

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 903**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2015** **E 15187946 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 3006027**

54 Título: **Composiciones que comprenden aminoácidos para su uso en el tratamiento del estado inflamatorio sistémico asociado con el accidente cerebrovascular en pacientes con disfagia**

30 Prioridad:

**08.10.2014 IT TO20140806**

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

**30.01.2018**

73 Titular/es:

**PROFESSIONAL DIETETICS S.P.A. (100.0%)  
Via Ciro Menotti, 1/A  
20129 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**GIORGETTI, PAOLO LUCA MARIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 651 903 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).

## DESCRIPCION

Composiciones que comprenden aminoácidos para su uso en el tratamiento del estado inflamatorio sistémico asociado con el accidente cerebrovascular en pacientes con disfagia

### Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular en pacientes, particularmente pacientes con disfagia.

### Antecedentes

Los accidentes cerebrovasculares son la principal causa de discapacidad en el mundo. Aproximadamente una tercera parte de los supervivientes de accidentes cerebrovasculares quedan permanentemente discapacitados un año después del evento agudo. Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes no se recuperan por completo después de un accidente cerebrovascular, mientras que una tercera parte no puede caminar sin ayuda. Además, en sujetos hemiparéticos, que aún pueden caminar, la eficiencia de la marcha se reduce y el coste de la energía de la marcha aumenta en comparación con la marcha simétrica eficiente. Además de la pérdida de los efectos tróficos centrales y la degeneración transináptica de las neuronas motoras inferiores, los cambios en el músculo esquelético después del accidente cerebrovascular también pueden contribuir a la discapacidad. Estos cambios incluyen desplazamiento del tipo de fibra en el lado parético (= contralateral), aumento de la grasa intramuscular (miosteatosis) que sustituye el tejido muscular, espasticidad, desuso, malnutrición y descarga muscular. Un estudio previo mostró que los músculos esqueléticos de los pacientes con accidente cerebrovascular subagudo están sujetos a un estado inflamatorio sistémico persistente, lo que podría conducir a un hipermetabolismo (es decir, la degradación de las proteínas es mayor que la síntesis de proteínas). Este estado inflamatorio del lado no afectado podría contribuir a la discapacidad del paciente al inducir una pérdida tanto de la masa muscular como de la fuerza, lo que lleva a la discapacidad del paciente. Este problema es particularmente relevante en pacientes disfágicos. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevas composiciones capaces de reducir el problema mencionado anteriormente. El documento WO 2012/142678 A1 describe composiciones que comprenden microorganismos probióticos y aminoácidos para promover la pérdida de peso y/o de grasa en un sujeto lo que contrarresta la inflamación sistémica asociada al sobrepeso. Los documentos WO 2012/133198 A1 y JP 2012 201625 A describen composiciones nutricionales que comprenden aminoácidos adecuados para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, en particular una enfermedad inflamatoria intestinal. La publicación científica Druml et al., Amino acid kinetics in patients with sepsis (2001) Am J Clin Nutr (73):908-13 se refiere a las concentraciones plasmáticas de aminoácidos en pacientes con sepsis. El documento WO 2014/065715 A1 describe composiciones que comprenden aminoácidos para su uso en el tratamiento/prevenición de una afección patológica, por ejemplo accidente cerebrovascular, en un mamífero. El documento US 2003/060421 A1 describe composiciones que comprenden aminoácidos capaces de transportar oxígeno y de suministrarse a un ventrículo cerebral lateral afectado por accidente cerebrovascular. El documento WO 2012/117065 A1 describe composiciones nutricionales que comprenden aminoácidos para mejorar la deglución en pacientes con disfagia. El documento WO 02/02092 A2 describe composiciones de aminoácidos adecuadas para mejorar el rendimiento muscular.

### Compendio de la invención

La presente descripción tiene el objetivo de proporcionar composiciones para su uso en el tratamiento de pacientes con accidente cerebrovascular, particularmente de pacientes con disfagia, que pueden atenuar el estado inflamatorio sistémico persistente mencionado anteriormente y, por lo tanto, atenuar o incluso convertir el hipermetabolismo muscular (HM) en equilibrio de recambio proteico o anabolismo muscular de actividad anabólica. Antes del consumo, las composiciones descritas en la presente memoria se dispersan en un líquido, preferiblemente agua, que adquiere la viscosidad y consistencia ideal para la ingestión por un paciente con disfagia. De acuerdo con la presente descripción, el objeto anterior se logra gracias a la materia mencionada específicamente en las reivindicaciones siguientes, que se entiende que forman parte integrante de esta descripción.

Una realización de la presente descripción proporciona una composición para su uso en el tratamiento del estado inflamatorio sistémico en pacientes con accidente cerebrovascular con disfagia, comprendiendo la composición un agente activo, el agente activo que consiste en los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina, comprendiendo la composición adicionalmente uno o más agentes espesantes en una cantidad entre 10% y 50% en peso, más preferiblemente entre 20% y 30% en peso, con respecto al peso del agente activo .

Los agentes espesantes se pueden seleccionar entre goma de xantano, metilhidroxipropilcelulosa, goma konjak, glucomanano konjak, goma Arábiga (goma de Acacia), almidones modificados.

La presencia de tales agentes en la composición permite espesar el líquido, preferiblemente agua, en donde la composición se dispersa antes del consumo.

En algunas realizaciones, la composición descrita en la presente memoria comprende adicionalmente vitaminas, preferiblemente seleccionadas en el grupo de vitaminas B, tales como vitamina B<sub>1</sub> y/o vitamina B<sub>6</sub>.

En una realización adicional, la composición también incluye hidratos de carbono, aditivos y/o sustancias aromatizantes.

5 El autor de la presente invención descubrió que las composiciones descritas en la presente memoria son capaces de convertir el hipercatabolismo muscular en anabolismo del brazo ipsilateral (no afectado) del brazo de sujetos con accidente cerebrovascular disfágico. De esta forma, puede producirse una mejor recuperación de la autonomía física.

10 Una realización adicional de la presente descripción proporciona una composición para uso en el tratamiento de un estado inflamatorio sistémico en pacientes con accidente cerebrovascular, comprendiendo la composición un agente activo, consistiendo el agente activo en los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina.

Una ventaja relacionada con el uso de las composiciones descritas en la presente memoria reside en la alta tolerabilidad de las composiciones, que pueden administrarse crónicamente. En una realización preferida, la administración puede ocurrir durante un período suficientemente largo para permitir al menos una recuperación parcial del accidente cerebrovascular.

15 Otra ventaja relacionada con el uso de la composición descrita en la presente memoria reside en el hecho de que el uso de aminoácidos en forma libre incluidos en el agente activo permite producir tales composiciones a un coste comparativamente extremadamente bajo con respecto a la síntesis de proteínas y factores de crecimiento, mediante procesos de producción conocidos y ampliamente utilizados en el campo de la preparación de composiciones basadas en aminoácidos libres. Sin embargo, el campo de aplicación de la invención también puede extenderse a  
20 aminoácidos obtenidos mediante ingeniería genética o cualquier otro método artificial.

#### Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas, en donde:

- 25 • La Figura 1 es un diagrama de flujo de un suplemento de prueba con la composición descrita en la presente memoria frente a placebo durante el tratamiento de pacientes con accidente cerebrovascular disfágico. El diagrama incluye el número de pacientes analizados para el resultado principal (hipercatabolismo del músculo del brazo no afectado); y
- La Figura 2 representa los intervalos de tiempo de fenil-, aminoácido esencial total, las diferencias de aminoácidos totales (A - V) y los niveles de aminoácidos arteriales totales de la población de accidente cerebrovascular. El punto 0 indica sin captación/sin liberación.
- 30 • La Figura 3 representa la relación entre los cambios a lo largo del tiempo de linfocitos de sangre periférica como % de glóbulos blancos y capacidad de deglución (DOSS) en toda la población de accidente cerebrovascular (panel a), en sujetos con placebo (panel b) y en tratamiento de aminoácidos esenciales (panel c). El número de puntos que aparecen en los gráficos es menor que el número real de pacientes del estudio debido a la superposición de valores en algunos casos.

#### 35 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En la siguiente descripción, se proporcionan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Las realizaciones pueden ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etc. En otros casos, las estructuras, materiales u operaciones bien conocidas no se muestran o describen en detalle para evitar aspectos que ocultan las realizaciones.  
40

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a "una realización" o "una realización" significa que una característica, estructura o característica particular descrita en conexión con la realización se incluye en al menos una realización. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una realización" o "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones. Los títulos proporcionados en la presente memoria son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones.  
45

La composición para uso en el tratamiento del estado de inflamación sistémica en pacientes con accidente cerebrovascular con disfagia, descrita en la presente memoria comprende un agente activo, consistiendo el agente activo en los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina y al menos uno de los siguientes aminoácidos histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cisteína. La composición comprende adicionalmente uno o más agentes espesantes en una cantidad entre 10% y 50% en peso, más preferiblemente entre 20% y 30% en peso, con respecto al peso del agente activo.  
50

Los agentes espesantes se pueden seleccionar entre goma de xantano, metilhidroxipropilcelulosa, goma konjak, glucomanano konjak, goma Arábiga (goma de Acacia), almidones modificados. La presencia de tales agentes, preferiblemente goma de xantano o metilhidroxipropilcelulosa, permite espesar el líquido, preferiblemente agua, en donde la composición se dispersa antes del consumo.

- 5 Se sabe que las personas con disfagia generalmente carecen del control muscular adecuado y la coordinación para sellar correctamente la tráquea o carecen de la capacidad de propulsar adecuadamente todo el bolo de alimento y/o bebida al estómago. Por lo tanto, es extremadamente importante que los alimentos que consumen los pacientes con disfagia tengan la viscosidad y consistencia adecuadas.

- 10 Una vez que la composición descrita en la presente memoria se dispersa en un líquido, preferiblemente agua, la consistencia del producto resultante tiene la viscosidad ideal para la ingestión por un paciente con disfagia.

En algunas realizaciones, los uno o más agentes espesantes están presentes en una cantidad entre 2% y 30%, preferiblemente entre 4% y 15% en peso del peso seco de la composición.

Después de la preparación, la dispersión se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener la consistencia y la viscosidad deseadas.

- 15 La cantidad de líquido para agregar a la composición descrita en la presente memoria dependerá, por ejemplo, de la consistencia que es necesaria obtener. Este parámetro será evaluado y determinado por un experto en el campo que también tenga en cuenta el grado de disfagia del paciente.

En una o más realizaciones, la composición puede agregarse al líquido, preferiblemente agua. La concentración elegida depende de la consistencia del gel que se debe obtener.

- 20 En algunas realizaciones, la composición descrita en la presente memoria comprende adicionalmente vitaminas, preferiblemente seleccionadas del grupo de vitaminas B, tales como vitamina B<sub>1</sub> y/o vitamina B<sub>6</sub>. En una realización adicional de la presente descripción, la composición también incluye hidratos de carbono, aditivos y/o sustancias aromatizantes.

- 25 Los hidratos de carbono preferidos se pueden seleccionar entre maltodextrinas. El aditivo se puede seleccionar entre citrato de sodio tribásico deshidratado, aspartamo en polvo, acesulfamo de potasio, sucralosa. Una sustancia aromatizante preferida es el sabor de plátano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción, la razón en peso de isoleucina:leucina preferida está comprendida en el intervalo de 0,2-0,7, preferiblemente entre 0,4-0,6 y/o la razón en peso de valina:leucina preferida está comprendida en el intervalo de 0,2 -0,8, preferiblemente en el intervalo de 0,4-0,7.

- 30 En una realización adicional, la razón en peso de treonina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,15-0,50, preferiblemente entre 0,20-0,45 y/o la razón en peso de lisina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,15-0,60, preferiblemente entre 0,30-0,55.

En otra realización, la razón en peso de leucina:isoleucina:valina es equivalente a 2:1:1.

- 35 En una realización adicional, considerando la suma de leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina igual a 1, la cantidad total de los aminoácidos esenciales adicionales puede variar entre 0,02 y 0,25 (es decir, 1:0,02-0,25), preferiblemente de 0,05 a 0,15 (es decir 1:0,05-0,15), todavía se pretende como la razón en peso.

En una realización adicional, la cisteína está presente en una cantidad en peso comprendida entre 150% y 350% de metionina.

- 40 En algunas realizaciones, el agente activo comprende el aminoácido tirosina no esencial en una cantidad comprendida entre 15 y 50%, preferiblemente entre 20 y 35%, de la cantidad en peso de fenilalanina.

El agente activo consiste en los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina combinados con histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina y la composición comprende adicionalmente uno o más agentes espesantes en una cantidad entre 10% y 50% en peso, más preferiblemente entre 20% y 30% en peso, con respecto al peso del agente activo.

- 45 En algunas realizaciones, la composición también puede administrarse al paciente con accidente cerebrovascular sin disfagia para el tratamiento del estado de inflamación sistémica asociado a accidente cerebrovascular. En tales casos, la composición puede comprender el agente activo (leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina y al menos uno de histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina) sin agentes espesantes.

- 50 También se describe que la composición puede administrarse para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio sistémico, comprendiendo la composición un agente activo, comprendiendo el agente activo los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina y al menos uno de los aminoácidos histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina.

Además, en particular, cuando se preparan las composiciones de acuerdo con la presente descripción, y específicamente el agente activo, preferiblemente se evitan los aminoácidos serina, prolina, glicina, alanina, ácido glutámico y, sobre todo, arginina, dado que pueden ser contraproducentes o incluso perjudiciales en algunas concentraciones o proporciones estequiométricas con dicha formulación.

- 5 Los aminoácidos indicados anteriormente pueden reemplazarse por respectivos derivados farmacéuticamente aceptables, concretamente sales.

Preferiblemente, la composición está en forma de un polvo seco y, con el fin de administrarla al paciente, se dispersa en un líquido, preferiblemente agua.

- 10 Las especificaciones adicionales, en términos de cantidades y proporciones entre los diversos aminoácidos proporcionados por las composiciones para su uso en el tratamiento de pacientes con accidente cerebrovascular con disfagia están contenidas en las reivindicaciones adjuntas, que forman una parte integral de la enseñanza técnica proporcionada en la presente memoria en relación con la invención.

- 15 Los resultados proporcionados en la presente memoria muestran que el metabolismo de proteína muscular del brazo no afectado de individuos con accidente cerebrovascular subagudo disfágicos podría caracterizarse por HM que puede corregirse mediante la administración de la composición aquí descrita.

### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

- 20 **Población.** Para el estudio fueron elegibles sesenta y siete pacientes con accidente cerebrovascular subagudo disfágico (<3 meses después del evento cerebrovascular agudo) (Guidelines of the Ministry of Health for rehabilitation activities. National Health Plan 1998-2000) ingresados en el centro de rehabilitación de los autores de la presente invención. Se excluyeron 11 sujetos debido a insuficiencia cardíaca crónica asociada, 1 por síndrome coronario agudo, 4 por insuficiencia renal aguda o crónica (aclaramiento de creatinina <30 mg/100 ml), 1 por cirugía de cáncer, 2 por úlcera por presión y 7 por diabetes (en tratamiento oral con hipoglucemia o insulina), 2 por distiroidismo y finalmente 1 por estar en terapia con esteroides. La razón para excluir estas enfermedades estaba estrictamente relacionada con su fuerte impacto en el metabolismo de las proteínas musculares.

- 25 Los restantes treinta y ocho pacientes (29 hombres + 9 mujeres, 69,7 ± 11,4 años) se inscribieron en este estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. El motivo del ingreso del paciente se debió a la rehabilitación de la disfagia y la hemiplejía. Todos los pacientes estaban postrados en cama y habían ingresado por neurocirugía (34,2%), unidades neurológicas o de accidente cerebrovascular (52,6%) u otros entornos de rehabilitación (13,2%). El accidente cerebrovascular documentado por tomografía computarizada fue isquémico en 57,9% o lesión hemorrágica (42,1%). Los individuos isquémicos y hemorrágicos se agruparon debido a que, en la fase de rehabilitación del accidente cerebrovascular, estos dos grupos tienen perfiles metabólicos, nutricionales y funcionales similares (Aquilani et al., 2014).

- 30 Sobre la base de la tomografía computarizada o la resonancia magnética, las áreas dañadas se clasificaron con respecto a la ubicación de la destrucción isquémica como PACI (infarto parcial de la circulación anterior, 23,7%), TACI (infarto total de la circulación anterior, 50%) o POCI (infarto de la circulación posterior, 26,3%). Estos datos están contenidos en la Tabla 1, que también muestra la gravedad del accidente cerebrovascular y los mecanismos evaluados que subyacen a las anomalías de la deglución.

Tabla 1

Localización del accidente cerebrovascular	
	Pacientes (%)
Accidente cerebrovascular cortical:	
Dominante (izquierda)	Núm. 9 (23,7%)
No dominante (derecha)	Núm. 8 (21%)

<b>Localización del accidente cerebrovascular</b>	
	<b>Pacientes (%)</b>
Accidente cerebrovascular subcortical:	Núm. 7 (18,4%)
Dominante (izquierda)	Núm. 5 (13,2%)
No dominante (derecha)	
Accidente cerebrovascular del tronco encefálico	Núm. 6 (15,8%)
Accidente cerebrovascular cerebeloso	Núm. 3 (7,9%)
<b>Gravedad del accidente cerebrovascular</b>	
Discapacidad FIM (puntuación):	Motora 21 ± 15 * Cognitiva 8 ± 6.5 *
<b>Disfagia</b>	
(evaluación clínica/videofluoroscópica)	
Tránsito oral retrasado	Núm. 18 (47,4%)
Autorización oral incompleta	Núm. 10 (26,3%)
Voz húmeda	Núm. 3 (7,9%)
Ausencia de tos	Núm. 7 (18,4)

Al ingreso, todos los pacientes fueron alimentados mediante gastrostomía endoscópica percutánea (PEG, n = 30) o mediante dieta oral modificada (n = 8).

- 5 **Procedimientos.** En el plazo de dos días desde el ingreso, después de un ayuno nocturno a las 8 a.m., Se tomaron muestras de sangre de cada paciente para determinar lo siguiente:

**1) Aminoácidos en plasma**

10 Estos sustratos se determinaron tanto en sangre arterial (arteria radial) como venosa del brazo no afectado. Las concentraciones de aminoácidos libres en el plasma se midieron utilizando un analizador de aminoácidos AminoQuant II, basado en el sistema HP 1090 HPLC, con derivatización de precolumna totalmente automatizada, utilizando químicas de reacción de orto-ftalaldehído y 9-fluorenil-metil-cloroformiato de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados se obtuvieron inyectando 1 µl de la mezcla derivatizada y midiendo la absorbancia simultáneamente a 338 y 262 nm. Las concentraciones en plasma se expresaron como µmoles/l. Las mediciones de aminoácidos se llevaron a cabo como una comparación en ocho sujetos sanos emparejados por edad (71 ± 4,5 años), distribución por sexo (6 M/2 F), índice de masa corporal (22,3 ± 3,5 kg/m<sup>2</sup>).

**Cálculos**

20 a) Metabolismo de la proteína muscular. Como se describe en otra parte (Aquilani et al., 2012), la degradación en exceso de proteínas musculares se estimó mediante la liberación muscular del aminoácido esencial fenilalanina (fenil-), mientras que la síntesis de proteínas musculares se determinó mediante la captación de fenil- muscular. Dado que el fenilo no se sintetiza ni degrada en el tejido muscular, cualquier cambio en la captación/liberación muscular reflejaría el equilibrio total de proteínas (Liu y Barret, 2002).

Una A-V de fenil- negativa (=liberación) significó un metabolismo de proteínas desequilibrado con un

exceso de degradación de proteínas sobre la síntesis de proteínas, mientras que una A-V de fenil- positiva (=captación) indicó un predominio de la síntesis de proteínas. Una A-V de fenil- de cero (sin captación/sin liberación) indicó un metabolismo equilibrado de proteínas musculares.

- 5 b) Diferencias A-V de los otros aminoácidos, aminoácidos totales (TAA), aminoácidos esenciales totales (EAA: valina, isoleucina, leucina, treonina, fenil-, triptófano, metionina, lisina), aminoácidos de cadena ramificada (BCAA: valina, isoleucina, leucina).

## 2) Biomarcadores del estado inflamatorio del organismo

10 i) Los niveles séricos de interleuquina-6 (IL-6, valor normal <7 pg/ml) se determinaron por duplicado, utilizando un kit de análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) comercial de alta sensibilidad de Mabtech (Agilent Technologies GmbH, Boblingen, Alemania);

ii) La proteína C-reactiva (CRP, valor normal <0,3 mg/dl), se determinó con un método inmuno-turbidimétrico;

15 iii) proteínas reaccionantes de fase aguda (haptoglobina, valores normales 30-200 mg/dl; sistema de globulina  $\alpha$ -1, valor normal 0,21-0,35 g/dl; proteínas que no reaccionan (albúmina, valores normales 4,02-4,76 g/dl; prealbúmina, valores normales 18-30 mg/dl y transferrina, valores normales 202-364 mg/dl).

## 3) Concentraciones en plasma de lactato

Éstas se midieron con pruebas enzimáticas siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante (Siemens Diagnostic, Alemania). El valor normal es 0,6-2,2 mmoles/l.

## 4) Como parte de la evaluación de rutina, los pacientes tenían las siguientes variables medidas:

20 i) características antropométricas: peso corporal (PC, kg), encontrado utilizando un levantador de pesas mecánico; altura (m), calculada desde la altura de la rodilla (Chumlea et al., 1985). El índice de masa corporal (IMC) se calculó en  $\text{kg/m}^2$ . Los pacientes (o sus cuidadores) fueron interrogados por su PC pre-agudo. La pérdida de peso real en relación con el peso corporal habitual (pre-agudo) > 5%, es decir, el peso corporal real/habitual <95% se consideró un índice de desnutrición significativa;

25 ii) mediciones biohumorales: variables de rutina, incluida la electroforesis de proteínas séricas.

## 5) Estado funcional

30 Éste se evaluó utilizando la Medida de Independencia Funcional (FIM) (Keith et al., 1987). Esta prueba es utilizada rutinariamente por el médico neuro-rehabilitador del centro. La FIM es una escala de 18 ítems que mide la independencia del paciente en la alimentación, el arreglo personal, el acto de vestirse, el uso del baño, la movilidad y la cognición. Una puntuación de 126 indica independencia funcional completa.

## 6) Disfagia

35 La identificación de la disfagia se llevó a cabo clínicamente para toda la población. En caso de diagnóstico positivo o incierto, los pacientes se sometieron a un examen de fluoroscopia de video. La severidad de la disfagia se evaluó mediante la Escala de Resultados y Severidad de Disfagia (DOSS), una escala de 7 puntos desarrollada para evaluar sistemáticamente la gravedad funcional de la disfagia (O'Neil et al., 1999). El intervalo de puntuación fue 1-7, donde el nivel 1 denota disfagia severa, el nivel 2 disfagia moderadamente grave, el nivel 3 disfagia moderada, el nivel 4 disfagia leve a moderada, el nivel 5 disfagia leve, el nivel 6 dentro del límite funcional/independencia modificado y nivel 7 normal en todas las situaciones.

## 7) Ingesta nutricional

40 Para los pacientes que se autoalimentan (n = 8) con una dieta modificada, las enfermeras de rehabilitación mantuvieron un diario alimentario de 3 días, que había sido entrenado previamente *ad hoc*. Las enfermeras registraron el tipo y el peso de alimentos cocidos o sin cocer seleccionados por los pacientes del menú de catering del hospital en una hoja de dieta durante 3 días, tanto antes como después de las comidas de los pacientes. La cantidad de alimento realmente ingerido se convirtió a su equivalente bruto cuando fue necesario, mediante el uso de tablas apropiadas (Carnevale et al., 1989). El análisis nutricional, llevado a cabo utilizando un programa informático diseñado por este grupo (Aquilani et al., 1999), se utilizó para el cálculo de las calorías ingeridas reales y los macro-/micronutrientes. La ingesta nutricional de la fórmula farmacéutica de los pacientes con PEG (n = 30) se calculó a partir de la composición nutricional referida en la etiqueta de la fórmula.

## 8) Terapia de rehabilitación

50 Todos los pacientes recibieron tratamiento de rehabilitación adaptado a cada paciente individual. En pocas palabras, la rehabilitación consistió en ejercicio terapéutico con un fisioterapeuta personal durante 60 minutos, cinco días a la

5 semana. El ejercicio incluyó la coordinación del ejercicio de intervalo de movimiento pasivo, activo y de asistencia activa, técnicas de facilitación de las extremidades contralaterales, ejercicio del tronco, ejercicios activos de las extremidades no afectadas y deambulación con dispositivos de asistencia o soporte. El número o la repetición en el ejercicio y la distancia de caminata aumentaron a medida que el rendimiento físico de los pacientes progresó. La terapia del habla, la terapia ocupacional (actividades de la vida diaria, la formación vocacional, perceptual y de actividad funcional), la actividad recreativa también se realizaron dependiendo de las necesidades individuales.

10 Para la rehabilitación de la disfagia, se intentó proporcionar a los pacientes niveles de DOSS  $\geq 3$  con una dieta modificada así como también enseñar cambios posturales de deglución seguros. Para la dieta, los alimentos en puré, homogéneos y cohesivos se utilizaron inicialmente con una progresión gradual a la comida con textura casi normal para las personas cuya disfunción deglutoria mejoró progresivamente.

Los cambios posturales durante las comidas generalmente consistieron en técnicas de adaptación de los pacientes, lo que redujo el riesgo de aspiración. Estos incluyen, por ejemplo, rotación de la cabeza hacia el lado afectado, inclinación de la cabeza hacia el lado más fuerte, meter la barbilla, movimientos de la barbilla hacia arriba.

15 Para los pacientes con DOSS  $< 3$  se realizaron intentos de transición oral después de la videofluoroscopia y/o después de las evaluaciones de los patólogos del habla. Si los pacientes podían comer con seguridad al menos dos tercios de sus calorías prescritas (1500 kcal/d), se interrumpía la alimentación por sonda.

20 **Aleatorización de pacientes** Después de completar todos estos procedimientos, los pacientes fueron asignados a un tratamiento de acuerdo con un procedimiento de asignación aleatoria (Figura 1). Se generó una lista de aleatorización utilizando el soporte lógico estadístico SAS (SAS Institute, Cary, NC). A y B fueron los identificadores del tratamiento ciego. La lista estuvo disponible tanto para el médico como para los farmacéuticos del hospital. El médico asignó secuencialmente a los pacientes al tratamiento A o B de acuerdo con una lista de aleatorización. El primer investigador, que interpretó todos los resultados fue cegado a la asignación de los pacientes. El grupo experimental (grupo EAA) recibió la composición descrita en la presente memoria que proporcionó 8 g de aminoácidos esenciales/día (Tabla 2; 4 g por la mañana + 4 g por la tarde diluidos en aproximadamente medio vaso de agua hasta el alta del paciente).

Tabla 2

Ingredientes	mg
<b>Aminoácidos totales que incluyen los siguientes</b>	<b>4000 (en total)</b>
L-Leucina (131,17) *	1250,00
L-Isoleucina (131,17) *	625,00
L-Valina (117,15) *	625,00
L-Lisina (146,19) *	650,00
L-Treonina (119,12) *	350,00
L-Histidina (155,16) *	150,00
L-Fenilalanina (165,19) *	100,00
L-Metionina (149,21) *	50,00
L-Triptófano (204,23) *	20,00
L-Tirosina (181,19) *	30,00
L-Cistina (240,30) *	150,00
<b>Otros ingredientes</b>	<b>mg</b>

Vitamina B6	0,15
Vitamina B1	0,15
Hidratos de carbono - Maltodextrinas	5454,10
<b>Ingredientes</b>	<b>mg</b>
Goma de xantano	750,00
Metilhidroxipropilcelulosa	500,00
Sabor a plátano	200,00
Deshidratado tribásico del citrato de sodio	150,00
Polvo de aspartamo	30,00
Acesulfamo de potasio	17,50
<b>Valor energético</b>	
Kcal	24,80
Kj	102,20

\* **Peso molecular de "Amino Acid, Nucleic Acids & Related Compounds - Specification/General Tests"**, 8ª Edición, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Como se puede observar en la Tabla 2, las razones en peso entre leucina, isoleucina y valina son preferiblemente equivalentes a 2:1:1. La Tabla 1 también muestra que las cantidades únicas de histidina, fenilalanina, metionina y triptófano son preferiblemente decrecientes (es decir, la cantidad de histidina es mayor que la fenilalanina, que es mayor que la metionina, que es mayor que el triptófano) y la cantidad (peso en gramos o moles) de cistina es preferiblemente mayor que la de tirosina,

La composición que se muestra en la Tabla 2 se prepara en primer lugar cargando en un mezclador de cuatro vías L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, vitamina B1 y vitamina B6 junto con L-lisina, para obtener una premezcla. El % de composición de la premezcla se representa en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Ingredientes	%
Maltodextrinas	83,296
L-Fenilalanina	8,333
L-Metionina	4,167
L-Tirosina	2,500
L-Triptofano	1,667
Vitamina B1	0,019
Vitamina B6	0,018

Los ingredientes se mezclan durante un período de 10 minutos para obtener una premezcla homogénea.

El resto de los ingredientes enumerados en la Tabla 1 se cargan en el mezclador de cuatro vías y se mezclan durante un período de 20 minutos para obtener una composición final homogénea.

La Tabla 4 enumera las características de la composición obtenida como se describió anteriormente:

**Tabla 4**

<b>Aspecto</b>	Mezcla granular de polvos
<b>Color</b>	Blanco
<b>Olor</b>	Olor de plátano
<b>Gusto</b>	Sabor agrio
<b>Granulometría</b>	<0,8 mm 95% mín.
<b>Vierta la densidad aparente (g/l)</b>	430 ( $\pm$ 20%)
<b>Aspecto de la suspensión en agua (60 ml)</b>	Amarillento, muy viscoso. Dejar reposar 5 minutos supone una consistencia semisólida
<b>Tiempo de dispersión en agua (60 ml)</b>	<180 segundos

5

La composición objeto de la presente descripción se agrega y dispersa en un líquido, preferiblemente agua. La cantidad de líquido para añadir a la composición descrita en la presente memoria depende, por ejemplo, de la consistencia que sea necesaria obtener. Este parámetro es evaluado y determinado por un experto en el campo teniendo también en cuenta el grado de disfagia del paciente.

10 El grupo de placebo (Plac) recibió un producto isocalórico similar que contenía maltodextrina en lugar del agente activo que comprende los aminoácidos.

Las enfermeras de rehabilitación ayudaron a cada paciente con su dieta oral durante la ingesta del placebo o de la composición descrita en la presente memoria (EAA) para garantizar la observancia de los pacientes.

15 Las enfermeras estaban cegadas al tipo de complementación (Plac o EAA), los paquetes que contenían los productos eran idénticos, pero numerados como 1 o 2. El contenido solo era conocido por el médico y los farmacéuticos (1 = placebo, 2 = EAA). El contenido del producto en los paquetes 1 y 2 tenía un color y sabor similares. Para los pacientes que recibieron nutrición enteral (NE), la solución acuosa de la composición descrita en la presente memoria se suministró a través del tubo de alimentación (gastrostomía endoscópica percutánea). El estudio duró  $38 \pm 4$  días desde el procedimiento de aleatorización. Los aminoácidos, los marcadores de inflamación y las medidas antropométricas y del estado funcional se repitieron en el alta hospitalaria de la rehabilitación ( $42 \pm 4$  días desde el ingreso). El estudio fue aprobado por el Comité Científico Ético-Técnico del Instituto. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los participantes o, cuando corresponda, de sus cuidadores, después de que la naturaleza del estudio se hubiera explicado completamente.

25 **Análisis estadístico.** Se realizaron estadísticas descriptivas para todas las variables registradas, los medios de informe y las desviaciones típicas para las variables cuantitativas y las frecuencias de distribución para las variables cualitativas. La prueba Chi-cuadrado se usó para variables categóricas. Se utilizó un análisis de varianza de medición repetido para evaluar cualquier diferencia de tendencia a lo largo del tiempo entre pacientes con EAA o Plac. Las diferencias de referencia entre los grupos (EAA y Plac) y las diferencias en los perfiles de aminoácidos entre toda la población de accidente cerebrovascular en el ingreso a la rehabilitación y los controles sanos fueron sometidas a ensayo por medio de una prueba *t* de Student. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

30

## RESULTADOS

Todos los pacientes que ingresaron a este estudio se aleatorizaron para recibir la composición descrita en la presente memoria (EAA) o placebo (Plac) (Figura 1).

### 1) Recambio de proteína del músculo del brazo no afectado.

35 La Tabla 5 muestra las concentraciones de aminoácidos arteriales y las diferencias arterio-venosas de aminoácidos

musculares (A-V) que se encuentran tanto para los pacientes con accidente cerebrovascular al ingreso a la rehabilitación como para los sujetos sanos.

**Tabla 5**

Perfiles de aminoácidos (µmoles/l)	Sujetos sanos (n = 8)	Accidente cerebrovascular (n = 38)	valor p
Aspartato			
A	98,1±40,6	16,6±6,7	p=0,001
A-V	-0,3±14,3	0,55±4,7	p=0,9
Glutamato			
A	198,7±10,6	195,5±137,3	p=0,9
A-V	-7,5±21	-6,5±55,9	p=0,8
Histidina			
A	58±5,1	55,5±10,3	p=0,7
A-V	-0,4±5	-6,1±8,7	p=0,3
Asparagina			
A	61±1,1	35,5±10,5	p<0,001
A-V	4,9±5,5	-4,3±6,6	p=0,002
Serina			
A	88,4±4,3	108±35,7	p=0,025
A-V	-2,4±6,4	1,5±24,6	p=0,6
Glutamina			
A	464,8±14	323,5±184,2	p=0,003
A-V	-2,4±23	-18,2±67,2	p=0,2
Arginina			
A	59,3±7,6	89,1±69,42	p=0,6
A-V	7,3±19,5	18±62,4	p=0,3
Citrulina			
A	24,2±3,8	30,3±14	p=0,7
A-V	-0,9±5,6	1,2±7,3	p=0,5

ES 2 651 903 T3

Perfiles de aminoácidos (µmoles/l)	Sujetos sanos (n = 8)	Accidente cerebrovascular (n = 38)	valor p
Glicina			
A	268,3±12	239,3±60,9	p=0,8
A-V	9,9±29,9	-19,4±41,8	p=0,2
*Treonina			
A	106,6±11	120,4±41,5	P=0,8
A-V	-0,8±14,8	-12,2±10,5	p=0,029
Alanina			
A	312,6±15,7	259,3±84	p=0,012
A-V	-15±20,5	-68,5±40,4	p=0,002
Taurina			
A	125,8±9,7	55,6±23,1	p<0,001
A-V	8,1±12,9	-34±23	p<0,001
Tirosina			
A	56,3±6,1	57,4±21,3	p=0,9
A-V	4,5±9,1	-2,75±11	p=0,4
*Valina			
A	155±12,5	229,4±47,7	p=0,005
A-V	4,4±18,9	-15,5±16,6	p=0,064
*Metionina			
A	10,75±1,7	35,1±6,6	p<0,001
A-V	0,7±1,9	-0,3±4,9	p=0,5
*Tryptófano			
A	51,1±4,6	33,9±7,8	p<0,001
A-V	-0,5±7,6	-3,7±4,1	p=0,5

ES 2 651 903 T3

Perfiles de aminoácidos (µmoles/l)	Sujetos sanos (n = 8)	Accidente cerebrovascular (n = 38)	valor p
*Fenilalanina			
A	46,3±5,7	67,4±26,6	p=0,037
A-V	0,3±6,6	-6,9±8,1	p<0,03
*°Isoleucina			
A	45,8±5	76±17,7	p<0,001
A-V	1,1±5,7	-6,4±8,5	p=0,5
*°Leucina			
A	78,13±6,35	135,6±36,4	p<0,001
A-V	0,38±7,2	-18,8±33,3	p=0,02
Ornitina			
A	56,4±6,4	60,9±20,9	p=0,8
A-V	1±10,5	-10,1±8,7	p=0,01
*Lisina			
A	115,8±11	201,4±71,6	p<0,001
A-V	-1,3±16,7	-12,6±53	p=0,4
Total de aminoácidos			
A	24,81±60,5	2425,7±601	p=0,2
A-V	13,24±78,1	-225±267,6	p=0,6
*EAA			
A	609,4±18,9	899,2±194,1	p=0,5
A-V	4,3±21,2	-76,4±167	p=0,3
°BCAA			
A	279±13,2	441±88,4	p=0,2
A-V	5,9±25,7	-40,7±59	p=0,09
<b>Los datos se expresan como media ± desviación (DT). Análisis estadístico: prueba t no pareada. * Aminoácidos Esenciales (EAA); ° Aminoácidos de Cadena Ramificada (BCAA)</b>			

Los resultados mostraron que el metabolismo de la proteína muscular del lado no afectado predominantemente se

encontraba en un estado hipercatabólico (MH) debido al exceso de catabolismo proteico sobre la síntesis de proteína indicada por la liberación muscular de fenil-. Esto fue significativamente diferente ( $p < 0,03$ ) de sujetos sanos cuyo metabolismo de proteínas musculares estaba en equilibrio. Además de fenil-, los pacientes liberaron cantidades significativas de asparragina, treonina, leucina, alanina y taurina.

- 5 En cuanto a las concentraciones de aminoácidos arteriales, los pacientes con accidente cerebrovascular tenían niveles más altos de serina, metionina, fenil-, isoleucina, leucina, lisina, pero menores concentraciones de ácido aspártico, asparragina, glutamina, alanina, taurina, triptófano. Un sub-análisis de pacientes divididos en el tipo de accidente cerebrovascular (isquémico o hemorrágico), reveló resultados similares.

- 10 La Tabla 6 muestra los perfiles de aminoácidos de los dos subgrupos de pacientes aleatorizados para recibir la composición descrita en la presente memoria (Tabla 2, EAA) o Plac, tanto al ingreso como al alta de la rehabilitación. Al ingreso, los dos subgrupos no tuvieron diferencias significativas en la tasa de HM (= liberación de fenil-), en las otras diferencias A-V de aminoácidos y aminoácidos totales (TAA). Las concentraciones arteriales de aminoácidos individuales, de TAA y de EAA fueron similares tanto para EAA como para Plac.

- 15 En el momento del alta, los pacientes que asumieron que la composición descrita en la presente memoria (EAA) pero no los pacientes con Plac normalizaron su metabolismo proteico en el brazo no afectado. De hecho, la liberación de fenil- cambió a la captación muscular en pacientes tratados, pero se mantuvo prácticamente sin cambios en pacientes con Plac. Esta diferencia en el curso temporal de fenil- (A-V) fue significativa (interacción,  $p=0,02$ ).

**Tabla 6**

Perfiles de aminoácidos ( $\mu\text{moles/l}$ )	Ingreso			Alta		^ Tendencia a lo largo del tiempo (nivel de p) interac.
	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	§ valor de p	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	
Aspartato						
A	16,27 $\pm$ 7,3	17,11 $\pm$ 6,4	p=0,1	17,3 $\pm$ 6	17,5 $\pm$ 10,6	p=0,1
A-V	1 $\pm$ 5,2	0,01 $\pm$ 4,3	p=0,2	-2 $\pm$ 4,3	2,8 $\pm$ 5,5	p=0,04
Glutamato						
A	207 $\pm$ 153,5	181,6 $\pm$ 122	p=0,2	171,1 $\pm$ 102,3	150 $\pm$ 102,8	p=0,3
A-V	-12,7 $\pm$ 71,3	1,1 $\pm$ 31	p=0,5	-14,7 $\pm$ 35	4,7 $\pm$ 37,4	p=0,8
Histidina						
A	59,36 $\pm$ 10,8	50,9 $\pm$ 8	p=0,1	59,2 $\pm$ 11,8	68,9 $\pm$ 13,6	p=0,7
A-V	-4,6 $\pm$ 9,3	-8 $\pm$ 8	p=0,4	-7,7 $\pm$ 4,8	-1,4 $\pm$ 6,2	p=0,02
Asparagina						
A	39 $\pm$ 7,7	38 $\pm$ 13,5	p=0,1	35,4 $\pm$ 5,4	43,1 $\pm$ 10,4	p=0,05
A-V	-2,8 $\pm$ 5,4	-6 $\pm$ 7,8	p=0,7	-5,2 $\pm$ 3,5	-1,1 $\pm$ 4,2	p=0,03
Serina						
A	115 $\pm$ 42,9	99,3 $\pm$ 24,1	p=0,1	107,8 $\pm$ 30,2	119 $\pm$ 40,6	p=0,9
A-V	0,9 $\pm$ 25	2,22 $\pm$ 25,5	p=0,6	-1,3 $\pm$ 19,6	15,2 $\pm$ 31,1	p=0,5
Glutamina						

ES 2 651 903 T3

Perfiles de aminoácidos (µmoles/l)	Ingreso			Alta		^ Tendencia a lo largo del tiempo (nivel de p) interac.
	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	§ valor de p	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	
A	323,3±192,8	323,8±184,8	p=0,4	378±131,6	463,6±99	p=0,4
A-V	6,6±75,5	-48,4±41,7	p=0,07	-10,8±69,6	-22,6±31,6	p=0,07
3-metilhistidina						
A	3±1,2	2,2±1	p=0,2	2,4±1,4	2,4±1,1	p=0,2
A-V	0,3±1,1	-0,1±0,1	p=0,2	-0,2±1,1	-0,03±1,1	p=0,1
Arginina						
A	103,7±86,2	71,2±38,8	p=0,3	98,4±57,1	104,9±65,2	p=0,08
A-V	30,6±81,6	2,7±20,9	p=0,5	10,8±61,7	40,4±62,1	p=0,07
Citrulina						
A	33,7±12,2	26,1±15,7	p=0,2	35,7±13,7	35,6±21,1	p=0,4
A-V	2,3±9,6	-0,2±3,2	p=0,5	-3±5,6	0,3±1,3	p=0,09
Glicina						
Ap =	243,6±71,7	233,9±48,1	p=0,2	240,9±40,4	308,1±9	p=0,08
A-V	-7,4±48,9	-34±26,8	p=0,8	-38,1±21,3	-9,3±24,5	p=0,01
*Treonina						
A	113,3±19,5	129±58,9	p=0,2	131,8±52,6	157,7±54,6	p=0,5
A-V	-11,5±8,6	-13±12,9	p=0,2	-10,5±16,2	2,4±15,5	p=0,09
Alanina						
A	242,3±78,2	280,1±90,8	p=0,1	274,7±76,1	365,5±61,6	p=0,6
A-V	-70,5±27	-66±54,4	p=0,2	-58,9±68,7	-33±50,2	p=0,08
Taurina						
A	61,8±20,7	4±24,8	p=0,08	43,7±5,9	37,3±16,2	p=0,09
A-V	-33±29,5	-35,3±13,2	p=0,3	-52±21,4	-27,1±13,6	p=0,006
Tirosina						
A	56,5±10,9	58,4±30,4	p=0,1	49,2±14,8	62,1±27,2	p=0,8
A-V	-4,5±5,5	-0,7±15,6	p=0,4	-4,8±2,7	1,9±7,8	p=0,03

ES 2 651 903 T3

Perfiles de aminoácidos (µmoles/l)	Ingreso			Alta		^ Tendencia a lo largo del tiempo (nivel de p) interac.
	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	§ valor de p	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	
*°Valina						
A	265,7±39,8	202,3±33,7	p=0,4	198,7±49,1	248,5±31,8	p=0,6
A-V	-12,5±20,5	-17±17,6	p=0,07	-18±12,7	0,05±21,2	p=0,7
*Metionina						
A	36±8,7	34,5±5,9	p=0,2	27,7±16,8	26±2,8	p=0,5
A-V	0,5±0,7	-0,8±6,3	p=0,3	3,5±14,8	-2±2,8	p=0,7
*Triptófano						
A	35±8,1	32,4±7,7	p=0,1	33,1±8,4	36,1±9,1	p=0,8
A-V	-3,1±4,6	-4,3±3,7	p=0,2	-3,3±3,3	-0,4±6,1	p=0,3
*Fenilalanina						
A	69,7±21,9	64,4±32,5	p=0,1	51,4±11,1	56,7±11,8	p=0,5
A-V	-6,9±7,6	-6,8±9,1	p=0,1	-6±4,4	0,9±7,6	p=0,02
*°Isoleucina						
A	81,9±12,2	68,8±21,2	p=0,3	85,4±65,6	111,5±73,1	p=0,09
A-V	-6,4±22	-6,3±14,5	p=0,1	6±28,3	11,6±17,6	p=0,5
*°Leucina						
A	148,6±30,8	119,6±38	p=0,07	149,6±134,2	191,7±119,1	p=0,4
A-V	-13,8±28	-24,2±39,2	p=0,5	7,7±16,4	11,7±26,4	p=0,8
Ornitina						
A	63,7±12,6	58,1±27,4	p=0,5	56±13,9	57,3±22,8	p=0,8
A-V	-13,4±9,3	-6,7±7	p=0,09	-17,6±17,6	-2,1±21	p=0,08
*Lisina						
A	205,3±77	196,7±68,6	p=0,7	209,6±95,6	248,2±124	p=0,8
A-V	-8,3±67,2	-17,8±31,3	p=0,6	-1,9±64,3	58,3±122,1	p=0,7
Total de aminoácidos						

Perfiles de aminoácidos (µmoles/l)	Ingreso			Alta		^ Tendencia a lo largo del tiempo (nivel de p) interac.
	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	§ valor de p	Placebo (n = 19)	EAA (n = 19)	
A	2523,7±331,8	2292,4±472,7	p=0,3	2457,1±826,8	2747±465,9	p=0,02
A-V	-169,2±25,6	-289,6±18	p=0,5	-63,8±25,7	51,2±23,5	p=0,05
* EAA						
A	956±103	848±242	p=0,5	887,3±254	1076,4±295	p=0,05
A-V	-62±20	-90,2±16,9	p=0,3	-22,5±20	82,6±27,4	p=0,01
°BCAA						
A	493,6±57,3	391±84,5	p=0,5	433,7±213,9	552±225,9	p=0,09
A-V	-32,7±23,5	-47,5±23,8	p=0,6	-4,3±19	23,35±21,7	p=0,05

Los datos se expresan como media ± desviación típica (DT). Análisis estadístico: §prueba t no pareada; ^ análisis de la varianza de medidas repetidas. Tendencia a lo largo del tiempo: diferencias de interacción en las tendencias entre grupos. \*Aminoácidos esenciales (EAA); Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA).

La Figura 2 muestra que la discrepancia entre los dos subgrupos también conlleva TAA arteriales (p = 0,02), TAA (A-V) (p = 0,05), EAA (A-V) (p = 0,01), BCAA (A-V) (p = 0,05, no se muestra en la figura).

5 De hecho, de todos los aminoácidos medidos, 49% de ellos fueron adsorbidos por sujetos EAA (sujeto que tomó la composición descrita en la presente memoria), mientras que solo 23,2% por los compuestos Plac (p <0,001). Los cursos de tiempo de las diferencias A-V entre los dos grupos también fueron diferentes para ácido aspártico, histidina, asparragina, glicina, taurina, tirosina, liberados más en Plac que en los grupos EAA. En los últimos pacientes, el ácido aspártico fue no liberado/no absorbido.

**2) Otras variables de estudio**

10 La Tabla 7 muestra las características demográficas, antropométricas, neurofuncionales y biohumorales, así como las ingestas nutricionales de los pacientes con accidente cerebrovascular, como un grupo completo y de los dos subgrupos después de la aleatorización, tanto al ingreso como al alta. Al ingreso, todos los sujetos estaban desnutridos debido a la pérdida de peso después del evento en comparación con su peso corporal habitual (-9,7%). Los pacientes estaban inflamados, como lo demuestran los altos niveles séricos de IL-6 y CRP, con la consecuente reducción de las concentraciones de reaccionantes negativos de la respuesta de fase aguda (albúmina, prealbúmina, transferrina) y concentraciones crecientes de los positivos (haptoglobina, α<sub>1</sub> globulina).

15

**Tabla 7**

Variables	nv	Todos los pacientes (n = 38)		Placebo (n = 19)		EAA (n = 19)		Tendencia a lo largo del tiempo (nivel de p) interac.
		ingreso	alta	ingreso	alta	ingreso	alta	
<b>Demográficas</b>								
Hombre/Mujer	-	25/13	-	13/6	-	12/7	-	-
Edad (años)	-	69,7±11,4	-	71,3±10	-	68±13,2	-	-

ES 2 651 903 T3

<b>Antropométricas</b>								
Peso corporal real (kg)	-	59,8±10,2	57,7±9,8	57,6±7,1	55,9±7,5	62,2±12,7	59,7±12	p = 0,6
Peso corporal real/habitual (%)	-	90,4±7,4	87,5±9,5	90,5±7,2	87,8±9,3	90,3±8	87,1±10,3	p = 0,8
IMC (kg/m) <sup>2</sup>	-	21,6±3	20,88±3,14	21,3±2,6	20,7±2,9	22±3,5	21,1±3,5	p = 0,8
<b>Sangre</b>								
ESR 1ª hr (mm)	2-20	35,8±11,7	33,2±18,1	31,2±6,8	27,6±16	43,3±15,8	37,2±19,7	p = 0,7
Hemoglobina (g/dl)	F>12; M>13	12,2±1,6	12,1±1,2	12,6±1,8	12,3±1,3	11,7±1	12±1,1	p = 0,07
Urea en sangre (mg/dl)	20-40	42,7±19,7	37,5±19	48,70±15	37,6±7,6	32,7±23,7	37,3±26	p = 0,9
Creatinina sérica (mg/dl)	0,7-1,2	1±0,3	1±0,3	1,1±0,4	1,1±0,3	0,8±0,2	0,9±0,3	p=0,5
Glucosa plasmática (mg/dl)	80-110	115,1±23,6	106,9±11,6	122,5±25,8	104,8±14,1	100,3±8,5	109,7±9,3	p = 0,07
Interleuquina-6 (pg/ml)	<7	15,9±14,9	6,7±9,86	11,7±9	8,5±13,5	19,6±18,5	4,6±2,3	p = 0,5
Proteína C reactiva en suero (CRP) (mg/dl)	<0,3	1,9±1,9	1,4±2,5	1,7±1,3	1,6±2,8	2,2±2,5	1,2±2,3	p = 0,6
Fibrinógeno (mg/dl)	230-550	452,4±75,8	400,9±87,9	465,1±87,3	387,2±68,2	438±63,1	412,7±106	p = 0,8
Haptoglobina sérica (mg/dl)	30-200	293,6±93	211±75	313±94	245±74	272±92	169±56	p = 0,7
α1 Globulina sérica (mg/dl)	210-350	504±74	436±89	506±80	467±92	472±79	382±85	p = 0,8
Albúmina sérica (g/dl)	4,02-4,76	2,9±0,5	3,2±0,5	3±0,5	3,1±0,5	2,7±0,6	3,3±0,5	p = 0,03
Prealbúmina sérica (mg/dl)	18-30	18,8±5,7	20,9±7,1	19,4±6,5	19±5,9	18,1±4,9	22,9±8,1	p = 0,7
Transferrina sérica (mg/dl)	202-364	183,1±28,3	193,8±35,1	186,1±33,2	195,4±39,6	179,3±22,3	192±31,8	p = 0,5
Lactato plasmático (mmoles/l)	0,6-2,2	1,6±0,5	2±0,6	1,4±0,4	2±0,6	1,8±0,5	2±0,5	p = 0,3
<b>Función neurológica</b>								
Puntuación FIM	125	29,4±18,5	54±31,2	31,1±16	60±36,8	27,6±21,7	47,4±23,9	p = 0,5

<b>Sangre</b>								
Puntuación DOSS	1-7	2,1±1,3	3,3±1,7	2,5±1,3	3,9±1,8	1,6±1,3	2,6±1,5	p = 0,7
<b>Nutrición (PEG o ingesta oral)</b>								
Energía (kcal/d) (kcal/kg)	- ≥25	1293,6±155 22,4±2,7	misma	1362±143 23,6±2,5	misma	1293±155 20,7±2,9	misma	-
Proteína (g/d) (g/kg)	- ≥1,1	54,1±9,6 0,94±0,17	misma	58,7±10,2 1,02±0,17	misma	54,2±9,6 0,87±0,19	misma	1,02±0,20*
Hidratos de carbono (g/d) (g/kg)	- 2,5-4	146,2±32 2,5±0,5	misma	164,3±30,1 2,85±0,2	misma	146,2±32 2,35±0,9	misma	-
Lípidos (g/d) (g/kg)	- ≤1	56,9±11 0,98±0,19	misma	55,3±5,5 1±0,1	misma	50,1±7,5 0,8±0,1	misma	-
<b>Los datos se expresan como media ± desviación típica (SD). Análisis estadístico: análisis de varianza de medidas repetidas. Tendencia a lo largo del tiempo: diferencias de interacción en las tendencias entre grupos. IMC: índice de masa corporal; ESR: velocidad de sedimentación eritrocítica; FIM: medida de independencia funcional; DOSS: Escala de Resultados y Severidad de Disfagia. * Esta cantidad es la suma de la proteína administrada/ingerida (54,2 g) y la proteína (6,9 g) proporcionada por EAA añadidos como suplemento [41].</b>								

5 Los pacientes también tenían concentraciones sanguíneas elevadas de glucosa y concentraciones normales de lactato. Desde un punto de vista funcional, - los pacientes tenían una discapacidad grave (FIM -76,7% del valor normal). En la evaluación de DOSS, diecinueve pacientes tenían disfagia severa (DOSS = 1,21 ± 0,88) y diecinueve tenían una disfagia moderada (DOSS = 3,07 ± 1,76). Las calorías diarias y los macronutrientes administrados o ingeridos fueron de 22,4 ± 2,7 kcal/kg, 0,94 ± 0,17 g/kg de proteína, 2,5 ± 0,5 g/kg de hidratos de carbono, 0,98 ± 0,19 g/kg de lípidos. Después de la aleatorización, los subgrupos EAA y Plac fueron similares para todas las variables medidas en el momento inicial.

10 Al alta, ambos grupos tuvieron reducciones similares de PC, que no fueron significativamente diferentes de las del momento inicial y mejoras similares en la tasa de disfagia, discapacidad física, inflamación, proteínas circulantes de la respuesta de fase aguda a la inflamación. Los niveles de glucosa en sangre mejoraron en el grupo de Plac. Ambos grupos tenían concentraciones similares de lactato en plasma, que a lo largo del tiempo no difirieron de los valores iniciales. La adición de EAA a 8 g/d de EAA a la proteína total administrada/ingerida (54,2 g/d) proporcionó 15 6,9 g de sustrato de proteína, por lo que, al momento del alta, el grupo tratado tenía 1,02 kg de proteína proporcionada.

Los resultados proporcionados en la presente memoria confirman que los músculos del brazo no afectados de pacientes con accidente cerebrovascular subagudo pueden tener una prevalencia de la actividad catabólica sobre la anabólica.

20 La composición descrita en la presente memoria tendió a mejorar la tasa de inflamación, convirtiendo así el hipercatabolismo muscular (MH) en metabolismo de proteínas anabólico/equilibrado en pacientes con accidente cerebrovascular disfágico un mes después del evento agudo.

25 La inflamación corporal persistente, la inmovilización/desuso, la desnutrición fueron factores presentes en la población de estudio que pueden aumentar el HM en el brazo no afectado. El estado inflamatorio, cebado por un accidente cerebrovascular agudo y posiblemente persistente en el tiempo por complicaciones posteriores al infarto, reduce la síntesis de proteínas y aumenta la degradación, también a través del eje corticosuprarrenal hipotálamo-hipofisario estimulado por IL-6. La tasa de proteólisis probablemente se acentuó por la resistencia a la insulina como se indicó en la población de estudio por las concentraciones de glucosa en sangre por encima del valor normal. La inflamación fue responsable de la re-priorización hepática de la síntesis de proteínas observada en los pacientes del estudio.

30 El desuso, derivado de la inmovilización, denervación, descarga muscular, provoca un aumento de la proteólisis y, en menor medida, una reducción de la síntesis de proteínas.

La descarga *per se* puede conducir a la proteólisis muscular a través del estrés oxidativo inducido en el músculo

esquelético que desencadena una mayor degradación de la proteína.

La nutrición inadecuada después del accidente cerebrovascular, en particular la ingesta de proteínas, contribuye a la proteólisis.

5 El hecho de que los pacientes tuvieran una ingesta nutricional inadecuada prolongada antes de su ingreso a la rehabilitación está indicada por la pérdida de peso corporal y la disfagia asociadas.

10 El hallazgo de HM parece contrastar con los niveles normales de aminoácidos esenciales circulantes de los pacientes. Esta discrepancia puede conciliarse teniendo en cuenta dos factores: primero, la mala nutrición en situaciones agudas se debe a una ingesta energética inadecuada pero no a la ingesta de proteínas, dado que la primera representa 89,6% de los requerimientos energéticos corporales, mientras que la última es 99% de la cantidad recomendada. Las cantidades de energía y proteína ingeridas fueron similares y, respectivamente, más altas que las referidas en un estudio previo realizado en pacientes con accidente cerebrovascular en un período similar después del evento agudo (21 d). Los niveles normales de EAA sugieren que el aporte/ingestión de 1 g/kg/d de proteína por accidente cerebrovascular subagudo en la etapa de rehabilitación de la enfermedad puede ser nutricionalmente pero no metabólicamente adecuado para reducir el hipercatabolismo muscular. Esto sugeriría que el músculo no afectado es un sitio de profundas perturbaciones metabólicas, anulando la actividad anabólica promovida por los EAA.

20 El desuso, la descarga, el aumento del contenido de citoquina muscular son algunos de los factores que conducen al HM. El desuso activa la potente actividad proteolítica de la vía ubiquitina-proteasoma dependiente de ATP, los lisosomas, el sistema de calpaína dependiente de calcio. La descarga es un potente promotor de la proteólisis muscular mediante la inducción del estrés oxidativo. El aumento del contenido de citoquina muscular puede ejercer un efecto proteolítico, en particular de la proteína miofibrilar. Curiosamente, las citoquinas que afectan a la función de la célula muscular pueden producirse intrínsecamente dentro del músculo o por células no musculares como neutrófilos y macrófagos. Durante la inflamación, estos fagocitos se infiltran en el tejido muscular. Otras células no residentes tales como fibroblastos, células de músculo liso vascular, endotelio vascular pueden producir citoquinas.

25 Además de una ingesta adecuada de proteínas, el aclaramiento metabólico reducido de los BCAA circulantes por el tejido adiposo puede contribuir a los niveles normales de aminoácidos esenciales arteriales (EAA). De hecho, el tejido adiposo modula los niveles de BCAA circulantes, pero en el caso de la resistencia a la insulina, como en la población de estudio de los autores de la presente invención, reduce o interrumpe la captación de BCAA.

30 Estudios previos han abordado el plazo de la pérdida muscular después del accidente cerebrovascular en la extremidad no afectada. En la primera semana de accidente cerebrovascular, un estudio encontró debilidad muscular de cuádriceps no afectados de pacientes con accidente cerebrovascular hemipléjico y una correlación entre un cambio de la fuerza del cuádriceps y la pérdida aguda de peso. Otra investigación no informó sobre evidencia de pérdida de fuerza muscular en ningún miembro. Varios estudios han documentado una reducción de la masa muscular y la fuerza seis meses después del accidente cerebrovascular. Esto se verificó más claramente en el miembro parético en comparación con el miembro inferior y el miembro superior no paréticos. Un estudio demostró una reducción de fuerza muscular en ambas piernas en pacientes un año después del accidente cerebrovascular en comparación con sujetos normales.

40 Los resultados referidos en la presente memoria proporcionan información del momento de la pérdida muscular de la extremidad no afectada, ya que documenta el hipercatabolismo muscular en pacientes con accidente cerebrovascular un mes después del accidente cerebrovascular. Esto sugiere que, en el accidente cerebrovascular subagudo, las alteraciones inflamatorias metabólicas sistémicas pueden ser un factor importante en el desgaste muscular, lo que se suma a otros mecanismos de debilidad lateral no afectada. Estos mecanismos incluyen daño muscular por lesión de accidente cerebrovascular debido a proyecciones bilaterales de cada hemisferio cerebral, inactividad física, desnutrición y posible debilidad motora por co-morbilidades en el período anterior al evento. Es razonable creer que los factores sistémicos también tienen un impacto negativo sobre los músculos contralaterales. En comparación con sujetos sanos, los pacientes incluidos en el presente estudio también liberaron cantidades significativas de los aminoácidos asparragina, treonina y BCAA. Esto sugeriría un empobrecimiento progresivo del contenido de aminoácidos del músculo no afectado.

50 Otro hallazgo que diferencia los sujetos con accidente cerebrovascular y sanos es la concentración de ciertos aminoácidos en la sangre arterial. Los accidentes cerebrovasculares disminuyen los niveles de aspartato, asparragina, glutamina, alanina, taurina, triptófano pero aumentan los niveles de BCAA, metionina, fenil-, lisina. En la inflamación y la proteólisis muscular, estas reducciones sugerirían una mayor depuración metabólica de los aminoácidos por los órganos viscerales, incluidos el hígado, el intestino y el riñón, que estarían en un estado hipermetabólico. Por ejemplo, el hígado tiene un alto consumo de aspartato, asparragina, alanina y glutamina gliconeogénicos, el intestino y el riñón de glutamina, las células inmunológicas de glutamina, el cerebro de todos los aminoácidos, en particular del precursor de serotonina, triptófano.

Los aumentos en las concentraciones de aminoácidos arteriales son principalmente de origen muscular dado que, además de la liberación de fenilo, los BCAA, la metionina y la lisina experimentan una liberación excesiva. Los

niveles normales de lactato sugieren que en los músculos del brazo no afectados, existe una vía aeróbica-anaeróbica equilibrada que forma energía. Curiosamente, tanto la degradación de proteínas como la síntesis requieren grandes cantidades de energía para que se produzca.

5 En resumen, esta investigación muestra que los músculos del brazo no afectados de los pacientes hemipléjicos con accidente cerebrovascular disfágico son sitios de actividad hipercatabólica que, si no se corrige, conducen al desgaste muscular.

10 Además, los accidentes cerebrovasculares disfágicos tienen alteraciones del perfil arterial de aminoácidos. La pérdida de masa muscular y fuerza tiene un impacto significativo en la funcionalidad y el pronóstico de vida de los pacientes con accidente cerebrovascular. Los sujetos con agotamiento muscular tienen un control metabólico de la glucosa alterado, mayor riesgo de osteoporosis, que puede ser responsable de fracturas de cadera y caídas, descondicionamiento cardiovascular y una discapacidad más acentuada, en particular para caminar.

Por lo tanto, reconocer y tratar el desgaste muscular tan pronto como sea posible es de suma importancia para el resultado de la rehabilitación en pacientes con accidente cerebrovascular, especialmente si consideramos que 80% de la recuperación neuromotora total ocurre en el plazo del primer mes desde un accidente cerebrovascular agudo.

15 Este estudio indica claramente que la administración de la composición descrita en la presente memoria puede corregir la sobredegradación de proteína muscular no afectada en pacientes con accidente cerebrovascular disfágico subagudo.

20 Por el contrario, sin la administración de tales composiciones, los pacientes continuaron perdiendo masa muscular setenta días después del accidente cerebrovascular agudo. Después de la rehabilitación, la actividad predominantemente anabólica en el grupo EAA estuvo acompañada por la captación muscular no afectada del 49% de los aminoácidos arteriales y de los aminoácidos arteriales totales, lo que sugieren el recambio de proteína muscular anabólica.

Esto se vio reforzado por las menores liberaciones de histidina, glicina y taurina en comparación con las del grupo de placebo, así como por el aumento de la disponibilidad arterial de TAA.

25 Con respecto a la síntesis de proteínas, los aminoácidos esenciales de cadena ramificada actúan como combustible y señales anabólicas en el músculo humano. La complementación crónica con leucina, como aquí, estimula la síntesis de proteínas posprandial en tejidos sensibles, incluidos el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo. Se ha demostrado que la ingesta oral de 2,5 g de leucina estimula la síntesis de proteínas musculares después del ejercicio o después del ayuno nocturno.

30 Con respecto a la proteólisis, la leucina es un factor regulador de la degradación de la proteína miofibrilar, ya que suprime la degradación de la proteína miofibrilar poco después de la administración oral. La infusión de BCAA en seres humanos disminuye marcadamente la degradación de la proteína del músculo esquelético, pero estimula la síntesis de proteínas en el corazón. Se ha demostrado que el uso eficiente de proteínas está determinado por la variación de la sensibilidad de la proteólisis a los aminoácidos en lugar de la síntesis de proteínas. Pequeñas cantidades de aminoácidos son suficientes para reducir la proteólisis a diferencia de la síntesis de proteínas.

35 Varios mecanismos subyacen a la síntesis de proteínas y, al mismo tiempo, reducen la proteólisis por aminoácidos esenciales. Un mecanismo es la disponibilidad adecuada de aminoácidos esenciales *per se*. De hecho, los aminoácidos esenciales pueden estimular la síntesis de proteínas independientemente de las hormonas. Otros mecanismos incluyen la regulación de la expresión génica, la modulación de las actividades de la hormona anabólica, la mejora de la formación de energía del metabolismo aeróbico y una proporción circulante reducida de TNF $\alpha$ /IGF-1. Finalmente, los aminoácidos influyen en los genes diana en la transcripción, la estabilidad del ARNm y la traducción. Los aminoácidos y, en particular, los EAA, promueven la síntesis de proteínas estimulando el factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-1) y modulando la señalización de la insulina. De hecho, juegan un papel en la regulación de la señalización de insulina a través de la vía de señalización de nutrientes de mTOR. La insulina (y el IGF-1) no pueden estimular la síntesis de proteínas si no se mantienen las concentraciones de aminoácidos.

40 Además, los aminoácidos esenciales también pueden reducir la resistencia a la insulina. Los aminoácidos esenciales inducen la actividad anabólica indirectamente al impulsar el metabolismo aeróbico celular para producir energía, cuya disponibilidad es indispensable para la síntesis de proteínas. Es particularmente importante en un estado de inflamación sistémica que los aminoácidos esenciales puedan promover la síntesis de proteína muscular mediante la reducción de la citoquina circulante TNF $\alpha$ , reduciéndose así el índice de TNF $\alpha$ /IGF-1.

45 La discrepancia observada aquí entre los niveles normales de aminoácidos esenciales en plasma y el hipercatabolismo muscular sugiere que la complementación crónica de aminoácidos esenciales libres puede ser superior a los aminoácidos esenciales de proteínas en la promoción del anabolismo muscular. De hecho, para que ocurra la síntesis de proteínas musculares, los aumentos rápidos de los niveles de aminoácidos esenciales en plasma después de la ingestión de aminoácidos esenciales son más importantes que la disponibilidad de aminoácidos intramusculares. Esto se debe a que la maquinaria sintética de proteínas en el músculo no responde después de 2,5 horas. La velocidad a la que se alcanzan las concentraciones máximas en sangre es mayor después

de la ingesta de aminoácidos esenciales libres que después de los EAA de la proteína, debido a que la tasa de captación de estos últimos se ve frenada por la presencia conjunta de hidratos de carbono y grasas complejos.

Además, la modulación de la síntesis de proteínas musculares por la elevación de la sangre en los aminoácidos esenciales puede explicar por qué aquí dos grupos de pacientes con accidente cerebrovascular tenían niveles similares de EAA en plasma pero diferentes respuestas del metabolismo de la proteína muscular.

Es imperativo que a los sujetos con accidente cerebrovascular disfágico se les administren cantidades adecuadas de proteína de alta calidad. La ingesta proteica reducida que conduce a niveles bajos de aminoácidos esenciales en la sangre puede contribuir a un aumento drástico de HM.

Los resultados aquí divulgados proporcionan información útil para la práctica clínica ya que se ha demostrado que la composición descrita en la presente memoria puede atenuar el estado sistémico inflamatorio de los pacientes con accidente cerebrovascular, y así convertir el hipercatabolismo en anabolismo, lo que permite una mejor recuperación de la autonomía física de los pacientes.

### **Ejemplo 2**

#### **Materiales y métodos**

**Población.** Cuarenta y dos pacientes con disfagia a consecuencia de accidente cerebrovascular isquémico admitidos consecutivamente en el Instituto de Rehabilitación (Rehabilitación) (Nervi, Genova, Italia) se inscribieron en el plazo de  $37 \pm 12$  días de su evento agudo.

Los pacientes provenían de los siguientes orígenes: unidades de ictus (14,3%), hogares (61,9%), entornos neurológicos (23,8%). Ninguno de los pacientes estaba bajo terapia con esteroides, tenía cáncer, síndrome nefrótico, eventos todos que constituían criterios de exclusión del estudio que afectaban a los reaccionantes de la respuesta de fase aguda.

La topografía de lesión cerebral vascular se determinó mediante obtención de imágenes por tomografía computarizada o resonancia magnética.

Las áreas de accidente cerebrovascular dañadas se clasificaron en relación con la ubicación de la obstrucción isquémica como PACI (infarto parcial de la circulación anterior: 45,2%), TACI (infarto total de la circulación anterior, 30,95%), POCI (infarto de la circulación posterior, 23,8%).

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los participantes o siempre que fuera relevante por parte de sus cuidadores, después de que la naturaleza del estudio hubiera sido completamente explicada. El estudio fue aprobado por los comités científicos y éticos institucionales.

**Procedimientos.** En el plazo de los primeros tres días de ingreso en el Instituto de Rehabilitación, se midieron las siguientes variables de referencia:

a) características antropométricas: peso corporal (PC, kg) encontrado utilizando un levantador de pesas mecánico; altura (m), calculada desde la altura de la rodilla (Chumlea et al., 1985). El índice de masa corporal se calculó como  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ . El PC real fue referido a PC habitual (previo al evento).  $\text{PC Actual/habitual} \leq 95\%$  se consideró una pérdida significativa de PC;

b) variables biohumorales: 1) variables de rutina, incluida la electroforesis de proteínas séricas y la razón de N/Linf de sangre periférica (en el laboratorio, esta proporción en individuos sanos oscila entre 1 y 3); 2) biomarcadores del estado inflamatorio del cuerpo: proteína C-reactiva (CRP, valor normal  $<0,8 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ , determinado por un método inmunoturbidimétrico); tasa de sedimentación eritrocítica (ESR, valor normal 2-20 mm en la primera hora); 3) reaccionantes de fase aguda: proteínas positivas (sistema de globulina  $\alpha$ -1, valores normales  $210\text{-}350 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ ; haptoglobina  $30\text{-}200 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ ; fibrinógeno, valores normales  $230\text{-}550 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ ); proteínas negativas (albúmina, valores normales  $4,02\text{-}4,76 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ ; prealbúmina, valores normales  $18\text{-}30 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$  y transferrina, valores normales  $202\text{-}364 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ );

c) estado funcional: evaluado utilizando la Medida de Independencia Funcional (FIM) como se informó en otros lugares [Keith et al. 1987];

d) disfagia: todos los pacientes ingresaron con un diagnóstico de disfagia. La presencia de disfagia fue controlada por los investigadores utilizando un examen de videofluoroscopia. La severidad de la disfagia se evaluó mediante la Escala de Resultados y Severidad de Disfagia (DOSS), una escala de 7 puntos desarrollada para evaluar sistemáticamente la gravedad funcional de la disfagia [O'Neil et al 1999]. El intervalo de puntuación fue 1-7, donde el nivel 1 indica disfagia severa, el nivel 2 disfagia moderadamente grave, el nivel 3 disfagia moderada, el nivel 4 disfagia leve a moderada, el nivel 5 disfagia leve, el nivel 6 dentro de límites funcionales/independencia modificada y nivel 7 normal en todas las situaciones.

Al ingreso, 21,4% de los pacientes recibían alimentación mediante dieta modificada, mientras que 78,6%

recibían alimentación mediante tubos de gastrostomía endoscópica nasogástrica o percutánea.

**Aleatorización de pacientes** Después de completar estos procedimientos, los pacientes fueron aleatorizados para recibir aminoácidos esenciales (EAA, grupo EAA, n = 21) o placebo (maltodextrina, grupo placebo, n = 21). Se generó una lista de aleatorización utilizando el soporte lógico estadístico SAS (SAS Institute, Cary, NC). A y B fueron los identificadores del tratamiento ciego. La lista estuvo disponible tanto para el médico como para los farmacéuticos del hospital. El médico asignó secuencialmente a los pacientes al tratamiento A o B de acuerdo con la lista de aleatorización. El primer investigador que interpretó todos los resultados fue cegado a la asignación de los pacientes. El grupo experimental (grupo EAA) recibió 8 g/d de EAA (Tabla 2) 4 g por la mañana + 4 g por la tarde diluidos en medio vaso de agua. El grupo placebo recibió una fórmula isocalórica que contenía maltodextrina.

5 En los pacientes con nutrición artificial, se administraron suplementos de placebo o EAA a través del tubo de alimentación. En los sujetos con dieta modificada, los EAA se suministraron en forma de mezcla gelificada.

La duración del tratamiento (EAA o maltodextrina) fue de 35 días. A los  $38 \pm 1$  d del ingreso a la rehabilitación se repitieron todas las variables de a) a d).

15 **Terapia de rehabilitación.** Todos los pacientes siguieron el protocolo de rehabilitación central que consistía en realizar una coordinación de ejercicios de intervalo de movimiento pasivo, activo, y activo-asistido, deambulación asistida con dispositivos o soporte. La duración del tratamiento por el mismo terapeuta fue de 60 minutos por día durante cinco días a la semana. Además, todos los pacientes fueron sometidos a terapia del habla y ocupacional.

**Análisis estadístico.** Se analizaron todas las variables, informando sobre las medias y la desviación típica para las variables cuantitativas y las frecuencias de distribución para las variables cualitativas.

20 La prueba Chi-cuadrado se utilizó para variables categóricas. Posteriormente, la CRP se transformó en valores logarítmicos naturales ( $\ln$  CRP).

En toda la población, las diferencias en las variables entre los valores en el momento inicial y al alta se sometieron a ensayo por medio de una prueba  $t$  de Student pareada.

25 La relación entre los Linf circulantes, la razón N/Linf y la prueba de función neurológica durante la rehabilitación se estudiaron mediante análisis de correlación simple.

La población de pacientes se estratificó en el grupo que mejoró la DOSS en al menos 1 puntuación y el grupo con DOSS estable. Las diferencias en el momento inicial de las variables entre estos grupos fueron evaluadas mediante una prueba  $t$  no pareada. Se utilizó el análisis de varianza de medición repetida para evaluar cualquier diferencia en las tendencias a lo largo del tiempo entre los dos grupos de pacientes.

30 Se realizaron análisis de regresión lineal para señalar las variables con alta asociación con DOSS en los dos subgrupos de pacientes.

Las diferencias en el momento inicial en las variables de los pacientes con EAA y con placebo se sometieron a ensayo mediante una prueba  $t$  no pareada y se utilizó análisis de la varianza de mediciones repetidas para evaluar las diferencias en las tendencias a lo largo del tiempo. Aquí nuevamente, se llevaron a cabo análisis de regresión múltiple lineal para señalar las variables con alta asociación con DOSS.

35

El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

## Resultados

### a) Población de pacientes

40 La Tabla 8 informa sobre las características demográficas, antropométricas, biohumorales, clínicas y neurofuncionales y la ingesta nutricional tanto en el momento inicial como al alta.

En el momento inicial, los pacientes tenían un peso corporal (PC) normal ( $IMC = 23,7 \pm 2,8 \text{ kg/m}^2$ ) pero con una pérdida de peso promedio de 5,3% con respecto al peso corporal antes del accidente cerebrovascular. Los sujetos mostraron pérdidas severas de capacidad física (FIM: -74% del valor normal, en promedio) y capacidad de deglución (promedio de DOSS: -71% en promedio). Se observó disfagia moderada y severa ( $DOSS \leq 3$ ) en 38% de los sujetos. Estuvo presente inflamación sistémica leve (niveles promedio de CRP 2,5 veces más altos que el valor normal). La inflamación se asoció con la reducción de niveles de las proteínas negativas circulantes (albúmina, prealbúmina, transferrina) de la respuesta de fase aguda y con incrementos de las concentraciones séricas de las positivas (sistema de globulina alfa-1, haptoglobulina, fibrinógeno) y con glucosa en sangre en la parte superior límite de los valores normales (Tabla 8).

50 Al alta, el PC disminuyó adicionalmente (disminución promedio: -1,5 kg,  $p < 0,02$ ). Esto fue compatible con mejoras significativas tanto en la discapacidad física (aumento promedio de FIM: +69%,  $p < 0,001$ ) como en la disfagia (aumento promedio del DOSS: puntuación de +1,19;  $p < 0,001$ ). La mejora de la disfagia se observó en 30 pacientes

(71,4%) (16 en sujetos con placebo y 14 con EAA), mientras que se encontró disfagia estable en 28,6% de los pacientes.

5 La inflamación todavía estaba presente pero se asoció con reducción significativa de los niveles séricos del sistema anti-proteasa (alfa-1 globulina de 311 mg·dl<sup>-1</sup> a 282 mg·dl<sup>-1</sup> de promedio; p = 0,031), haptoglobina (p <0,001) y aumento de las concentraciones séricas de proteínas negativas circulantes de la respuesta de fase aguda (Tabla 8). La glucosa plasmática disminuyó significativamente y se normalizó (p = 0,008).

Durante la rehabilitación, los sujetos que mejoraron y aquellos que no mejoraron la disfagia desarrollaron un número similar de episodios de infección (1,8 ± 0,4 vs 1,6 ± 0,5, respectivamente; ns).

**Tabla 8**

Variables	Pacientes con accidente cerebrovascular (n = 42)			
	valores normales	Momento inicial	Alta	nivel de p
<b>Demográficas</b>				
Hombre/Mujer	-	27/15	-	-
Edad (años)	-	71±9	-	-
<b>Antropométricas</b>				
Peso corporal real (kg)	-	65,4±14,2	63,9±13,4	p = 0,02
Peso corporal real/habitual (%)	-	94,7±6,5	92,7±8,9	p = 0,5
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	-	23,7±2,8	23,1±2,9	p = 0,6
<b>Sangre/suero/plasma</b>				
ESR 1ª hr (mm)	2-20	46,7±35,2	38,2±30,6	p = 0,2
Hemoglobina (g/dl)	F> 12; M> 13	12,4±1,9	12,1±1,2	p = 0,24
Urea (mg/dl)	20-40	43,9±29,6	35,9±14,9	p = 0,09
Creatinina (mg/dl)	0,7-1,2	0,95±0,29	0,94±0,25	p = 0,76
Glucosa (mg/dl)	80-110	109±20,5	95±13	p = 0,008
<b>Variables</b>				
Pacientes con accidente cerebrovascular (n = 42)				
	valores normales	Momento inicial	Alta	nivel de p
Proteína C-reactiva (CRP) (mg/dl)	<0,8	2,02±2,4	1,33±2,4	p = 0,17
Fibrinógeno (mg/dl)	230-550	433,2±104	381±80	p = 0,001
Haptoglobina (mg/dl)	30-200	267±131,7	199,7±92,8	p <0,001

$\alpha$ 1 globulina (mg/dl)	210-350	311 $\pm$ 134	282 $\pm$ 116	p = 0,031
Albúmina (g/dl)	4,02-4,76	2,89 $\pm$ 0,52	3,2 $\pm$ 0,46	p <0,001
Prealbúmina (mg/dl)	18-30	17,8 $\pm$ 5,1	19,5 $\pm$ 5,9	p = 0,058
Transferrina (mg/dl)	202-364	178 $\pm$ 32,7	195,5 $\pm$ 35,8	p = 0,001
Glóbulos blancos totales (TWC) (Núm./mm <sup>3</sup> )	4000-9000	7313 $\pm$ 2192	6086 $\pm$ 1632	p = 0,004
Neutrófilos Núm./mm <sup>3</sup>	1800-8000	4909 $\pm$ 1924	3697 $\pm$ 1374	p = 0,001
% TWC	45-75	65,86 $\pm$ 10,6	59,5 $\pm$ 9,3	p <0,001
Linfocitos Núm./mm <sup>3</sup>	700-3700	1505 $\pm$ 538	1688 $\pm$ 557	p = 0,02
% TWC	20-47	21,7 $\pm$ 8,9	28,6 $\pm$ 9,2	p <0,001
Razón de neutrófilos/linfocitos	1,5-3,0*	3,76 $\pm$ 2,07	2,43 $\pm$ 1,3	p <0,001
<b>Función neurológica</b>				
Puntuación FIM	125	33,02 $\pm$ 17,8	55,9 $\pm$ 26,6	p <0,001
Puntuación DOSS	7	2,38 $\pm$ 1,4	3,57 $\pm$ 1,59	p <0,001
<b>Nutrición (PEG o NT **)</b>				
Energía (kcal/d) (kcal/kg)	- $\geq$ 25	1350 $\pm$ 195 20,6 $\pm$ 1,8	1450 $\pm$ 210 22,7 $\pm$ 3,4	p = 0,9 p = 0,08
Proteína (g/d) (g/kg)	- >1,1	63,5 $\pm$ 8,9 0,971 $\pm$ 0,19	62 $\pm$ 10,5 0,97 $\pm$ 0,17	p = 0,2 p = 0,1
Hidratos de carbono (g/d) (g/kg)	- 2,5-4	143 $\pm$ 38 2,2 $\pm$ 0,4	146 $\pm$ 35 2,3 $\pm$ 0,6	p = 0,1 p = 0,2
Lípidos (g/d) (g/kg)	- <1	55,4 $\pm$ 10 0,847 $\pm$ 0,18	56,1 $\pm$ 12 0,88 $\pm$ 0,2	p = 0,15 p = 0,09
Los datos se expresan como media $\pm$ desviación típica (DT), Análisis estadístico: Prueba t de Student pareada, IMC: índice de masa corporal; ESR: Tasa de sedimentación eritrocítica; FIM: medida de independencia funcional; DOSS: Resultado de Disfagia y Escala de Gravedad				

#### b) Recuentos de Linf, N circulantes y razón N/Linf

- 5 La Tabla 8 muestra que, al inicio del estudio, los pacientes tenían recuentos totales normales de glóbulos blancos (TWC), Linf y N, a pesar de la inflamación sistémica. Sin embargo, la razón N/Linf resultó mayor (3,76  $\pm$  2,07) que el valor normal del laboratorio de los autores de la presente invención ( $\leq$ 3).

10 En el momento del alta, se encontraron reducciones significativas de los recuentos en el momento inicial de TWC (p = 0,004) y N (p = 0,001) mientras que el recuento de Linf aumentó (p = 0,02). Por lo tanto, la razón N/Linf disminuyó significativamente a 2,43  $\pm$  1,3 (p <0,001) y se normalizó,

**c) Relaciones entre Linf circulantes, la razón N/Linf y las pruebas de función neurológica durante la rehabilitación**

Los recuentos de Linf absolutos y el % de Linf se correlacionaron positivamente con DOSS ( $r = +0,235$ ,  $p = 0,04$  y  $r = +0,224$ ,  $p = 0,05$ , respectivamente) y negativamente con el marcador de inflamación en CRP ( $r = -0,265$ ,  $p = 0,02$  y  $r = -0,484$ ,  $p = 0,0001$  respectivamente). Los recuentos de N se relacionaron positivamente con ln CRP ( $r = +0,37$ ,  $p = 0,001$ ) y mostraron una ligera asociación negativa con la capacidad física (FIM,  $r = -0,20$ ,  $p = 0,07$ ). No se encontró correlación entre N y DOSS. Los Linf y N tuvieron una correlación fuertemente negativa ( $r = -0,926$ ,  $p < 0,001$ ). La razón N/Linf estaba en relación inversa con la capacidad física ( $r = -0,262$ ,  $p = 0,02$ ) y la capacidad de deglución ( $r = -0,279$ ,  $p = 0,01$ ) pero se asoció positivamente con ln CRP ( $r = +0,514$ ,  $p = 0,0001$ ). Los resultados muestran una correlación positiva entre FIM y DOSS ( $r = +0,78$ ,  $p < 0,0001$ ).

Para entender mejor la relación entre los cambios a lo largo del tiempo de las células inmunitarias circulantes y la disfagia, se estratificó toda la población de accidente cerebrovascular en un primer grupo que, después de la Rehabilitación, exhibió mejora de la disfagia ( $n = 30$  sujetos) y en un segundo grupo en el que no mejoraba la disfagia ( $n = 12$  sujetos). La Tabla 9 muestra los cambios de algunas variables entre sujetos con disfagia mejorada y no mejorada,

Estas variables se sometieron a ensayo simultáneamente en un modelo de regresión logística que finalmente mostró que solo el % de Linf se asoció significativamente con una mejor capacidad de deglución ( $p = 0,01$ ). En línea con este hallazgo, los cambios a lo largo del tiempo del % de Linf y DOSS se correlacionaron positivamente ( $p = 0,015$ , Figura 3, panel a),

**Tabla 9**

Variables	Cambios de la disfagia a lo largo del tiempo		valor p
	Mejora n = 30	Sin mejora n = 12	
Linfocitos (% TWC)	+10,35 ± 11,55	-2,1 ± 12,69	0,004
ESR 1ª hr (mm)	-14,26 ± 45,92	+19,27 ± 28,79	0,033
Proteína C-reactiva (CRP) (mg/dl)	-1,22 ± 2,9	+0,61 ± 2,29	0,05
Prealbúmina (mg/dl)	+2,22 ± 7,49	-3,17 ± 8,07	0,05
Puntuación FIM	+26,7 ± 19,84	+13,17 ± 15,56	0,04

**d) Efectos de la complementación con EAA sobre los Linf y la disfagia**

Al inicio del estudio, los grupos con EAA y placebo fueron similares para todas las variables consideradas, excepto por las concentraciones séricas de alfa-1 globulina más altas en el grupo placebo que en el grupo con EAA ( $p < 0,02$ ) (Tabla 10). Durante el período de rehabilitación, los cambios a lo largo del tiempo de todas las variables consideradas (Tabla 11) resultaron similares entre los dos grupos de pacientes excepto la alfa-1 globulina que disminuyó en pacientes con placebo (interacción  $p = 0,01$ ) y para la razón N/Linf cuya disminución fue más pronunciada en el grupo con EAA (interacción  $p = 0,04$ ).

**Tabla 10**

Variables	Placebo	EAA	valor p
Peso corporal real (kg)	65,63±15,61	65,17±13,39	1,0
ESR 1ª hr (mm)	59,88±32,0	38,54±35,7	0,08
Hemoglobina (g/dl)	12,32±1,61	12,41±2,07	1,0
Urea (mg/dl)	42,9±24,8	44,78±33,97	0,9

ES 2 651 903 T3

<b>Variables</b>	<b>Placebo</b>	<b>EAA</b>	<b>valor p</b>
Creatinina (mg/dl)	0,89±0,31	0,99±0,28	0,7
Glucosa (mg/dl)	108,3±17,3	110,3±23,4	0,8
Proteína C-reactiva (CRP) (mg/dl)	2,21±2,66	1,86±2,23	0,4
ln (CRP)	0,28±1,09	-0,10±1,23	0,6
Fibrinógeno (mg/dl)	467,1±121,5	405,75±81,01	0,5
Haptoglobina (mg/dl)	306±138,8	237,6±121,28	0,4
α1 globulina (mg/dl)	373,3±143,6	244,5±87,4	0,02
Albúmina (g/dl)	2,83±0,39	2,93±0,62	0,8
Prealbúmina (mg/dl)	17,5±6,3	18,04±4,29	0,9
Transferrina (mg/dl)	181,1±27,99	176,0±36,57	0,8
Glóbulos blancos totales (TWC) (Núm./mm <sup>3</sup> )	7664,3±1814,5	7033,5±2464,4	0,4
Neutrófilos (% TWC)	66,8±6,9	65,09±13,08	0,8
Linfocitos (% TWC)	20,1±5,8	23,11±10,89	0,7
Relación de neutrófilos/Linf	3,68±1,45	3,82±1,2	0,9
Puntuación DOSS	2,53±1,39	2,26±1,48	0,8
Puntuación FIM	32,58±15,98	33,39±19,46	0,9

**Tabla 11**

<b>Variables</b>	<b>valores normales</b>	<b>Placebo</b>		<b>EAA</b>		<b>nivel p</b>
		<b>Momento inicial</b>	<b>Alta</b>	<b>Momento inicial</b>	<b>Alta</b>	
<b>Demográficas</b>						
Hombre/Mujer	-	15/6	-	12/9	-	-
Edad (años)	-	73,5±8,6	-	67,5±10,5		-
<b>Antropométricas</b>						
Peso corporal real (kg)	-	65,63±15,61	64,1±15,1	65,17±13,39	63,83±12,14	p = 0,2
Peso corporal real/habitual (%)	-	93,8±7,5	93,6±9	95,9±5,8	92,9±8,9	p = 0,3

ES 2 651 903 T3

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	-	24,8±3,2	23,2±3	22,7±2,6	23,1±2,9	p=0,2
<b>Sangre/suero/plasma</b>						
ESR 1ª hr (mm)	2-20	59,88±32,0	39,7±26,5	38,54±35,7	37,18±33,9	p=0,2
Hemoglobina (g/dl)	F> 12; M> 13	12,32±1,61	12,1±0,98	12,41±2,07	12,03±1,35	p = 0,9
Urea (mg/dl)	20-40	42,9±24,8	34,4±13,2	44,78±33,97	37,17±16,46	p = 0,8
Creatinina (mg/dl)	0,7-1,2	0,89±0,31	0,95±0,28	0,99±0,28	0,93±0,23	p = 0,09
Glucosa (mg/dl)	80-110	108,3±17,3	97,7±4,1	110,3±23,4	93,1±12,11	p = 0,5
Proteína C-reactiva (CRP) (mg/dl)	<0,3	2,21±2,66	1,28±2,12	1,86±2,23	1,37±2,74	p = 0,7
In CRAP		0,28±1,09	-0,62±1,32	-0,10±1,23	-0,78±1,25	p = 0,7
Fibrinógeno (mg/dl)	230-550	467,1±121,5	392,1±74,5	405,75±81,01	372,38±85,85	p = 0,8
Haptoglobina (mg/dl)	30-200	306±138,8	233,7±90,5	237,6±121,28	174,2±88,24	p = 0,6
α1 globulina (mg/dl)	210-350	373,3±143,6	314,2±133	244,5±87,4	247,3±87,9	p = 0,01
Albúmina (g/dl)	4,02-4,76	2,83±0,39	3,18±0,39	2,93±0,62	3,28±0,52	p = 0,6
Prealbúmina (mg/dl)	18-30	17,5±6,3	18,6±5,1	18,04±4,29	20,3±6,3	p = 0,8
Transferrina (mg/dl)	202-364	181,1±27,99	195,5±33,5	176,0±36,57	195,56±38,51	p = 0,9
Glóbulos blancos totales (TWC) (Núm./mm <sup>3</sup> )	4000-9000	7664,3±1814,5	6404,4±1446,1	7033,5±2464,4	5832,5±1762,6	p = 0,3
Neutrófilos						
Núm./mm <sup>3</sup>	1800-8000	5182,95±1605,1	3979,99±1359,4	4678,79±2174,35	3459,08±1377,34	p = 0,5
% TWC)	45-75	66,8±6,9	61,3±8,4	65,09±13,08	57,92±9,97	p = 0,7
<b>Variables</b>		<b>Placebo</b>	<b>EAA</b>			
	<b>valores normales</b>	<b>Momento inicial</b>	<b>Alta</b>	<b>Momento inicial</b>	<b>Alta</b>	<b>nivel p</b>
Linfocitos						
Núm./mm <sup>3</sup>	700-3700	1502,98±485,5	1702,88±504,44	1506,83±592,31	1675,71±612,61	p = 0,7
% TWC	20-47	20,1±5,8	27,3±8,0	23,11±10,89	29,67±10,1	p = 0,6
Razón de neutrófilos/Linf	1,5-3,1	3,68±1,45	2,60±1,46	3,82±1,2	2,30±1,18	p = 0,04
<b>Función neurológica</b>						

Puntuación FIM	125	32,58±15,98	57,37±29,34	33,39±19,46	54,65±24,81	p = 0,8
Puntuación DOSS	7	2,53±1,39	4,05±1,39	2,26±1,48	3,17±1,66	p = 0,1
<b>Nutrición</b>						
Energía (kcal/d) (kcal/kg)	- ≥25	1405±205 21,3±2,1	1557±206 24,4±3,9	1355±189 20,6±1,5	1472±215 23,0±3,05	p = 0,9 p = 0,9
Proteína (g/d) (g/kg)	- >1,1	62±7,9 0,942±0,2	61,5±8,5 0,964±0,19	64,9±9,1 0,99±0,18	62,8±11,4 0,98±0,16	p = 0,8 p = 0,7
Hidratos de carbono (g/d) (g/kg)	- 2,5-4	150±41 2,28±0,5	148±39 2,32±0,7	138±35 2,1±0,3	149,5±31,1 2,33±0,5	p = 0,2 p = 0,8
Lípidos (g/d) (g/kg)	- <1	50,7±8,5 0,77±0,2	51,5±10,9 0,81±0,19	60,1±11,3 0,916±0,16	60,5±12,8 0,944±0,21	p = 0,5 p = 0,7
Los valores se expresan como media ± desviación típica. Análisis estadístico: Análisis de varianza de medidas repetidas. Sólo se informa sobre el nivel p del término de interacción (tiempo *tratamiento). Nivel de significación establecido en p <0,05						

5 En ambos grupos, las mejoras de la disfagia se relacionaron positivamente con las mejoras en % de Linf (Figura 3, paneles b y c), pero la asociación fue más evidente en el grupo con EAA lo que sugiere que la asociación observada en toda la población de accidente cerebrovascular (Figura 3, panel a) se atribuye principalmente al tratamiento con EAA.

10 El estudio muestra que durante la etapa subaguda del accidente cerebrovascular isquémico, los pacientes que ingresaron en el Instituto de Rehabilitación tenían recuentos de Linf y de N en la sangre periférica normales, pero una razón N/Linf alta. Después de la rehabilitación, la razón N/Linf se normalizó debido a la disminución del recuento de N y al aumento del recuento de Linf. Además, el estudio muestra que el aumento del % de Linf en sangre periférica se asocia significativamente con una mejoría en la disfagia y que esta relación se potencia al complementar los aminoácidos esenciales (EAA) a los pacientes.

**1) Recuentos de Linf y N circulantes, razón N/Linf**

El estudio indica un perfil normal de recuentos de glóbulos blancos totales en sangre, Linf y N con un leve aumento de la razón N/Linf.

15 Durante la rehabilitación se produjo un descenso de la tasa de inflamación aguda posterior con un impacto positivo en el estado clínico-metabólico del paciente. De hecho, la reducción en la razón N/Linf se asoció con mejoras del paciente en discapacidades físicas y de deglución, en niveles circulantes de las proteínas negativas de la respuesta de fase aguda, que pueden influir en la reparación cerebral. Además, mejoró la concentración de glucosa en plasma de los pacientes, lo que indica una reducción del estado de resistencia a la insulina.

20 El perfil sanguíneo de las células inmunitarias durante el accidente cerebrovascular subagudo es el opuesto al descrito en la fase aguda o inmediatamente post-aguda de la isquemia cerebral. En la isquemia aguda, el recuento total de Linf y N aumenta y el recuento de Linf disminuye y pocos días después del accidente cerebrovascular, se produce la inhibición de la proliferación/actividad de los Linf por el efecto supresor del sistema nervioso autónomo activado en exceso en el bazo y los ganglios linfáticos y la actividad inhibitoria directa ejercida por los N en los Linf.

25 A diferencia de la etapa aguda del accidente cerebrovascular en la que la reducción del sistema inmunológico adaptativo es beneficiosa para los pacientes, durante el accidente cerebrovascular subagudo la mejora del sistema inmunológico adaptativo no solo no es perjudicial sino que también puede fomentar la neurorregeneración. Los hallazgos del presente estudio documentan que la restauración de la función del sistema inmunitario estuvo acompañada de una mejoría en la FIM tanto en pacientes con accidente cerebrovascular como con lesión de la médula espinal.

30

Es posible que el aumento de los Linf circulante observado en pacientes subagudos pueda deberse a la reducción de la producción de corticosteroides después de una reducción de la tasa de inflamación, ya que los niveles elevados de corticosteroides (y metanefrina) se asocian con linfopenia después de un infarto cerebral masivo. Los linfocitos expresan más receptores de glucocorticoides que los granulocitos y los monocitos. El bloqueo de estos

receptores previene la linfopenia. Aunque los niveles circulantes de corticosteroides no se determinaron en el estudio actual, la normalización de la glucemia durante la rehabilitación, que indica una resistencia reducida a la insulina, sugiere una reducción de la producción de corticosteroides. Al igual que en la isquemia aguda, los N influyen en la gravedad del accidente cerebrovascular, la disminución de los N durante la rehabilitación podría favorecer los procesos de neuroreparación y neuroregeneración. En el presente estudio, esto es sugerido indirectamente por la correlación negativa encontrada entre la razón N/Linf y la recuperación de las discapacidades físicas (FIM) y la deglución (DOSS). Esto sugiere que cuanto menor es la inflamación, mayor es la capacidad de deglución.

Incluso si los sistemas inmunológicos innato y adaptativo cooperan mutuamente para asegurar la mejor respuesta inmunológica después de la inflamación inducida por isquemia cerebral, los Ns y los Linf se correlacionan inversamente porque los Ns pueden inhibir el número y la actividad de los Linf.

En síntesis, el estudio sugiere que durante la accidente cerebrovascular subagudo la inmunidad adaptativa puede ser predominante en el sistema inmunológico innato y puede asociarse con la recuperación de la función neurológica del paciente, mientras que la persistencia de una mayor tasa de inflamación puede ser perjudicial para la recuperación de la deglución.

**2) Complementación con EAA y la relación entre el sistema inmunológico adaptativo y la función neurológica**

El estudio muestra que los EAA se asocian con una reducción significativa de la razón N/Linf en sangre y una mejora de la relación entre los ciclos de tiempo mejorados de % Linf y DOSS. Por lo tanto, los EAA influyen tanto en la inmunidad sanguínea como en los procesos de neuroreparación. Dada la actividad metabólica de los EAA, estos sustratos promueven estos procesos en virtud de varios mecanismos.

En primer lugar, los EAA pueden inducir directamente la síntesis de proteínas en las células inmunológicas para la proliferación y duplicación de Linf.

Cuando los N prevalecen sobre los Linf, como en la isquemia aguda y en la fase de ingreso de los pacientes a la rehabilitación, la actividad fagocítica de los N circulantes puede tener un impacto negativo en la recuperación de la deglución. En el presente estudio, esto se destaca por la correlación negativa encontrada entre la razón N/Linf y la capacidad de deglución. Por lo tanto, el estudio sugiere que los EAA cambian el perfil de inmunidad a favor de la inmunidad adaptativa sobre el patrón inflamatorio.

En segundo lugar, la síntesis de proteínas inducida por EAA mejora directamente la capacidad de deglución al afectar los mecanismos subyacentes a la deglución normal tales como la actividad interneuronal y/o el centro de deglución y/o la función neuromuscular periférica de la deglución.

En tercer lugar, el estado anabólico corporal inducido por EAA es de suma importancia para la remodelación y la función del cerebro. En el estudio, el estado anabólico mejorado, a pesar de una ligera pérdida del peso corporal inicial, se denotó por la restauración de la síntesis hepática de las proteínas negativas de la respuesta de fase aguda, tales como albúmina, transferrina y prealbúmina. Obsérvese que estas proteínas *per se* puede desempeñar un papel en la reparación/regeneración del cerebro y la reactivación de redes neuronales.

El estudio muestra que más de 28% de los pacientes no mejoraron la disfagia durante la rehabilitación. Esto podría deberse a la ausencia de excitabilidad cortical en el hemisferio no dañado. Esta hipótesis se basa en lo siguiente: 1) la musculatura de deglución de está representada en cada hemisferio pero con marcada asimetría interhemisférica; 2) la aparición de disfagia está relacionada con el tamaño de la proyección faríngea en el hemisferio intacto.

El estudio muestra que las capacidades físicas (FIM) y de deglución (DOSS) están interrelacionadas. El hecho de que en el análisis de regresión logística, el resultado de disfagia se asociara principalmente con % de Linf y no con FIM sugiere que la mejora en la disfagia depende no solo de la mejora general de las redes neuronales, como en individuos con placebo, sino que también está mediada por aumento actividad del sistema inmunológico adaptativo en la remodelación cerebral, como en pacientes con EAA.

Además, los datos experimentales resaltan la presencia de una correlación positiva entre el valor de la razón N/Linf y la concentración de EAA en la sangre arterial, principalmente los aminoácidos esenciales ramificados (leucina, isoleucina y valina).

Por el contrario, las correlaciones entre el valor de la razón N/Linf y la concentración total de aminoácidos en la sangre arterial, así como la correlación entre el valor de la razón N/Linf y la concentración total de aminoácidos en la sangre venosa no son significativas .

La explicación fisiopatológica de lo anterior radica en el hecho de que cuanto mayores son los procesos inflamatorios (alta razón N/Linf) mayor es el recambio de proteínas multidistributales (se sintetizan altas cantidades de mediadores proteicos de la inflamación, por ejemplo, citoquinas) y por lo tanto el mayor es la necesidad de tener una concentración adecuada, especialmente de aminoácidos esenciales en el torrente sanguíneo arterial sistémico, para la síntesis de proteínas, mientras que la sangre venosa refleja el flujo del catabolismo muscular.

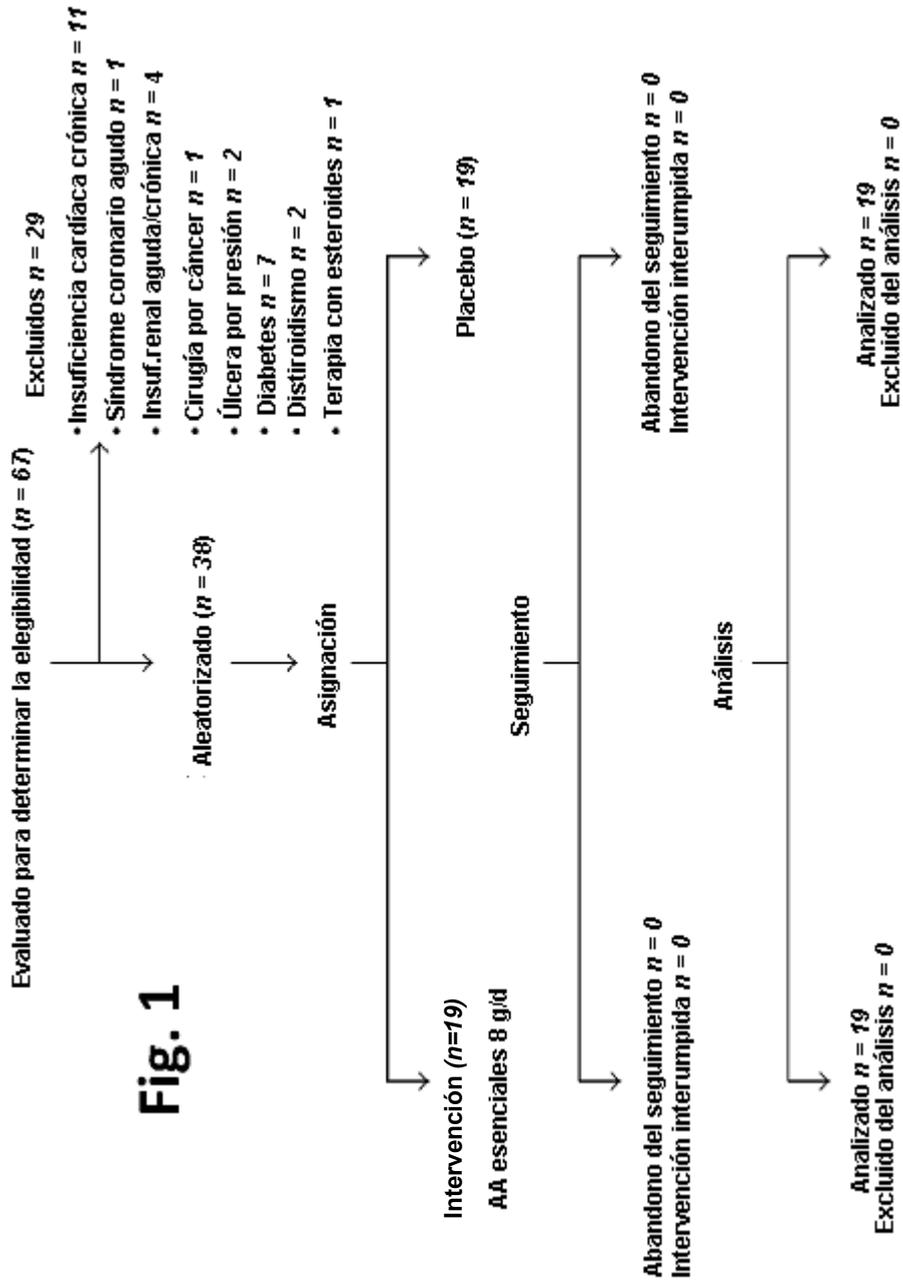
**REFERENCIAS**

1. R. Aquilani, M. Boselli, P. Baiardi, et al., "Is stroke rehabilitation a metabolic problem?" *Brain Inj*, vol. 28, núm. 2, pág. 161-173, 2014.
- 5 2. R. Aquilani, M. T. La Rovere, O. Febo, et al., "Preserved muscle protein metabolism in obese patients with chronic heart failure" *Int J Cardiol*, vol. 160, núm. 2, pág. 102-108, 2012.
3. Z. Liu y E. J. Barrett, "Human protein metabolism: its measurement and regulation" *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 283, núm. 6, pág. E1105-E1112, 2002.
4. W. C. Chumlea, A. F. Roche, y M. L. Steinbaugh, "Estimating stature from knee height for persons 60 to 90 years of age" *J Am Geriatr Soc*, vol. 33, núm. 2, pág. 116-120, 1985.
- 10 5. R. A. Keith, C. V. Granger, B. B. Hamilton, y F. S. Sherwin, "The functional independence measure: a new tool for rehabilitation" En: M. G. Eisenberg, R. C. Grzesiak, eds. *Advances in Clinical Rehabilitation*, Vol. I. New York: Springer-Verlag, pág. 6-18, 1987.
6. K. H. O'Neil, M. Purdy, J. Falk, y L. Gallo, "The Dysphagia Outcome and Severity Scale" *Dysphagia*, vol. 14, núm. 3, pág. 139-145, 1999.
- 15 7. E. Carnevale y L. Marletta. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, INRAN. *Tabelle di composizione degli alimenti*. Roma, Italia: Istituto Superiore Nazionale della Nutrizione; 1989.
8. R. Aquilani, R. Tramarin, R. F. Pedretti, et al., "Despite good compliance, very low fat diet alone does not achieve recommended cholesterol goals in outpatients with coronary heart disease" *Eur Heart J*, vol. 20, núm. 14, pág. 1020-1029, 1999.

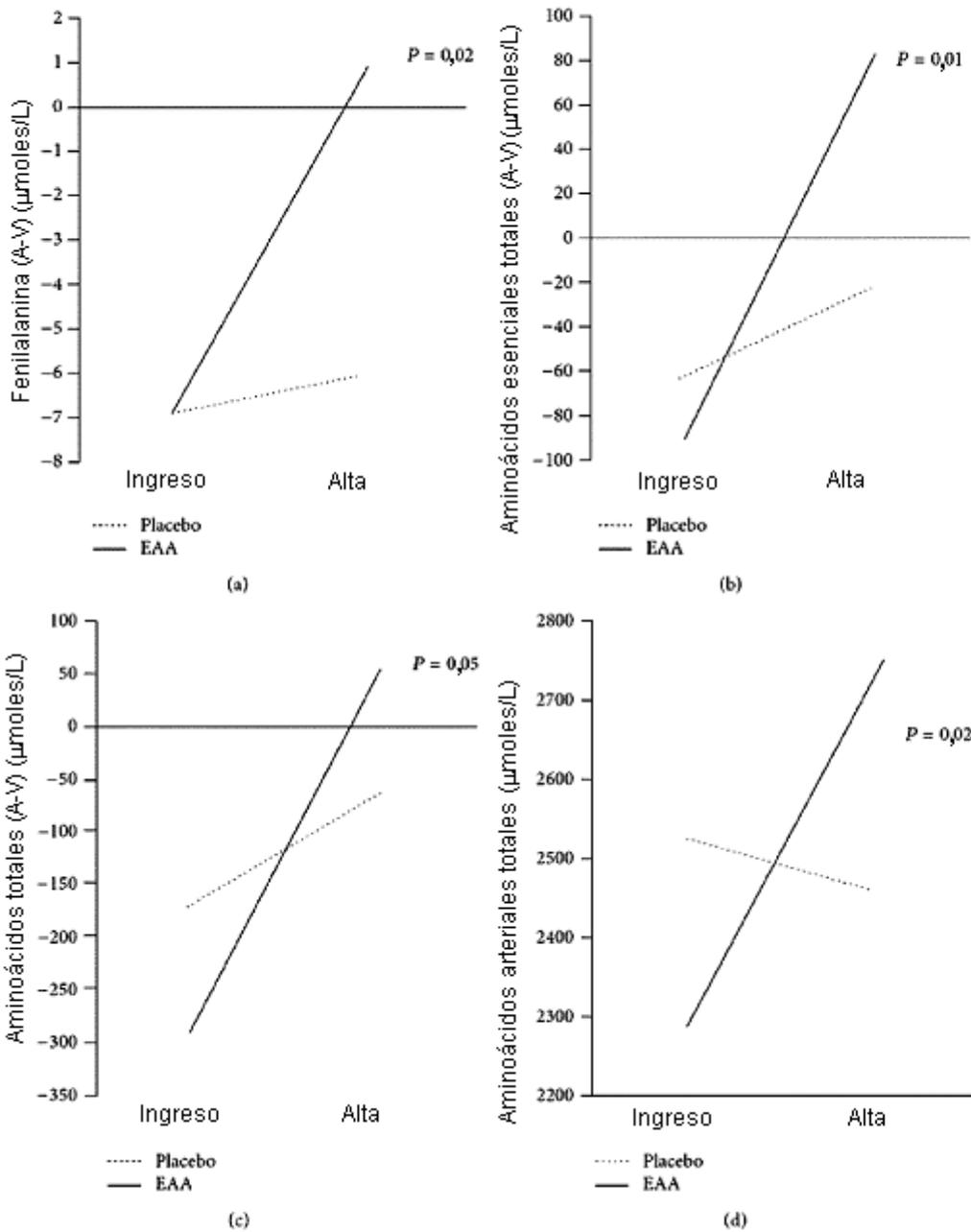
20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de un estado de inflamación sistémica en pacientes con accidente cerebrovascular con disfagia, comprendiendo la composición un agente activo, consistiendo dicho agente activo en los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina,  
comprendiendo la composición uno o más agentes espesantes en una cantidad entre 10% y 50% en peso, más preferiblemente entre 20% y 30% en peso, con respecto al peso de agente activo.
- 10 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los agentes espesantes se seleccionan entre goma de xantano, metilhidroxipropilcelulosa, goma konjak, glucomanano konjak, goma Arábica (goma de Acacia), almidones modificados.
3. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la razón en peso de leucina:isoleucina: valina es equivalente a 2:1:1.
- 15 4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde  
- la razón en peso de isoleucina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,2-0,7, preferiblemente entre 0,4-0,6, y/o  
- la razón en peso de valina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,2-0,8, preferiblemente entre 0,4-0,7.
- 20 5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde  
- la razón en peso de treonina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,15-0,50, preferiblemente entre 0,20-0,45, y/o  
- la razón en peso de lisina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,15-0,60, preferiblemente entre 0,30-0,55.
- 25 6. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agente activo está libre de arginina.
7. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agente activo está libre de serina, prolina, glicina, alanina, ácido glutámico.
8. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende adicionalmente una o más vitaminas, seleccionadas preferiblemente del grupo de las vitaminas B, tales como vitamina B<sub>1</sub> y/o vitamina B<sub>6</sub>.
- 30 9. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende adicionalmente hidratos de carbono, aditivos y/o sustancias aromatizantes.
- 35 10. Una composición para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio sistémico en pacientes con accidente cerebrovascular, comprendiendo la composición un agente activo, consistiendo dicho agente activo en los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cistina.

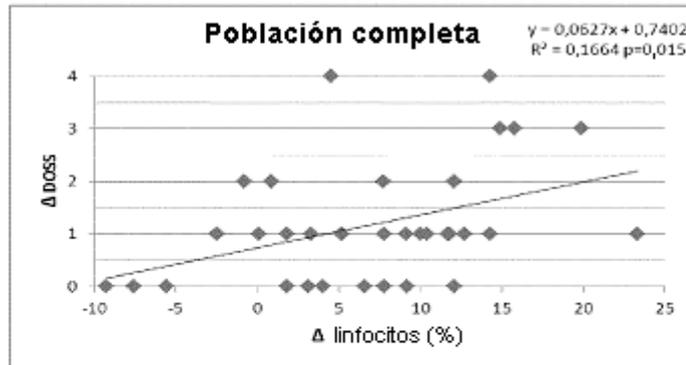


**Fig. 2**

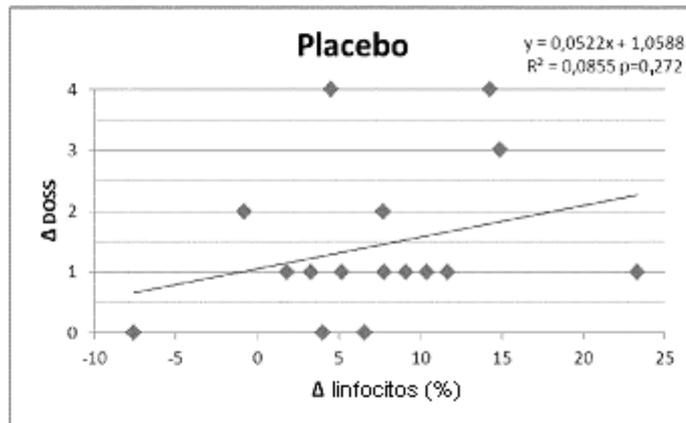


**Fig. 3**

a)



b)



c)

