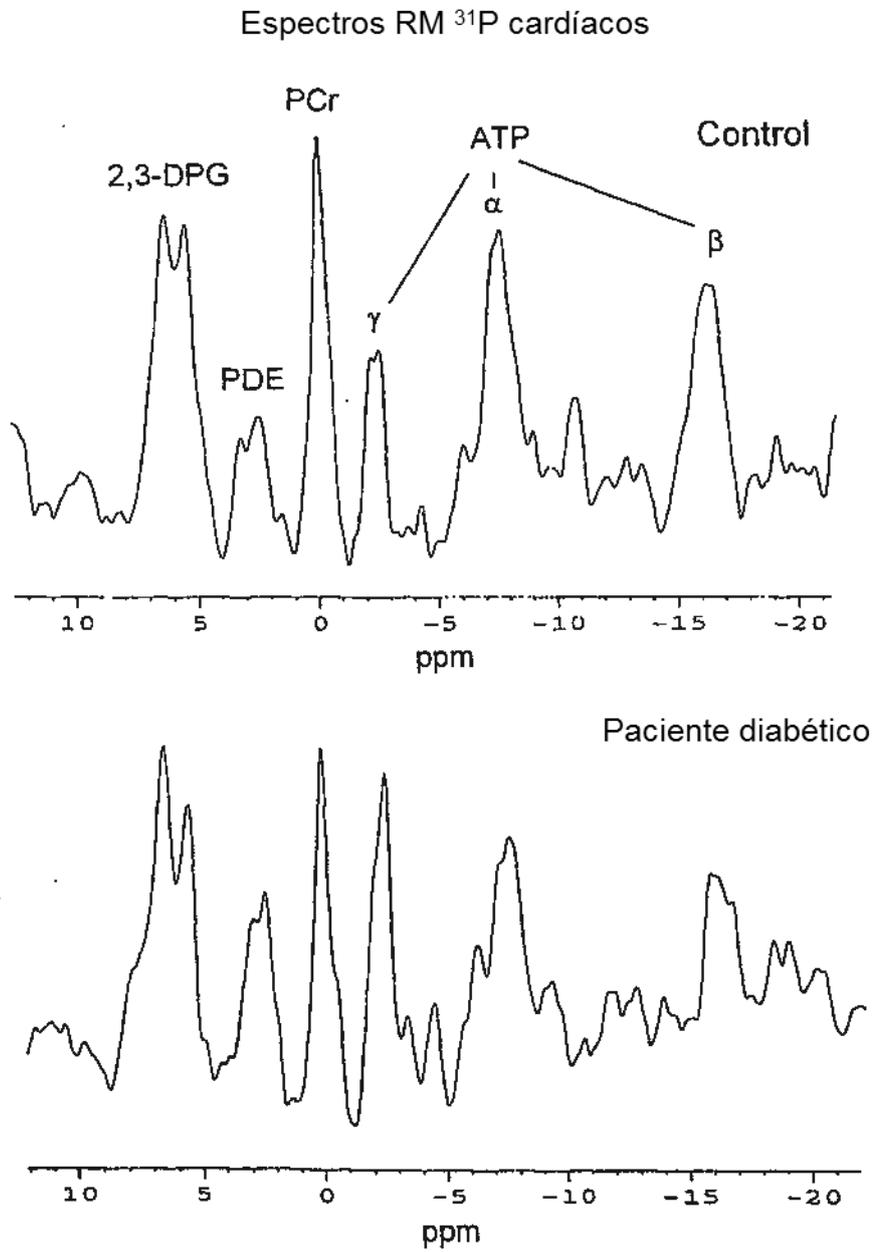


Figura 2

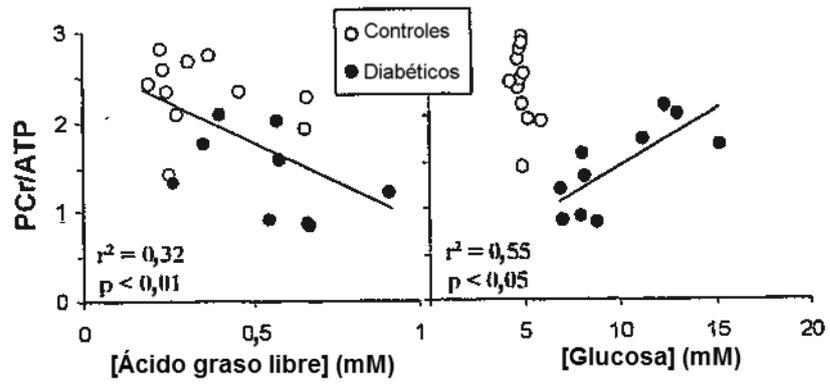


Figura 3

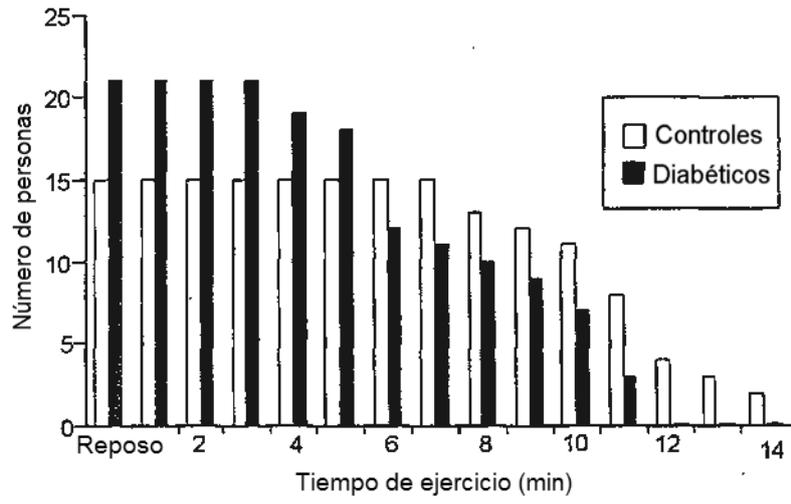


Figura 4

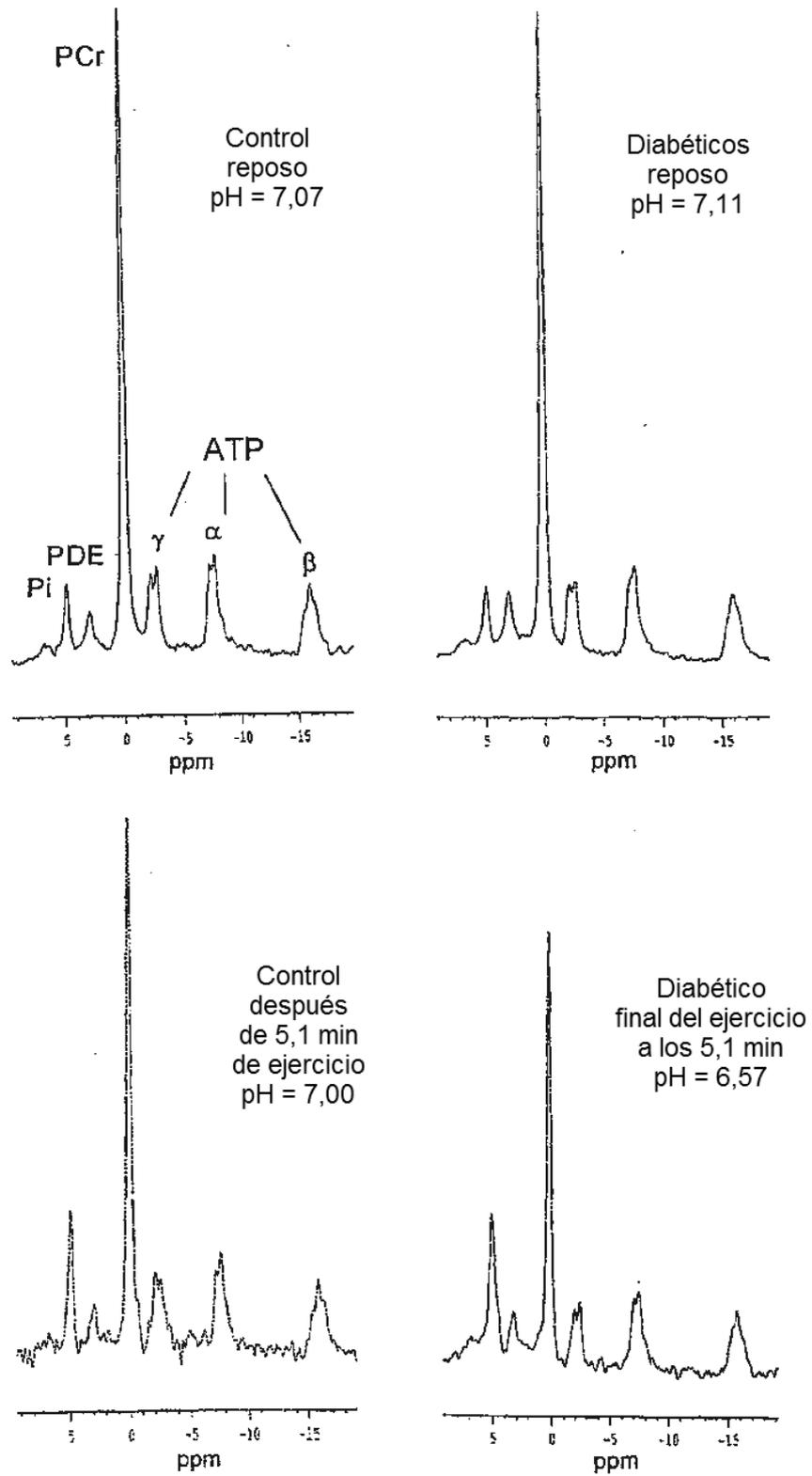


Figura 5

