

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 525**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/225** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A23L 29/00** (2006.01)

**A23L 33/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2007** **E 15175719 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020** **EP 3009135**

54 Título: **Precursor de propionil coenzima A para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina**

30 Prioridad:

**04.12.2006 EP 06291873**

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

**10.08.2020**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (100.0%)**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DÜRR, ALEXANDRA y**  
**MOCHÉL, FANNY**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 778 525 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Precursor de propionil coenzima A para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al tratamiento y la prevención de la enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina.

Antecedentes de la invención

- 10 La enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria devastadora sin tratamiento curativo. HD es el miembro fundador de un gran grupo de enfermedades debido a la acumulación y toxicidad de poliglutamina. Existe una necesidad crítica de nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de esta enfermedad, así como para la identificación de moléculas relevantes para ensayos clínicos.

- 15 Varias observaciones han llevado a la hipótesis de que la disfunción mitocondrial tiene un papel en las enfermedades de poliglutamina, y en particular en la enfermedad de Huntington. Varias líneas de evidencia indican un metabolismo energético anormal, que incluye un metabolismo de glucosa reducido, niveles elevados de lactato y actividad del complejo mitocondrial deteriorada (Di Prospero and Fischbeck 2005, Nat Rev Genet 6 (10): 756-65). Para explicar este metabolismo energético anormal, la mayoría de los estudios favorecieron un deterioro secundario de la cadena respiratoria mitocondrial. Se ha demostrado una disminución importante en los complejos II y III (55%) en el caudado de pacientes con HD (Gu 1996, Ann Neurol 39: 385-9), así como una deficiencia en el complejo I en el músculo (Arenas 1998, Ann Neurol 43: 397-400), por lo tanto, apoya la posibilidad de defectos de la cadena respiratoria mitocondrial en la patogénesis de la HD (Shapira 1998, Biochem Biophys Acta 1366: 225-33, Grunewald 1999, Ann N Y Acad Sci 893: 203-13). Estos hallazgos se correlacionaron con los modelos de HD inducidos por el ácido 3-nitropropiónico, un inhibidor irreversible del complejo II (Beal 1993, J Neurosci 13: 4181-92). Sin embargo, estos datos son controvertidos por la demostración de complejos normales de transporte de electrones mitocondriales en ratones transgénicos en una etapa temprana (Guidetty 2001, Exp Neurol 169: 340-50), así como en células estriatales en cultivo que expresan huntingtina mutante, a pesar de la reducción significativa en la síntesis de ATP observada en esas células (Milakovic 2005, JBC 280: 30773-82). La evidencia indirecta adicional de un defecto de energía en las enfermedades con poliglutamina surge de la eficacia parcial de las terapias energéticas, tales como dicloroacetato (Andreassen 2001, Ann Neurol 50: 112-9), piruvato (Ryu 2004, Exp Neurol 187: 150-9), creatina (Ferrante 2000, J Neurosci 20: 4389-97) y coenzima Q10 (Schilling 2001, Neurosci Lett 315: 149-53) en modelos de ratones.

Otro documento relevante de la técnica anterior es US6835750B1.

Sin embargo, hasta la fecha, la farmacoterapia eficaz para las enfermedades neurodegenerativas asociadas con el metabolismo energético deteriorado, como las enfermedades con poliglutamina en particular, sigue siendo bastante difícil de alcanzar.

- 35 Resumen de la invención

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un compuesto para su uso en un método para tratar y/o prevenir la enfermedad de poliglutamina tal como la enfermedad de Huntington.

- 40 Para cumplir este objetivo, se proporciona un precursor de propionil-CoA que contiene un ácido graso de cadena media impar para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad de poliglutamina, en el que el método comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de dicho precursor de propionil-CoA a un individuo que lo necesite.

También se proporciona el uso de un precursor de propionil-CoA que contiene un ácido graso de cadena media impar en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir la enfermedad de poliglutamina.

Descripción detallada de la invención

- 45 La presente invención proporciona un precursor de propionil-CoA que contiene un ácido graso de cadena media impar para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad de poliglutamina, en el que el método comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de dicho precursor de propionil-CoA a un individuo que lo necesite.

Por individuo, se entiende animal o ser humano.

- 50 También se proporciona un precursor de propionil-CoA que contiene un ácido graso de cadena media impar para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad de poliglutamina.

También se proporciona el uso de un precursor de propionil-CoA que contiene un ácido graso de cadena media impar en la fabricación de un medicamento y/o una sustancia alimenticia para tratar y/o prevenir una enfermedad de poliglutamina.

5 Las enfermedades de poliglutamina constituyen una clase de nueve trastornos genéticamente distintos que son causados por la expansión de la repetición de CAG traducida. Estos incluyen la enfermedad de Huntington (HD), la atrofia dentatorubral pallidoluisiana (DRPLA), la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA) y la ataxia espinocerebelosa 1, 2, 3, 6, 7 y 17. Aunque las proteínas que causan la enfermedad se expresan ampliamente en el sistema nervioso central, las poblaciones específicas de neuronas son vulnerables en cada enfermedad, lo que resulta en patrones característicos de neurodegeneración y características clínicas.

10 En una realización de la presente invención, la enfermedad de poliglutamina se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Huntington (HD), atrofia dentatorubralpallidoluisiana (DRPLA), atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), ataxia espinocerebelosa 1, 2, 3, 6, 7 y 17.

En una realización preferida de la presente invención, la enfermedad de poliglutamina es la enfermedad de Huntington.

15 Por precursor del propionil-CoA, se entiende una sustancia a partir de la cual el propionil-CoA puede formarse por una o más reacciones metabólicas que tienen lugar dentro del cuerpo.

20 Los ejemplos de precursores de propionil-CoA se muestran en la figura 5. Ejemplos típicos de precursores de propionil-CoA son ácidos grasos de cadena media impar, en particular ácido graso de siete carbonos, triheptanoína (triheptanoil-glicerol), heptanoato, Cuerpos cetónicos C5 (por ejemplo, B-cetopentanoato (3-cetovalerato) y  $\beta$ -hidroxipentanoato (3-hidroxivalerato)) (Kinman 2006, Am J Physiol Endocrinol Metab 291 (4): E860-6, Brunengraber and Roe 2006, J Inherit Metabol Dis 29 (2-3): 327-31).

Los ejemplos de precursores de propionil-CoA descritos anteriormente incluyen los propios compuestos, así como sus sales, profármacos, solvatos, si corresponde.

25 Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres, oligómeros de hidroxialcanoato tales como oligo (3-hidroxivalerato) (Seebach 1999, Int J Biol Macromol 25 (1-3): 217-36) y otros derivados farmacéuticamente aceptables que, tras la administración a un individuo, son capaces de proporcionar propionil-CoA. Un solvato se refiere a un complejo formado entre un precursor de propionil-CoA descrito anteriormente y un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de solventes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, etanol, isopropanol, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

30 Una fuente dietética muy práctica de propionil-CoA es la triheptanoína (triheptanoil-glicerol). Después de la hidrólisis intestinal de triheptanoína, el heptanoato se absorbe en la vena porta. En el hígado, se convierte parcialmente en los cuerpos cetónicos C5  $\beta$ -cetopentanoato (3-cetovalerato) y  $\beta$ -hidroxipentanoato (3-hidroxivalerato). Los cuerpos cetónicos de C5 también son precursores de propionil-CoA en tejidos periféricos. Así, después de la ingestión de triheptanoína, los tejidos periféricos reciben dos precursores de propionil-CoA, es decir, cuerpos de heptanoato y C5-cetona. Curiosamente, C5-, como C4-, los cuerpos cetónicos son sustratos naturales para el cerebro y pueden atacar receptores fisiológicos en la membrana superficial de la barrera hematoencefálica. La demostración del transporte de cuerpos cetónicos C5 a través de la barrera hematoencefálica fue proporcionada recientemente por el tratamiento de un paciente con deficiencia de piruvato carboxilasa, donde la anaplerosis cerebral se ve afectada principalmente (Mochel 2005, Mol Genet Metab 84: 305-12). La disponibilidad de cuerpos cetónicos C5 para la anaplerosis cerebral también se demostró mediante la normalización de glutamina y GABA en el CSF de este paciente, así como la ausencia de patología cerebral.

45 El experto en la materia conoce los métodos estándar para la producción de precursores de propionil-CoA. En una realización preferida de la presente invención, el precursor de propionil-CoA es triheptanoína, ácido heptanoico o heptanoato. La triheptanoína ya se ha utilizado en el tratamiento anaplerótico de algunas patologías que tienen en común una disminución en la producción de ATP a pesar del amplio suministro de acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico (CAC) y una cadena respiratoria normal. Dichas patologías incluyen lesión por reperfusión cardíaca (Reszko 2003, JBC 278: 34959-65), trastornos de oxidación de ácidos grasos de cadena larga (FOD) (Roe 2002, JCI 110: 259-69 y WO 0045649), deficiencia de piruvato carboxilasa (Mochel 2005, Mol Genet Metab 84: 305-12) y enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II (Roe y Mochel 2006, J Inherit Metab Dis 29 (2-3): 332-40).

50 La triheptanoína es un triglicérido producido por la esterificación de tres moléculas de ácido n-heptanoico y glicerol. Con respecto a la terapia, los términos ácido heptanoico, heptanoato y triheptanoína pueden usarse indistintamente en la siguiente descripción. Además, un experto en la materia entenderá que el ácido heptanoico, el heptanoato y la triheptanoína son precursores ejemplares de propionil-CoA de la invención. Se puede usar heptanoato sustituido, insaturado o ramificado, así como otros ácidos grasos de siete carbonos modificados sin apartarse del alcance de la invención.

55

El ácido heptanoico se encuentra en varios aceites de fusel en cantidades apreciables y puede extraerse por cualquier medio conocido en la técnica. También se puede sintetizar por oxidación de heptaldehído con permanganato de potasio en ácido sulfúrico diluido (Ruhoff, Org Syn Coll. Vol III, 315 (1943)). El ácido heptanoico también está disponible comercialmente a través de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

- 5 La triheptanoína se puede obtener por esterificación del ácido heptanoico y el glicerol por cualquier medio conocido en la técnica. Triheptanoín también está disponible comercialmente a través de CondeaChemie GmbH (Witten, Alemania) como Special Oil 107.

10 El heptanoato insaturado también se puede utilizar en la presente invención. Además, se pueden utilizar en la presente invención ácidos grasos de siete carbonos sustituidos, insaturados y/o ramificados que entran fácilmente en la mitocondria sin enzimas de transporte especiales. Por ejemplo, el 4-metilhexanoato, el 4-metilhexenoato y el 3-hidroxi-4-metilhexanoato se descomponen mediante la oxidación  $\beta$  normal en ácido 2-metilbutírico, y la degradación final se logra a través de la vía isoleucina. Del mismo modo, el 5-metilhexanoato, el 5-metilhexenoato y el 3-hidroxi-5-metilhexanoato se descomponen por  $\beta$ -oxidación normal a ácido isovalérico con degradación final lograda a través de la ruta de la leucina.

15 Los precursores de propionil-CoA de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral o intraperitoneal. Preferiblemente, puede administrarse por ingestión de una sustancia alimenticia que contiene un precursor de propionil-CoA tal como triheptanoína a una concentración efectiva para alcanzar niveles terapéuticos. Alternativamente, se puede administrar como una cápsula o atrapado en liposomas, en solución o suspensión, solo o en combinación con otros nutrientes, agentes edulcorantes y/o saborizantes adicionales. Las cápsulas y tabletas pueden recubrirse con azúcar, goma laca y otros agentes entéricos como se conoce. Típicamente, los medicamentos según la invención comprenden un precursor de propionil-CoA, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia conocerá los portadores adecuados. Las formulaciones adecuadas para la administración por cualquier ruta deseada se pueden preparar por métodos estándar, por ejemplo, por referencia a texto bien conocido como Remington; La Ciencia y la Práctica de la Farmacia.

25 A continuación, la invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos, así como las figuras.

#### Leyendas de las figuras

30 Figura 1: Análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) de espectros de RMN de muestras de plasma de pacientes con HD con o sin signos de la enfermedad y controles. Tres grupos de pacientes con HD premanifiestos, tempranos y levemente afectados se constituyeron sobre la base de sus puntajes UHDRS, como se describe en los métodos. Los componentes primero y segundo en el espacio X (espectro de RMN) se denominan PC [1] y PC [2] respectivamente. Las gráficas de puntuación de PLS (PC [1]/PC [2]) de grupos comparados por pares muestran la mayor variación dentro del espectro de RMN según una clasificación a priori con UHDRS. Existe una clara separación entre los pacientes con HD premanifestada y temprana (a), así como entre los pacientes con HD temprana y levemente afectados (b). Por lo tanto, la espectroscopía de RMN en plasma permite la separación de pacientes con HD en diferentes etapas de la enfermedad. A pesar de cierta superposición, también se observa diferenciación entre los controles y los individuos premanifiestos (c).

40 Figura 2: Las concentraciones relativas en plasma de aminoácidos de cadena ramificada son responsables de la separación entre los grupos de HD. La gráfica de contribución PLS permite la comparación entre los perfiles metabólicos plasmáticos de pacientes con HD tempranamente afectados con portadores premanifiestos. Las variables de RMN que tienen el mayor peso ( $w^*_1$ ; escaladas en unidades de desviación estándar), por lo tanto, que contribuyen más a la separación entre los grupos de HD, son las concentraciones disminuidas ( $> 2SD$ ) de metabolitos localizados entre 0.9 y 1.05 ppm: valina, leucina e isoleucina. Se obtuvo la misma gráfica de contribución cuando se compararon los perfiles metabólicos en plasma de pacientes con HD levemente afectados temprano (datos no mostrados).

45 Figura 3: Los niveles de aminoácidos de cadena ramificada son significativamente diferentes en pacientes con HD y controles. Las concentraciones de valina, leucina e isoleucina en plasma se determinaron por cromatografía de intercambio iónico. Se realizaron comparaciones de medias (ANOVA) entre hombres o mujeres con HD y sus respectivos controles. En los hombres, hay una disminución significativa de valina, leucina e isoleucina en el grupo de HD. En mujeres, se observan resultados similares para leucina e isoleucina. Es de destacar que, tanto en hombres como en mujeres, la comparación de las desviaciones estándar de los valores de valina, leucina e isoleucina casi no muestra solapamiento entre el control y los grupos de HD.

50 Figura 4: los aminoácidos de cadena ramificada en plasma se correlacionan negativamente con la progresión de la enfermedad en HD. El gráfico de carga del análisis de componentes principales (PCA) muestra la importancia relativa de cada variable del estudio y la correlación entre estas variables. Cuanto más diverge la carga (p) de cada variable de cero, más importante es esta variable en la varianza explicada del componente dado (expresado por  $R^2x$ ). La varianza explicada de todos los datos alcanza el 44% en el primer componente y el 22% en el segundo componente. Existe una fuerte correlación negativa entre los marcadores clínicos (el tamaño de la expansión de repetición de CAG anormal, la gravedad de la enfermedad medida por los puntajes UHDRS y depresión) y los

parámetros asociados con el peso (peso, BMI, LBM y FBM para la masa corporal magra y grasa, respectivamente). El BCAA, valina, leucina e isoleucina están correlacionados negativamente con la progresión de la enfermedad y positivamente con la pérdida de peso. Tenga en cuenta que el número de repeticiones de CAG está correlacionado negativamente con los valores de BCAA: cuanto mayor sea la repetición, menores serán los valores de BCAA ( $p = 0.015$  para valina,  $0.018$  para leucina y  $0.020$  para isoleucina).

Figura 5: Diagrama que representa la vía metabólica de la triheptanoína.

Figura 6: supervivencia celular de Purkinje 12 días y 20 días después de la infección con los vectores lentivirales. 100Q: ATXN7T-100Q-GFP. 10Q: ATXN7T-10Q-GFP. GFP: vector de control que expresa GFP solo. La supervivencia de las células de Purkinje se expresa como el porcentaje de células positivas para Calbindina en cultivos infectados en comparación con cultivos no infectados. 12 días después de la infección por ATXN7T-100Q-GFP, la supervivencia de las células de Purkinje se reduce a ~30% y disminuye aún más a ~15% después de 20 días, lo que demuestra la alta y progresiva neurotoxicidad de la proteína mutante, que es claramente diferente de la toxicidad del vector viral solo (condición GFP).

Figura 7: Evolución del peso y el consumo de alimentos de ratones hembra knock-in ( $n = 3$ ) y ratones hembra de tipo salvaje ( $n = 3$ ) de 7 a 11 semanas de edad.

#### Ejemplos

En la siguiente descripción, todos los experimentos de biología molecular para los que no se proporciona un protocolo detallado se realizan según el protocolo estándar.

Ejemplo 1: identificación de un biomarcador de plasma en portadores premanifiestos de la enfermedad de Huntington que indica un desequilibrio energético temprano

Abreviaturas: HD (enfermedad de Huntington), UHDRS (escala de calificación de la enfermedad de Huntington unificada), ppm (partes por millón), PCA (análisis de componentes principales), PLS (mínimo cuadrado parcial).

#### Resumen

La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante en el que se cree que desempeña un papel la deficiencia energética. Los pacientes constantemente pierden peso, aunque se desconoce el motivo. En vista del acceso específico a los portadores premanifiestos en HD, realizamos un estudio multiparamétrico en un grupo de 32 individuos sin signos o con poca enfermedad en comparación con 21 controles. Se observó pérdida de peso incluso en portadores premanifiestos en el grupo de HD, aunque su ingesta calórica fue mayor. Se descartaron los procesos inflamatorios, así como la disfunción hormonal primaria, incluido el equilibrio de grelina y leptina. Sin embargo, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones en plasma distinguió a los pacientes con HD en diferentes etapas de la enfermedad y a los portadores premanifiestos de los controles. Las diferencias entre los grupos fueron atribuibles a los bajos niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), valina, leucina e isoleucina. Confirmamos que los niveles de BCAA se correlacionaron negativamente con la pérdida de peso y, lo que es más importante, con la progresión de la enfermedad. Los niveles de factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF1), que está regulado por BCAA, también fueron más bajos en el grupo HD que en los controles. Los BCAA son, por lo tanto, los primeros biomarcadores identificados en HD y ofrecen nuevos conocimientos sobre una deficiencia temprana de energía subyacente.

#### Resultados

##### Evidencia de hipercatabolismo temprano en HD

Se definieron tres grupos según sus puntajes UHDRS. Hubo 15 portadores de la mutación sin signos motores o cognitivos de HD (UHDRS  $0.5 \pm 1.0$ ), 10 pacientes en una etapa temprana de la enfermedad (UHDRS  $11.9 \pm 4.9$ ) y 7 pacientes levemente afectados (UHDRS  $44.4 \pm 14.1$ )

La pérdida de peso durante los últimos 5 años fue significativamente mayor en el grupo de HD que en los controles ( $p < 0.0001$ ). La diferencia se mantuvo significativa cuando los hombres ( $p = 0.002$ ) y las mujeres ( $p = 0.003$ ) se analizaron por separado. A pesar de la mayor ingesta de calorías, los individuos con HD y los controles no mostraron un BMI diferente. Es importante destacar que, en los hombres con HD, el BMI fue significativamente menor que en los controles, y las calorías totales incluso se correlacionaron inversamente con el peso ( $p = 0.029$ ) y la masa corporal magra ( $p = 0.004$ ).

Estas observaciones confirman que el equilibrio de peso es anormal temprano en la HD. Incluso en portadores premanifiestos, el patrón nutricional de los pacientes con HD difería del de los controles; tenían una ingesta calórica significativamente mayor ( $2195 \pm 495$ ,  $n = 15$  frente a  $1665 \pm 305$ ,  $n = 21$ ,  $p < 0.001$ ) y una mayor ingesta de proteínas ( $85 \pm 24$ ,  $n = 15$  frente a  $70 \pm 14$ ,  $n = 21$ ,  $p = 0.025$ ). Estas observaciones muestran claramente el hipercatabolismo en el grupo de HD, incluso en las primeras etapas de la enfermedad. La relación con la enfermedad no se explicó por causas comunes de hipercatabolismo, como inflamación o disfunciones endocrinas

clásicas. De hecho, ERS, CRP, las interleucinas séricas 1 $\beta$  y 6 y el cortisol en ayunas, T4L y TSH en suero fueron similares en los grupos control y HD. No hubo glucosuria, y los niveles de glucosa e insulina en sangre en ayunas estaban en el rango normal en el grupo de HD.

Identificación de biomarcadores candidatos mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN en plasma (figuras 1 y 2)

5 La PCA en los espectros de RMN en plasma no identificó valores atípicos tanto en el conjunto de datos de control como en el de HD. Los análisis PLS podrían distinguir a los individuos con HD en diferentes etapas de la enfermedad, lo que significa que los metabolitos plasmáticos subyacentes se comportaron de manera diferente. La diferencia entre los portadores premanifiestos y la HD temprana fue evidente (figura 1a), y se extendió a etapas más avanzadas de la enfermedad (figura 1b). Además, los controles y los portadores premanifiestos no tenían el mismo perfil metabólico, a pesar de cierta superposición (figura 1c).

10 En la figura 2 se muestra la región espectral que contribuyó a las diferencias entre los grupos de HD determinados a partir de las gráficas de contribución de PLS. Se comparó el perfil metabólico plasmático de los pacientes con HD tempranamente afectado a los portadores premanifiestos, así como de los pacientes con HD levemente afectado o temprano. Hubo una disminución significativa ( $> 2\text{SD}$ ) junto con la progresión de la enfermedad en las concentraciones plasmáticas de un grupo de variables de los cubos ubicados entre 0.9 y 1.05 ppm en el espectro de RMN. Estos picos corresponden a los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), valina, leucina e isoleucina. No se detectaron otras diferencias significativas entre los grupos en los espectros a pesar de que se analizaron cubos muy pequeños (0.02 ppm). Esto indica que una disminución selectiva en las concentraciones de BCAA acompaña la progresión de la enfermedad, e incluso distingue a los portadores premanifiestos de los controles y los primeros pacientes con HD. Los niveles plasmáticos de BCAA parecen, por lo tanto, ser biomarcadores relevantes de HD.

20 Confirmación de que los BCAA se ven afectados en la HD (figuras 3 y 4)

Para confirmar que los BCAA se ven afectados en la HD, también medimos sus concentraciones en plasma mediante cromatografía de intercambio iónico. Los niveles de valina, leucina e isoleucina fueron significativamente más bajos en el grupo de HD en comparación con los controles ( $p = 0.009$ ,  $p < 0.001$  y  $p = 0.002$ , respectivamente). Además, los niveles de cada BCAA se correlacionaron significativamente con la pérdida de peso observada en los pacientes ( $p = 0.005$ ,  $0.002$  y  $0.014$  respectivamente). Más importante aún, los niveles de BCAA se correlacionaron negativamente con los valores de UHDRS ( $p = 0.017$ ,  $< 0.0001$  y  $0.003$  respectivamente) tanto en hombres ( $p = 0.035$ ,  $0.019$  y  $0.036$  respectivamente) como en mujeres ( $p = 0.007$  para leucina y  $0.01$  para isoleucina). Aunque los valores de BMI de las mujeres con HD fueron similares a los controles, tenían niveles significativamente más bajos de leucina ( $p = 0.002$ ) e isoleucina ( $p = 0.014$ ) (figura 3). Esto indica que los niveles más bajos de BCAA no solo están asociados con el equilibrio de peso, sino más importante aún con la enfermedad de Huntington. Curiosamente, los niveles plasmáticos de los tres BCAA fueron significativamente más bajos en pacientes en una etapa temprana de la enfermedad en comparación con los portadores premanifiestos ( $p = 0.042$ ,  $0.019$  y  $0.024$  respectivamente). Los niveles de BCAA están, por lo tanto, asociados con el inicio de la enfermedad, enfatizando que pueden usarse como biomarcadores confiables en la HD. Al comparar los portadores premanifiestos con los controles, los niveles plasmáticos de valina ( $228 \pm 50$  versus  $245 \pm 44$ ), leucina ( $130 \pm 24$  versus  $14 \pm 23$ ) e isoleucina ( $62 \pm 12$  versus  $68 \pm 15$ ) fueron más bajos en el primer grupo, aunque no significativamente. Esto probablemente se deba a la heterogeneidad del grupo premanifiestado en el que se espera que el tiempo estimado hasta el inicio de la enfermedad varíe entre los individuos, de modo que el perfil metabólico de algunos portadores premanifiestos puede ser similar a los controles.

Un PCA multivariado confirma que existe una fuerte correlación negativa entre los marcadores clínicos (tamaño de expansión de repetición CAG anormal, puntajes UHDRS, puntajes de depresión) y parámetros de peso (figura 4). Los valores bajos de BCAA parecen ser las variables más fuertes que se correlacionan negativamente con HD y se correlacionan positivamente con la pérdida de peso. Los números de repeticiones CAG también se correlacionan negativamente con los valores de BCAA: cuanto mayor es la repetición, menores son los valores ( $p = 0.015$  para valina,  $0.018$  para leucina y  $0.020$  para isoleucina).

Los otros marcadores metabólicos (colesterol y triglicéridos séricos, aminoácidos restantes y acilcarnitinas en plasma, ácidos orgánicos en orina) fueron similares en el grupo HD y en los controles. Sin embargo, los niveles de IGF1 fueron significativamente más bajos en el grupo de HD ( $p = 0.011$ ) y se correlacionaron negativamente con los puntajes UHDRS ( $p = 0.004$ ). Los niveles de IGF1 también se correlacionaron con los niveles de leucina ( $p = 0.04$ ) e isoleucina ( $p = 0.02$ ), lo que se esperaba ya que IGF1 está regulado por BCAA. Sin embargo, esto tiene que ser modulado por el hecho de que se sabe que los niveles de IGF1 disminuyen con la edad, como se observó en nuestra cohorte HD ( $p = 0.002$ ). La disminución en los niveles de IGF1 no se asoció con cambios significativos en otros parámetros nutricionales (albúmina, prealbúmina, orosomucoide). No hubo correlación entre los niveles de IGF1 y los parámetros asociados con el peso (BMI, masa corporal magra y grasa) o el consumo de alimentos.

Discusión

Esta es la primera investigación extendida del trastorno de peso en HD. Hemos demostrado que la pérdida de peso comienza temprano en la enfermedad, a pesar de una mayor ingesta calórica, y es evidente incluso en portadores

de mutación premanifiesta y aquellos con poca o ninguna corea. Este hipercatabolismo no puede explicarse por mecanismos comunes como la inflamación o las funciones endocrinas alteradas, que han sido incriminadas en la fisiopatología de la HD (Kremer et al. 1989; Pavese et al. 2006). El hipercatabolismo en la HD parece, por lo tanto, ser parte del proceso patológico inducido por la enfermedad.

5 Nuestro análisis de espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN muestra que los pacientes en diferentes etapas de HD pueden distinguirse entre sí, y los portadores de mutaciones premanifiestas pueden distinguirse de los controles, en función de sus niveles plasmáticos de aminoácidos de cadena ramificada. La disminución en los niveles de estos aminoácidos se correlacionó con la pérdida de peso en pacientes con HD, pero más importante aún con la gravedad del deterioro clínico, es decir, con la enfermedad de Huntington. Este hallazgo está respaldado por estudios previos en los que se documentó una disminución del BCAA en plasma en pacientes con HD más gravemente afectados (Perry et al. 1969; Phillipson and Bird 1977; Reilmann et al. 1995). El extenso examen metabólico que realizamos en combinación con una técnica independiente confirmó que los BCAA en plasma eran los únicos metabolitos que diferían entre el grupo de HD y los controles. Esta diferencia existía independientemente del sexo y entre pacientes en una etapa temprana de la enfermedad y portadores premanifiestos. En consecuencia, el BCAA plasmático puede considerarse como biomarcadores relevantes para la enfermedad de Huntington. Deben ayudar a detectar la aparición de la enfermedad y controlar su progresión en vista de los ensayos terapéuticos. Hasta donde sabemos, este es el primer biomarcador accesible identificado en la enfermedad de Huntington y, más ampliamente, el primer biomarcador periférico evidenciado en un trastorno neurodegenerativo.

20 Solo unos pocos estudios metabólicos han llevado a la identificación de biomarcadores que pueden usarse de forma rutinaria para el seguimiento de los pacientes (Sabatine et al. 2005). Se sabe que la variabilidad interindividual complica estos análisis en fluidos corporales humanos, restringiendo así los estudios metabólicos esencialmente a modelos animales (Wagner et al. 2006).

25 Los sesgos analíticos y experimentales comunes en humanos incluyen la ingesta dietética, el tiempo de recolección de la muestra, el acondicionamiento de la muestra y los cambios químicos debido a cambios en el pH (Cloarec et al. 2005; Teahan et al. 2006; Walsh et al. 2006). En el presente estudio, cada uno de estos parámetros fue rigurosamente controlado. Esto probablemente explica la precisión de nuestros hallazgos de RMN.

30 La implicación de BCAA en el metabolismo intermediario mitocondrial, tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos, respalda aún más un papel importante para el déficit de energía en la HD. Se mostró una reducción en la producción de ATP en el cerebro de ratones con HD, incluidos los ratones presintomáticos (Gines et al. 2003). También se evidenció una reducción significativa en los niveles de ATP y la respiración mitocondrial en células estriales de ratones con HD, aunque los complejos de la cadena respiratoria no se vieron afectados (Milakovic and Johnson 2005). En pacientes con HD, existe una fuerte evidencia de hipometabolismo en el cerebro donde el consumo de glucosa se reduce, especialmente en los ganglios basales, incluso en portadores de mutaciones presintomáticas (Grafton et al. 1992; Kuwert et al. 1993; Antonini et al. 1996). Actualmente se desconoce la causa subyacente de este déficit energético temprano en el cerebro con HD, pero puede verse afectada la alteración de la glucólisis (Browne y Beal 2004), el ciclo del ácido cítrico (Tabrizi et al. 1999) y/o la fosforilación oxidativa (Milakovic and Johnson 2005).

40 Recientemente, se demostró que la huntingtina mutada disminuye la expresión de PGC-1 $\alpha$  (coactivador gamma del receptor activado por proliferadores de peroxisomas-1 $\alpha$ ) en el cuerpo estriado de ratones y pacientes con HD, a través de una inhibición transcripcional dependiente de CREB (Cui et al. 2006). PGC-1 $\alpha$  es un coactivador transcripcional que regula las vías metabólicas energéticas clave, tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos (Lin et al. 2005). El posible papel de PGC-1 $\alpha$  en HD se sospechaba inicialmente por la observación de lesiones estriales selectivas en el ratón knockout PGC-1 $\alpha$  (Lin et al. 2004). Luego se demostró que la regulación negativa de PGC-1 $\alpha$  en el cuerpo estriado de HD afecta el metabolismo de la energía mitocondrial, posiblemente al afectar la fosforilación oxidativa (Cui et al. 2006). Además, la inhibición del succinato deshidrogenasa, por ácido 3-nitropropiónico o malonato, imita la neuropatología de la HD en ratones (Klivenyi et al. 2004), lo que indica que la falta de sustratos para el ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria está implicada en el déficit de energía en el cerebro con HD. Es importante destacar que la oxidación mitocondrial de BCAA conduce a la producción de acetil-CoA y succinil-CoA, dos intermedios clave del ciclo del ácido cítrico. La ingesta insuficiente de calorías o proteínas se excluyó en nuestro estudio, así como el deterioro de la vía de oxidación de BCAA ya que los niveles de ácido orgánico en la orina eran normales. Por lo tanto, la disminución en el BCAA en plasma observada en el grupo HD probablemente sea el resultado de la activación de un mecanismo compensatorio para proporcionar sustratos de energía al ciclo del ácido cítrico, como se describe en varias enfermedades productoras de caquexia (Szpetnar et al. 2004; De Bandt and Cynober 2006). La correlación entre la disminución de los niveles de BCAA y la pérdida de peso en nuestro estudio sugiere que la movilización excesiva y la oxidación de BCAA para producir energía en los músculos se asocia con la pérdida de peso y la reducción de la masa corporal magra. La observación de la pérdida de peso antes del declive neurocognitivo sugiere que los síntomas neurológicos se exacerban cuando los sustratos de la periferia se vuelven insuficientes para compensar el déficit de energía en el cerebro con HD.

60 La tasa normal de consumo de oxígeno recientemente observada después de la infusión estriatal de succinato (Weydt et al. 2006) respalda la idea de que proporcionar energía a través de un aumento en los intermedios del ciclo del ácido cítrico sistémico y cerebral puede ser un enfoque terapéutico prometedor en la HD.

En el nivel fisiopatológico, nuestro estudio también mostró que los niveles bajos de BCAA en plasma dan como resultado niveles bajos de IGF1 en el grupo de HD en comparación con los controles, aunque tienen una mayor ingesta calórica y proteica. La estrecha conexión entre IGF1 y aminoácidos esenciales ha sido ampliamente estudiada (Straus and Takemoto 1988; Harp et al. 1991; Thissen et al. 1994; Gomez-Merino et al. 2004). La disponibilidad de aminoácidos esenciales parece tener un mayor efecto sobre la expresión del gen IGF1 que los estímulos hormonales como las concentraciones séricas de insulina (Maiter et al. 1989). IGF1 también es un indicador más sensible de la reposición de nutrientes que la albúmina, prealbúmina u orosomucoide, como se observó en nuestro estudio. Curiosamente, la huntingtina es un sustrato de la vía Akt de serina-treonina, que es activada por IGF1 (Humbert et al. 2002). Se ha demostrado que la activación alterada de la ruta de Akt disminuye la fosforilación de la huntingtina mutada, lo que resulta en una mayor toxicidad neuronal (Rangone et al. 2005). Por lo tanto, los niveles bajos de IGF1 en pacientes con HD podrían proporcionar una explicación de la alteración en la activación de Akt observada en los modelos celulares de HD. En consecuencia, el aumento de los niveles de BCAA para corregir el déficit en IGF1 debería favorecer la fosforilación de la huntingtina mutada, disminuyendo así su toxicidad.

En conclusión, la combinación de una evaluación nutricional rigurosa y herramientas metabonómicas ha proporcionado una nueva visión de la HD. Hemos demostrado la existencia de una deficiencia energética temprana en este trastorno neurodegenerativo, reflejado por la pérdida de peso.

También hemos identificado el primer biomarcador confiable en la enfermedad de Huntington. La evidencia de la disminución de los niveles plasmáticos de BCAA en etapas muy tempranas de la HD resalta la posibilidad de terapias destinadas a suministrar un grupo suficiente de acetil-CoA para compensar el déficit energético temprano.

En conjunto, estos datos apoyan un papel causal de la deficiencia de energía en la enfermedad de Huntington. En lugar de un defecto en la cadena respiratoria, los niveles bajos de BCAA en plasma indican un deterioro energético en el ciclo de Krebs. Por lo tanto, las moléculas seleccionadas por su capacidad para revertir esta deficiencia en la producción de ATP mitocondrial deben rellenar el conjunto de intermedios catalíticos del ciclo de Krebs. Los compuestos dietéticos como la triheptanoína se han utilizado recientemente en ensayos terapéuticos en humanos por su capacidad para rellenar las reservas de intermedios catalíticos del ciclo de Krebs, un proceso energético clave llamado anaplerosis. Debido a la evidencia adicional de que los metabolitos de triheptanoína cruzan la barrera hematoencefálica, las terapias anapleróticas representan moléculas prometedoras para revertir la deficiencia de energía asociada con enfermedades neurodegenerativas y así corregir algunas, si no todas, las manifestaciones clínicas de estas enfermedades.

#### Material y métodos

##### Pacientes con HD, portadores premanifestados y controles

Se incluyeron 32 individuos con expansiones de repeticiones CAG anormales (> 36) en el gen HD1 (19 mujeres y 13 hombres) y 21 controles (13 mujeres y 8 hombres). En el grupo de HD, 15 eran portadores premanifestados que antes habían solicitado pruebas predictivas debido a su riesgo de HD, 10 estaban en una etapa muy temprana de la enfermedad y 7 tenían signos moderados de la enfermedad. Los controles fueron voluntarios sanos en el mismo rango de edad, no relacionados con individuos con HD. Todos los participantes fueron examinados y se tomaron muestras de sangre durante una sola visita al centro de referencia para HD en el Hospital Salpêtrière (París). Los pacientes, los portadores premanifestados y los controles se inscribieron en un protocolo clínico autorizado por la Asistencia Pública de Hospitiaux de París (CRC 05129) y aprobado por el comité de ética local. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

##### Determinación del equilibrio de peso y consumo de alimentos.

La altura y el peso se registraron el día del examen clínico. La pérdida de peso se calculó restando el peso actual del peso del paciente 5 años antes de su inclusión en el estudio. Esta información se obtuvo durante la entrevista y se verificó retrospectivamente a partir de los archivos médicos de los pacientes. El índice de masa corporal (BMI) se obtuvo dividiendo el peso (en kilogramos) por la altura (en metros) al cuadrado. La impedancia bioeléctrica (Tanita®) se midió para evaluar la masa magra y la masa grasa de todos los participantes (Segal et al. 1988).

Para determinar el consumo de alimentos, los pacientes con HD en las primeras etapas, los portadores y controles premanifestados registraron prospectivamente su consumo normal de alimentos durante los 3 días anteriores a su examen. La precisión del registro de 3 días se verificó un mes después con un cuestionario que evaluaba el consumo de alimentos durante un período de 24 horas que se envió a los hogares de todos los participantes. Un dietista profesional (CG) utilizó estos dos documentos para calcular las calorías totales medias y la ingesta de proteínas, lípidos y azúcar para los grupos de control y HD con un sistema automatizado (Diaeta software®).

##### Evaluación multiparamétrica del equilibrio de peso

Se diseñó un protocolo estandarizado para evaluar a fondo todas las posibles causas de pérdida de peso y evitar sesgos relacionados con el consumo de alimentos y los cambios circadianos. Incluyó secuencialmente: (i) un mínimo

de 12 horas de ayuno la noche anterior al examen, (ii) y recolección de sangre y orina por la mañana a la misma hora (9 am) Las muestras se almacenaron en hielo para análisis inmediatos o se congelaron a -80 °C para análisis adicionales.

5 Los análisis estándar incluyeron recuento de células sanguíneas, glucosa en sangre y orina, electrolitos séricos y parámetros nutricionales básicos, como colesterol sérico, triglicéridos, albúmina, prealbúmina y orosomucoide. Para refinar la evaluación de la reposición de nutrientes, se midieron las concentraciones de factor de crecimiento de insulina sérica tipo 1 (IGF1) utilizando un ensayo inmunoradiométrico específico (IGF1 RIACT, Cis-Bio International, Gif-sur-Yvette, Francia). Se exploraron los tres ejes principales involucrados en la regulación del equilibrio de peso: inflamación, función endocrina y metabolismo intermedio. La evaluación de la inflamación incluyó la determinación de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la cuantificación de la proteína C reactiva (PCR) y las interleucinas séricas IL1 $\beta$  e IL6 por ELISA (Diaclone, Besançon, Francia). Además de IGF1 en suero, la evaluación endocrina básica incluyó mediciones de cortisol en suero en ayunas (a las 9 a.m.), tetrayodotironina (T4L), hormona estimulante de la tiroides (TSH) e insulina (insulina ultrasensible Elisa Access, Beckman Coulter, Roissy, Francia).

15 Exploramos el metabolismo intermedio mediante el análisis de (i) aminoácidos plasmáticos mediante cromatografía de intercambio iónico después de la coloración con ninhidrina (Aminotag, Geol), (ii) ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases (GS Variant 3400) acoplado a espectrometría de masas (Ion trap, Saturn 2000, Variant) después de la extracción con acetato de etilo y derivación por sililación, (iii) el perfil de acilcarnitinas en plasma por espectrometría de masas en tándem (Applied Biosystem) con ionización por electropulverización (ESI) y FIA (análisis de inyección de flujo). Las acilcarnitinas se identificaron mediante el uso de un escaneo de iones precursores m/z 85 y se cuantificaron en modo MRM (monitoreo de reacción múltiple). Los niveles de acetilcarnitina (C2-carnitina) se utilizaron para examinar el estado de ayuno de los individuos y los controles de HD (Costa et al. 1999).

20 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  (RMN) en plasma

25 Se prepararon muestras de plasma para espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN con un manejo mínimo. Las muestras de plasma se desproteinizaron usando un filtro de 10 kDa (Nanosep, Omega) para evitar la interferencia de especies de alto peso molecular como las lipoproteínas. Antes de su uso, el filtro se lavó dos veces con agua por centrifugación para eliminar el glicerol. Se añadió una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de ácido [trimetilsilil] -2,2,3,3-tetradeuteropropiónico 3.89 mM en  $^2\text{H}_2\text{O}$  (TSP- $^2\text{H}_2\text{O}$ , Aldrich) a 500  $\mu\text{l}$  del ultrafiltrado, proporcionando una referencia de cambio químico ( $\delta = 0.00\text{ppm}$ ), una referencia de concentración y una señal de bloqueo de deuterio. El pH del ultrafiltrado se ajustó a  $2.50 \pm 0.05$  con HCl concentrado. Finalmente, se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de la muestra en un tubo de RMN de 5 mm (Wilmad Royal Imperial). Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se determinaron en un espectrómetro Avance-500 SB (Bruker, Francia) equipado con una sonda BBI (inversa de banda ancha) de 5 mm; las muestras no fueron hiladas. Los espectros se recogieron a 25°C y consistieron en puntos de datos de 32K con un ancho espectral de 6,000 Hz y un tiempo de adquisición total de 27 min. Se usó un pulso de radiofrecuencia de 90°, después de una presaturación de la señal de agua de 10 segundos, por cada 128 barridos.

35 El calce de la muestra se realizó automáticamente en la señal de deuterio. Los anchos de línea de resonancia para TSP y metabolitos fueron  $<1\text{Hz}$ . Antes de una transformación de Fourier en puntos de datos de 64K, se utilizó un filtro cuadrado de campana sinusoidal (SSB = 2) para reducir el ruido. La fase y la línea de base se corrigieron manualmente usando el software del espectrómetro (X-Win RMN 3.5, Bruker, Francia). Los espectros de RMN se analizaron primero individualmente para detectar señales anormales, es decir, tratamiento o alimentos especiales, que podrían interferir aún más con los análisis globales. Para los análisis estadísticos, los espectros fueron datos reducidos en formato numérico integrando regiones espectrales (cubos) cada 0.02 ppm y escalados a la intensidad total del espectro con el software Amix 3.6.8 (Bruker Analytische Messtechnik, Alemania) de 0.8 a 8.6 ppm, excluyendo el área del pico de agua de cada espectro (4.4 a 5.2 ppm). De acuerdo con lo anterior, cada segmento del espectro de RMN correspondía a una sola variable.

45 Análisis estadístico

Los estudios metabonómicos consisten en análisis estadísticos multivariados, por ejemplo, análisis de componentes principales (PCA) y análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), con tantos componentes como variables. Los análisis multivariados de los datos obtenidos por espectroscopía de RMN se realizaron con el software Simca-P® 11.0 (Umetrics, Suecia). Para PCA y PLS, se utilizaron datos escalados de varianza unitaria para asegurar la inclusión de metabolitos presentes en concentraciones altas y bajas. Cada variable se centró en la media y se calculó como  $1/\text{SD}_j$ , la desviación estándar de la variable j se calculó alrededor de la media. PCA considera cada segmento del espectro de RMN como una variable X y, por lo tanto, se utilizó para discernir la presencia de similitudes inherentes entre los perfiles espectrales e identificar valores atípicos. PLS es una extensión de regresión de PCA y describe mejor la variación dentro de los datos según una clasificación a priori, correspondiente a una variable Y, que fue el puntaje UHDRS en nuestro estudio. PLS se utilizó para identificar componentes principales que maximizan la covarianza entre todas las variables X (espectro de RMN) e Y (UHDRS). La mayor dispersión de los perfiles espectrales generalmente se observa mejor en los dos primeros componentes de los análisis. Los componentes primero y segundo en el espacio X (espectro de RMN) se denominaron PC [1] y PC [2] respectivamente. Por lo tanto, el gráfico de puntaje PLS (PC [1]/PC [2]) de grupos comparados por pares mostró la

mayor variación dentro del espectro de RMN según UHDRS. La validez de cada componente se obtuvo mediante validación cruzada. La gráfica de contribución se analizó luego para determinar el peso respectivo de las variables que más contribuyen a la separación entre grupos.

- 5 Para la comparación de medias, se utilizaron ANOVA o pruebas no paramétricas cuando fue apropiado (software SPSS®). Dado que nuestro estudio se basó en un enfoque multiparamétrico, también realizamos PCA para buscar posibles correlaciones entre los diferentes parámetros que se analizaron (software Simca-P®).

#### Referencias

- Antonini A, Leenders KL, Spiegel R, et al. (1996). "Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease." *Brain* 119 (Pt 6): 2085-95.
- 10 Browne SE and Beal MF (2004). "The energetics of Huntington's disease." *Neurochem Res* 29 (3): 531-46.
- Cloarec O, Dumas ME, Trygg J, et al. (2005). "Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1H NMR spectroscopic metabonomic studies." *Anal Chem* 77 (2): 517-26.
- 15 Costa CC, de Almeida IT, Jakobs C, Poll-The BT and Duran M (1999). "Dynamic changes of plasma acylcarnitine levels induced by fasting and sunflower oil challenge test in children." *Pediatr Res* 46 (4): 440-4.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N and Krainc D (2006). "Transcriptional repression of PGC-1 alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration." *Cell* 127 (1): 59-69.
- De Bandt JP and Cynober L (2006). "Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma, and sepsis." *J Nutr* 136 (1 Suppl): 308S-13S.
- 20 Gines S, Seong IS, Fossale E, et al. (2003). "Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knockin mice." *Hum Mol Genet* 12 (5): 497-508.
- Gomez-Merino D, Chennaoui M, Drogou C and Guezennec CY (2004). "Influence of energy deficiency on the insulin-like growth factor I axis in a military training program." *Horm Metab Res* 36 (7): 506-11.
- 25 Grafton ST, Mazziotta JC, Pahl JJ, et al. (1992). "Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease." *Arch Neurol* 49 (11): 1161-7.
- Harp JB, Goldstein S and Phillips LS (1991). "Nutrition and somatomedin. XXIII. Molecular regulation of IGF-I by amino acid availability in cultured hepatocytes." *Diabetes* 40 (1): 95-101.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, et al. (2002). "The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt." *Dev Cell* 2 (6): 831-7.
- 30 Klivenyi P, Starkov AA, Calingasan NY, et al. (2004). "Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity." *J Neurochem* 88 (6): 1352-60.
- Kremer HP, Roos RA, Frolich M, Radder JK, Nieuwenhuijzen Kruseman AC, Van der Velde A and Buruma OJ (1989). "Endocrine functions in Huntington's disease. A two-and-a-half years follow-up study." *J Neurol Sci* 90 (3): 335-44.
- 35 Kuwert T, Lange HW, Boecker H, et al. (1993). "Striatal glucose consumption in chorea-free subjects at risk of Huntington's disease." *J Neurol* 241 (1): 31-6.
- Lin J, Handschin C and Spiegelman BM (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." *Cell Metab* 1 (6): 361-70.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, et al. (2004). "Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice." *Cell* 119 (1): 121-35.
- 40 Maiter D, Fliesen T, Underwood LE, Maes M, Gerard G, Davenport ML and Ketelslegers JM (1989). "Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding." *Endocrinology* 124 (5): 2604-11.
- Milakovic T and Johnson GV (2005). "Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin." *J Biol Chem* 280 (35): 30773-82.
- 45 Pavese N, Gerhard A, Tai YF, et al. (2006). "Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study." *Neurology* 66 (11): 1638-43.
- Perry TL, Diamond S, Hansen S and Stedman D (1969). "Plasma-aminoacid levels in Huntington's chorea." *Lancet* 1 (7599): 806-8.

- Phillipson OT and Bird ED (1977). "Plasma glucose, non-esterified fatty acids and amino acids in Huntington's chorea." *Clin Sci Mol Med* 52 (3): 311-8.
- 5 Rangone H, Pardo R, Colin E, Girault JA, Saudou F and Humbert S (2005). "Phosphorylation of arfaptin 2 at Ser260 by Akt Inhibits PolyQ-huntingtin-induced toxicity by rescuing proteasome impairment." *J Biol Chem* 280 (23): 22021-8.
- Reilmann R, Rolf LH and Lange HW (1995). "Decreased plasma alanine and isoleucine in Huntington's disease." *Acta Neurol Scand* 91 (3): 222-4.
- Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. (2005). "Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia." *Circulation* 112 (25): 3868-75. Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI, Hodgdon JA and Van Itallie TB (1988). "Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study." *Am J Clin Nutr* 47 (1): 7-14.
- 10 Straus DS and Takemoto CD (1988). "Regulation of albumin mRNA in H4 rat hepatoma cells by the availability of essential amino acids." *Biochim Biophys Acta* 972 (1): 33-6.
- Szpetnar M, Pasternak K and Boguszewska A (2004). "Branched chain amino acids (BCAAs) in heart diseases (ischaemic heart disease and myocardial infarction)." *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 59 (2): 91-5.
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM and Schapira AH (1999). "Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain." *Ann Neurol* 45 (1): 25-32.
- Teahan O, Gamble S, Holmes E, Waxman J, Nicholson JK, Bevan C and Keun HC (2006). "Impact of analytical bias in metabolomic studies of human blood serum and plasma." *Anal Chem* 78 (13): 4307-18.
- 20 Thissen JP, Ketelslegers JM and Underwood LE (1994). "Nutritional regulation of the insulin-like growth factors." *Endocr Rev* 15 (1): 80-101.
- Wagner S, Scholz K, Donegan M, Burton L, Wingate J and Volkel W (2006). "Metabonomics and biomarker discovery: LC-MS metabolic profiling and constant neutral loss scanning combined with multivariate data analysis for mercapturic acid analysis." *Anal Chem* 78 (4): 1296-305.
- 25 Walsh MC, Brennan L, Malthouse JP, Roche HM and Gibney MJ (2006). "Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans." *Am J Clin Nutr* 84 (3): 531-9.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, et al. (2006). "Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration." *Cell Metab* 4 (5): 349-62.

Ejemplo 2: Terapia de triheptanoína en modelos de ratón con HD

- 30
- Objetivos del estudio.
- Se realiza un estudio piloto para probar el efecto de la terapia dietética con triheptanoína versus dieta de control en cepas seleccionadas de ratones HD R6/2 (Mangarioni 1996, *Cell* 87: 493-506, Kosinski 1999, *Neuroreport* 10: 3891-6). El estudio incluye (i) medir tasas de anaplerosis cerebral de heptanoato y ATP cerebral en ratones R6/2 de diferentes edades y en ratones de control para demostrar la capacidad de los metabolitos de triheptanoína para 35 atravesar la barrera hematoencefálica de ratones R6/2 y revertir el déficit de energía central; (ii) evaluar la eficacia terapéutica de la triheptanoína mediante pruebas de comportamiento precisas, microdiálisis cerebral in vivo (para analizar neurotransmisores, metabolitos de triheptanoína y BCAA) y examen neuropatológico; (iii) análisis metabolómicos en plasma y orina de ratón.
- 40 Métodos de búsqueda
- Los ratones R6/2 y control, en dietas enriquecidas con triheptanoína y control, se infunden secuencialmente, a las 4, 8 y 12 semanas, con varias dosis de heptanoato [ $5,6,7\text{-}^{13}\text{C}_3$ ] (por sonda o por infusión intravenosa) durante 1 hora antes del muestreo del cerebro, para seguir la cinética de la anaplerosis en el cerebro (usando el ensayo de ésteres anapleróticos de CoA).
- 45 Las concentraciones de ATP, ADP y AMP se analizan en todas las muestras de cerebro, así como en el músculo de ratones R6/2. También estamos evaluando la concentración y el patrón de marcado de los neurotransmisores generados por la anaplerosis (GABA, glutamato) para determinar si el cerebro es deficiente en estos compuestos y si la terapia anaplerótica mejora estos parámetros. Los tejidos cerebrales se almacenan a  $-70^\circ\text{C}$  en vista de posibles análisis adicionales (como la medición del estrés oxidativo).

Los análisis de comportamiento incluyen (i) monitoreo de actividad en campo abierto utilizando el sistema TruScan a las 4, 8 y 12 semanas; (ii) análisis RotaRod realizado utilizando el sistema AccuScan equipado con un piso amortiguable a las 6 y 12 semanas; (iii) y Morris Water Maze, la tarea más popular en neurociencia conductual utilizada para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria a las 12 semanas. Otros puntos finales primarios del estudio son la pérdida de peso y la supervivencia.

Dado que tanto los pacientes con HD como los modelos genéticos de HD con ratones manifiestan una pérdida presintomática de los receptores DA, una neurotransmisión dopaminérgica disfuncional puede estar involucrada en la presentación temprana de la HD. Estudios más recientes han demostrado que la liberación de DA está severamente comprometida en ratones R6/2 (Johnson 2006, J Neurochem 97: 737-46).

De acuerdo con lo anterior, un primer grupo de animales se sacrifica a las 12 semanas por dislocación cervical para análisis de neurotransmisores. Se recolecta sangre y se extrae rápidamente el tejido cerebral y se disecciona en las siguientes regiones: cuerpo estriado, hipocampo, corteza frontal, corteza posterior, cerebelo y mesencéfalo. Estas regiones se diseccionan para los hemisferios izquierdo y derecho del cerebro. Todas las regiones del lado derecho se procesan para el análisis de DA, 5-hidroxitriptófano (5-HT) y noradrenalina (NE) y metabolitos relacionados (ácido 3-dihidrofenilacético, ácido homovalínico, 3-metoxitiramina y ácido 5-hidroxiindolacético) por HPLC con detección electroquímica. La acetilcolina (ACh) también se mide en el tejido de la corteza frontal posterior mediante HPLC con detección electroquímica. Los aminoácidos de cadena ramificada se miden por HPLC y los metabolitos de triheptanoína por espectrometría de masas. La neuropatología, y especialmente las inclusiones neuronales nucleares, se realiza en las regiones del lado izquierdo. A las 12 semanas, se prepara un segundo grupo de animales para la microdiálisis in vivo para controlar la liberación in vivo de DA, 5-HT por potasio y la liberación de ACh por escopolamina en el cuerpo estriado. Los cambios en las concentraciones extracelulares de DA, 5-HT y ACh se comparan de tres maneras ANOVA (tiempo x genotipo x dieta) con medidas repetidas.

Los análisis secuenciales de muestras de plasma y orina de R6/2 y ratones de control a las 4, 8 y 12 semanas también se realizan con espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. Esto tiene como objetivo la detección de metabolitos de triheptanoína (derivados de propionilo y pentanoil-CoA) en fluidos corporales de ratones tratados. La comparación del perfil metabólico de los ratones R6/2 y de control en la dieta de control, mediante análisis estadísticos de datos multivariados, posiblemente puede confirmar la implicación de BCAA en la fisiopatología de los ratones R6/2, como se evidencia en portadores y pacientes premanifiestos de HD, y se sugirió parcialmente en un estudio metabólico previo en ratones R6/2 (Underwood 2006, Brain 129: 877-8). Más importante aún, la comparación del perfil metabólico de ratones R6/2 tratados con ratones no tratados pueden evaluar si la triheptanoína puede conducir a la corrección de tales perfiles hipercatabólicos.

### Ejemplo 3: Terapia de ataxia espinocerebelosa 7 (SCA7)

#### 1/Ensayo in vitro

Para crear un modelo simplificado de SCA7 in vitro, utilizamos cultivos primarios de células cerebelosas disociadas porque la lesión del cerebelo, particularmente la capa de células de Purkinje (PC), explica el fenotipo de ataxia en pacientes con SCA7. Nuestros cultivos de células cerebelosas estaban compuestos de células gliales y neuronas, de las cuales 5 a 10% expresaban calbindina (CaBP) identificándolas como PC. Para examinar los efectos del ATXN7 mutante en la supervivencia de la PC, las células se infectaron en DIV1 (1er día in vitro) con vectores lentivirales que portaban formas truncadas de ataxina 7 normal y mutante (ATXN7T: aminoácidos 1-232) fusionados a GFP (ATXN7T-10Q-GFP, ATXN7T-100Q-GFP). Estos vectores lentivirales permitieron la expresión eficiente de estas proteínas en aproximadamente el 90% de las neuronas, incluidas las células de Purkinje. La infección por ATXN7T-100Q-GFP condujo a una pérdida neuronal masiva, casi exclusivamente en las neuronas de Purkinje (~85% de la muerte celular de Purkinje versus ~20% de pérdida de otras neuronas), reproduciendo así una de las principales características de la enfermedad humana (figura 6)

Este modelo se utiliza para evaluar la capacidad de las moléculas anaploréticas para rescatar las células de Purkinje infectadas por ATXN7T-100Q-GFP. Se prueban dos compuestos: el 3-cetoveralato y el 3-hidroxiervalato, que ambas son incorporadas directamente por las células en cultivo. Estas moléculas se agregan en el medio de cultivo el mismo día en que las células se infectan y la mitad del medio se reemplaza cada 4 días. Los cultivos se mantienen durante 20 días y el posible rescate de las células de Purkinje se cuantifica como se describió anteriormente.

#### 2/Experimentos in vivo

Elegimos usar el modelo de ratón knock-in SCA7 desarrollado en el grupo de H.Y. Zoghbi (Yoo 2003 Neuron, 37: 383-401), que expresa ATXN7 con 266 glutaminas a niveles endógenos en el patrón espaciotemporal apropiado. El ratón Sca7 es altamente homólogo al SCA7 humano, con un 88,7% de identidad a nivel de proteína. Los ratones Sca7<sup>266Q/5Q</sup> reproducen características de SCA7 infantil, que se caracteriza por una progresión más rápida y un espectro más amplio de fenotipos que la enfermedad de inicio en adultos. A partir de las 5 semanas de edad, estos ratones desarrollan pérdida de peso progresiva, ptosis, discapacidad visual, temblor, ataxia, desgaste muscular, cifosis y finalmente mueren alrededor de las 14-19 semanas de edad. Los ratones Sca7<sup>266Q/5Q</sup> manifestaron deterioro de la coordinación en la prueba de rotarod a las 5 semanas. A las 8-9 semanas, la ataxia de la marcha es evidente y

la coordinación motora se deteriora aún más. Al igual que en los pacientes, los estudios neuropatológicos revelaron la formación progresiva de NI en muchas regiones del cerebro. Aunque no se observa pérdida neuronal en el cerebro, las células de Purkinje, que son una de las células más comúnmente afectadas en SCA7, tienen un tamaño celular disminuido.

#### 5 a- Estudio metabólico de los ratones Knock-in SCA7

De manera similar a los pacientes con HD o SCA7, los ratones knock-in SCA7 muestran una pérdida de peso progresiva severa ya significativa al inicio del fenotipo motor. Se ha establecido un protocolo para medir el consumo de alimentos y bebidas en correlación con la evolución del peso de estos ratones mutantes en comparación con los de tipo salvaje. Este protocolo se prueba en un grupo de 3 hembras knock-in y 3 hembras de tipo salvaje de las mismas camadas. Los animales se mantienen uno por jaula y se les da una cantidad definida de alimentos y bebidas. Luego, su ingesta y su peso se miden cuatro veces por semana. Los resultados preliminares muestran que este procedimiento es eficiente para evidenciar la pérdida progresiva de peso y la evolución del consumo de alimentos (figura 7). Poco después del inicio (7-8 semanas) pero antes del deterioro motor grave (8-9 semanas) el consumo de alimentos de animales mutantes es mayor que en el tipo salvaje, aunque ya son más ligeros. Estos datos están a favor de la hipótesis de un estado hipermetabólico durante las primeras fases del fenotipo. Después de 8-9 semanas, el deterioro locomotor ya es tan incapacitante que los ratones mutantes probablemente no puedan alcanzar la comida tan fácilmente como los de tipo salvaje.

#### b- Análisis de micromatrices de modificaciones transcripcionales tempranas

Se ha propuesto que el deterioro metabólico en la HD y otras enfermedades relacionadas son el resultado de la desregulación de las principales vías metabólicas a nivel transcripcional (Mochel 2007 PLoS ONE, 2 (7): e647; Cui 2006 Cell 127: 59-69). Teniendo en cuenta la función de la proteína ATXN7 y las anomalías transcripcionales tempranas previamente evidenciadas en SCA7 y otras enfermedades de poliglutamina, el transcriptoma del cerebelo de 4-5 ratones knock-in versus 4-5 ratones de tipo salvaje se analiza en dos etapas tempranas antes del inicio (día postnatal 10 y día postnatal 22) y una etapa sintomática tardía (11 semanas de edad).

#### 25 Ejemplo 4: Evaluación del beneficio potencial y la seguridad de la terapia anaplerótica en la enfermedad de Huntington (HD)

Se lleva a cabo una prueba preclínica de 5 días con triheptanoína en 6 pacientes afectados de HD. Este protocolo a corto plazo es el siguiente:

1. Día 1: (i) un examen clínico neurológico y general extendido; (ii) un estudio metabólico global (muestras de sangre y orina) para tener una visión general del perfil metabólico de los pacientes con HD al inicio del estudio; (iii) una biopsia de piel para evaluar in vitro la capacidad de la triheptanoína para generar energía a partir del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria; (iv) la medición de la actividad de la proteína quinasa activada por 5'AMP (5'AMPK) en los fibroblastos de los pacientes, como un reflejo de los niveles del metabolismo de la energía intracelular; y (v) una espectroscopía de <sup>31</sup>P-RMN en el músculo de los pacientes para evaluar su producción de ATP del músculo esquelético.

2. Día 2: una prueba de carga oral de una comida enriquecida con triheptanoína, junto con muestras de orina y sangre antes y después de la comida para determinar:

- mediciones de metabolitos de triheptanoína, a través del perfil de acilcarnitinas en plasma y ácidos orgánicos en orina (Roe et al. 2002), para asegurar que la triheptanoína se metabolice adecuadamente en pacientes con HD;

40 - análisis del estado redox mitocondrial, a través de la relación de lactato a piruvato y 3-hidroxiacetato a acetoacetato (Mochel et al. 2005), para evaluar in vivo la capacidad de triheptanoína para generar energía del ciclo de Krebs sin sobrecargar la cadena respiratoria.

3. En los días 3, 4 y 5: la búsqueda de una dieta enriquecida con triheptanoína para determinar si se produce un efecto ahorrador de proteínas, es decir, la normalización de los aminoácidos de cadena ramificada en plasma (BCAA) y los niveles séricos de IGF1, y/o la elevación de la urea urinaria. El examen clínico intenta identificar efectos agudos sobre la deficiencia de energía sistémica (fuerza muscular, función motora) asociada con la HD. Además, los pacientes se someten a una segunda espectroscopía de <sup>31</sup>P-RMN muscular para evidenciar un posible efecto a corto plazo de la triheptanoína en el metabolismo energético periférico de los pacientes.

#### Diseño del estudio

50 El primer día de ingreso, se examinan los pacientes con HD. La disfunción motora se evalúa con la escala de calificación de la enfermedad de Huntington unificada, UHDRS (Siesling et al. 1998), y una puntuación de capacidad funcional total, TFC (Marder et al. 2000). También se registra el estado general de salud, en particular el historial de disfunción del tracto digestivo.

Antes del almuerzo, se recolectan muestras de sangre y orina. Se realizan análisis estándar (recuento de células sanguíneas, factores de coagulación sanguínea, glucosa en sangre y orina, electrolitos séricos), así como un análisis metabólico global que incluye el estado redox en plasma (lactato, piruvato, acetoacetato, 3-hidroxiacetato), aminoácidos y acilcarnitinas en plasma y ácidos orgánicos en orina como se describe (Mochel et al. 2005). En ausencia de disfunción de coagulación de la sangre, se realiza una biopsia de piel. Una prueba funcional simple usando propionato marcado con C<sup>14</sup> se realiza adicionalmente en fibroblastos cultivados (Benoist et al. 2001).

El propionato es uno de los principales productos anapleróticos de la triheptanoína, y se incorpora a la proteína siempre que se produzca suficiente ATP a partir del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. La tasa normal de síntesis de proteínas, después de la incorporación de propionato de C<sup>14</sup>, en las células de la HD, por lo tanto, refleja la integridad de la cadena respiratoria en la HD, así como la posibilidad de generar energía del ciclo de Krebs a través de la vía anaplerótica. La actividad de 5'-AMPK, que detecta cambios en el estado de energía celular, también se determina en los fibroblastos de los pacientes (Chou et al. 2005), para evidenciar un déficit periférico en el metabolismo de la energía intracelular. Además, el metabolismo mitocondrial oxidativo se evalúa específicamente mediante espectroscopía de <sup>31</sup>P-RMN muscular utilizando datos recopilados al final de un ejercicio dado y durante la siguiente recuperación (Lodi et al. 2000).

En el segundo día, los pacientes con HD ingieren una dosis de carga de triheptanoína (1 g/kg). Por conveniencia y mejor tolerancia digestiva, la triheptanoína generalmente se administra junto con un producto lácteo. Se recogen muestras de sangre repetidas antes y, secuencialmente, después de la comida (30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la ingestión de triheptanoína) para evaluar el estado redox y el perfil de acilcarnitinas. También se recolecta orina antes y después de la carga de triheptanoína (90 y 180 minutos) para análisis de ácidos orgánicos.

En los siguientes 3 días siguientes, los pacientes con HD siguen una dieta isocalórica enriquecida con triheptanoína (1g/Kg/día dividido en 3 a 4 comidas). Se analizan diariamente BCAA en plasma en ayunas, IGF1 en suero y urea urinaria y se repite el examen neurológico con puntuación UHDRS y TFC. En el día 5, se repite la espectroscopía de <sup>31</sup>P-RMN muscular para determinar las concentraciones relativas de fosfato inorgánico, fosfocreatina y ATP después de la administración de triheptanoína.

#### Criterios de selección de pacientes

Este estudio implica a 6 pacientes con expansiones de repeticiones CAG anormales (>36) en el gen HD1, con un seguimiento médico y psicológico regular. La selección de pacientes se basa en:

- Puntaje UHDRS de 15 y 50, correspondiente a pacientes en una etapa temprana o moderada de la enfermedad, para facilitar el cumplimiento de los pacientes con el tratamiento dietético;
- bajos niveles de BCAA en plasma, para buscar un aumento en estos aminoácidos bajo el tratamiento con triheptanoína.

Se obtiene el consentimiento informado de todos los participantes.

#### Referencias

- Benoist JF, Acquaviva C, Callebaut I, et al. (2001). "Molecular and structural analysis of two novel mutations in a patient with mut(-) methylmalonyl-CoA deficiency." *Mol Genet Metab* 72 (2): 181-4.
- Chou SY, Lee YC, Chen HM, et al. (2005). "CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model." *J Neurochem* 93 (2): 310-20.
- Lodi R, Schapira AH, Manners D, Styles P, Wood NW, Taylor DJ and Warner TT (2000). "Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy." *Ann Neurol* 48 (1): 72-6.
- Marder K, Zhao H, Myers RH, et al. (2000). "Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group." *Neurology* 54 (2): 452-8.
- Mochel F, DeLonlay P, Touati G, et al. (2005). "Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy." *Mol Genet Metab* 84 (4): 305-12.
- Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F and Brunengraber H (2002). "Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride." *J Clin Invest* 110 (2): 259-69.
- Siesling S, van Vugt JP, Zwinderman KA, Kiebertz K and Roos RA (1998). "Unified Huntington's disease rating scale: a follow up." *Mov Disord* 13 (6): 915-9.

**REIVINDICACIONES**

1. Un precursor de propionil-CoA que contiene un ácido graso de cadena media impar para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad de poliglutamina.
- 5 2. El precursor de propionil-CoA para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad de poliglutamina es la enfermedad de Huntington.
3. El precursor de propionil-CoA para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido graso de cadena media impar es el ácido heptanoico.
4. El precursor de propionil-CoA para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el precursor de propionil-CoA se administra por ingestión de una sustancia alimenticia que contiene dicho precursor.
- 10 5. El precursor de propionil-CoA para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el precursor de propionil-CoA se administra por vía oral, parenteral o intraperitoneal.

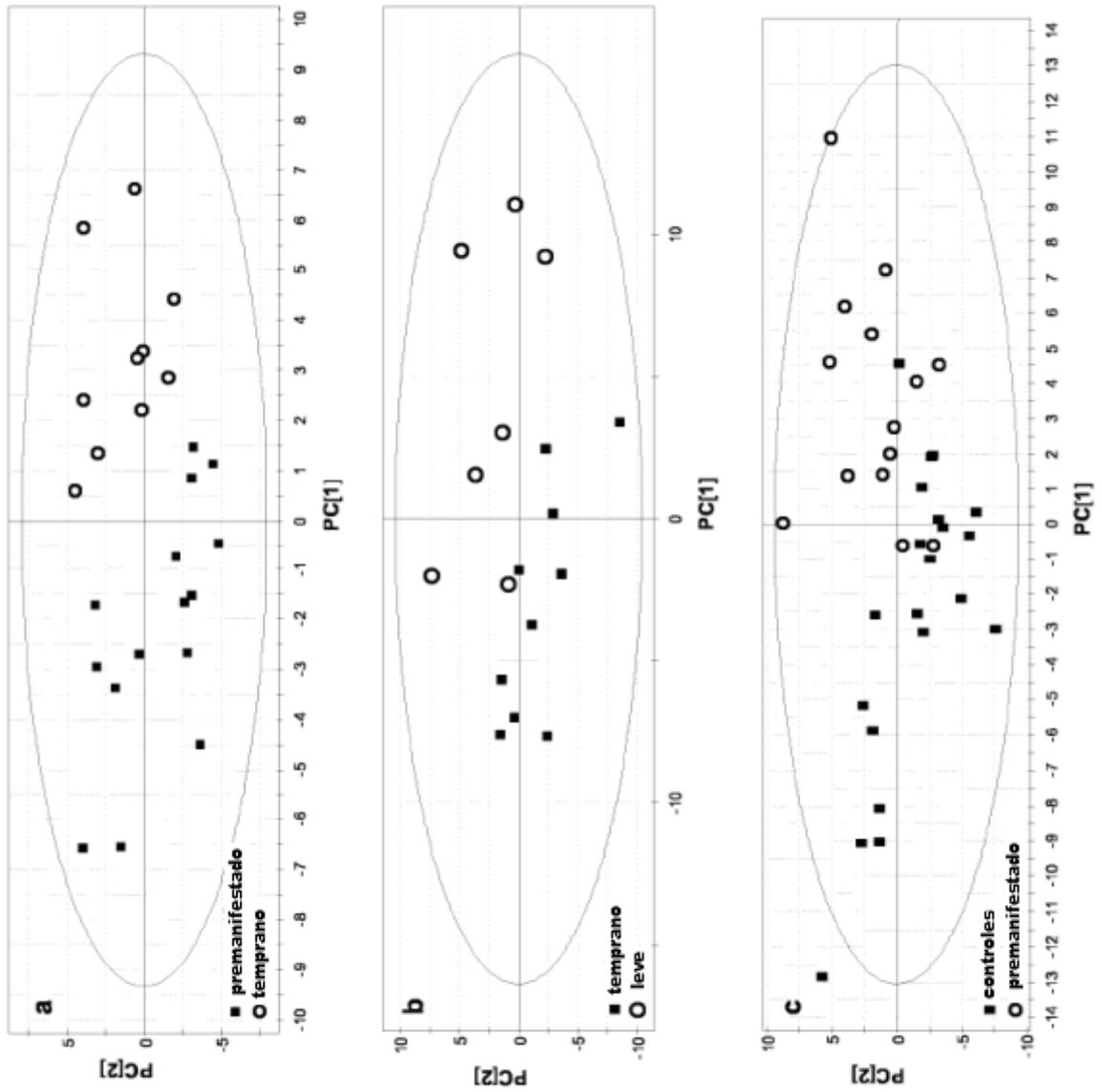


Figura 1

Figura 2

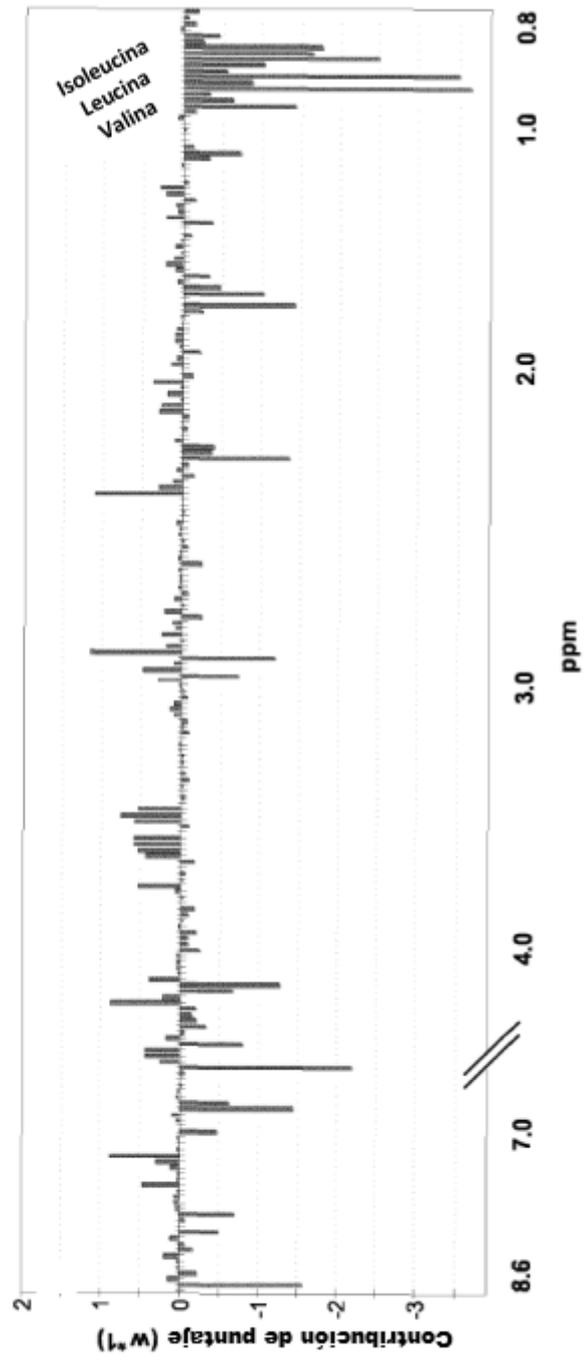
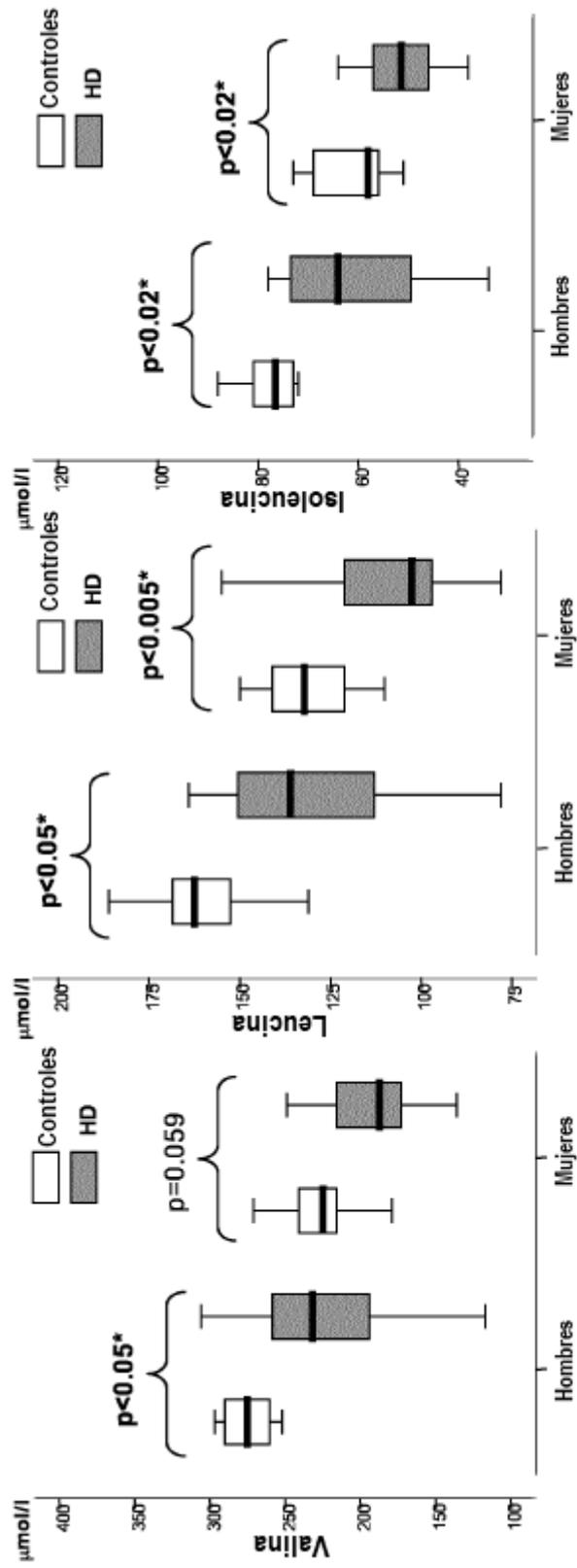


Figura 3



**Figura 4**

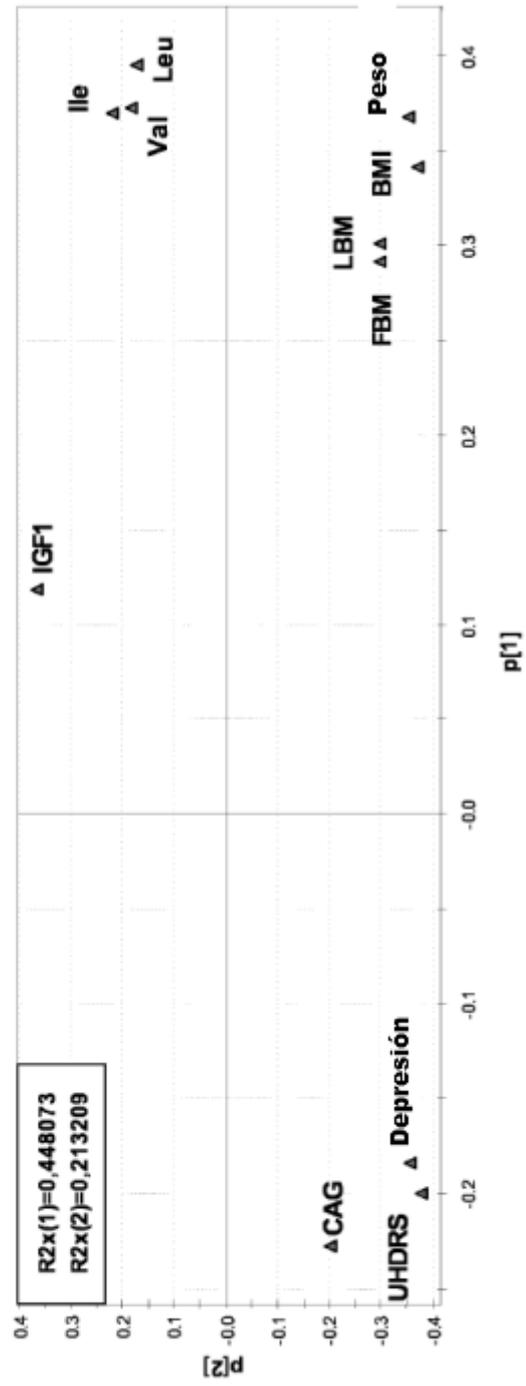


Figura 5

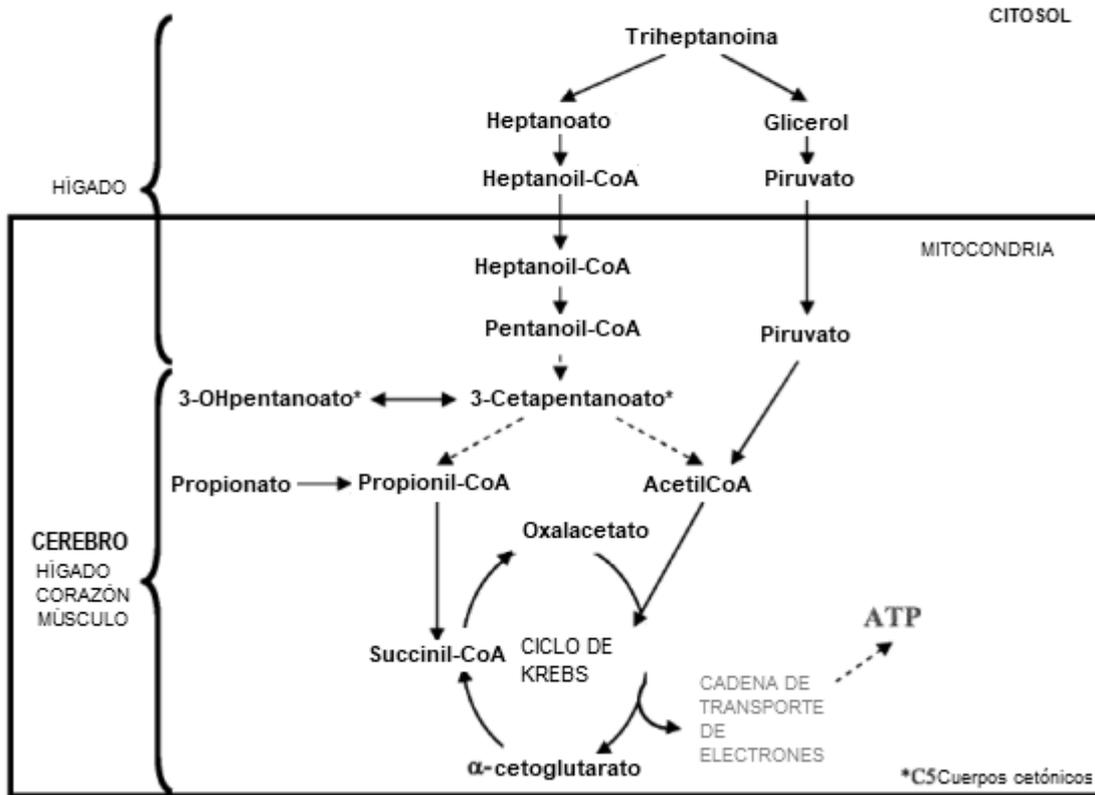


Figura 6

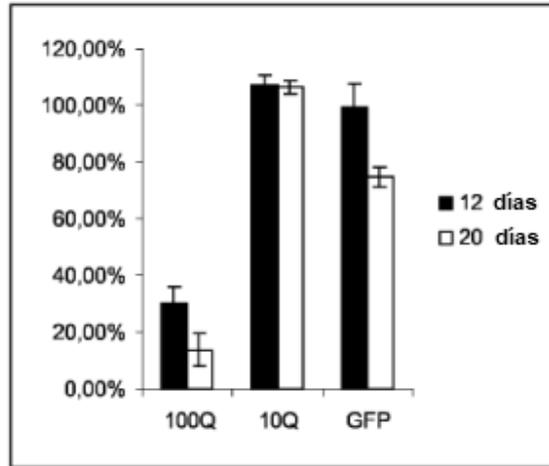


Figura 7

