

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 844 199**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/195**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2014** **PCT/US2014/034142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014** **WO14172341**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2014** **E 14785796 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020** **EP 2986113**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de lesiones cerebrales**

30 Prioridad:

**16.04.2013 US 201361812352 P**  
**27.09.2013 US 201361883526 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.07.2021**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA**  
**(100.0%)**  
**3401 Civic Center Boulevard**  
**Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**COHEN, AKIVA, S.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 844 199 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**

Composiciones y métodos para el tratamiento de lesiones cerebrales

**Campo de la invención**

5 Esta solicitud reivindica prioridad en virtud de 35 U.S.C. §119(e) sobre la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/883.526, presentada el 27 de septiembre de 2013, y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/812.352, presentada el 16 de abril 2013.

Esta invención se realizó con el respaldo del gobierno con las subvenciones n.ºs NS069629 y HD059288 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al alivio de la patología asociada con el daño cerebral, en particular el traumatismo craneoencefálico.

**Antecedentes de la invención**

15 El traumatismo craneoencefálico (TBI) afecta hasta dos millones de personas anualmente en los Estados Unidos y es la principal causa de muerte e incapacidad en adultos jóvenes y niños. El TBI da como resultado deterioro cognitivo de larga duración y actualmente no existen terapias eficaces para mitigar o rectificar esta patología. El TBI provoca a menudo incapacidades duraderas incluyendo alteraciones emocionales, deterioro cognitivo y disfunción de la memoria. Estas deficiencias funcionales resultan de cambios en la excitabilidad de la red del hipocampo que se precipitan por desequilibrios regionales entre la actividad sináptica excitadora e inhibitoria, incluyendo disminución de la excitabilidad de la red en el área CA1 y aumento de la excitabilidad en la circunvolución dentada. Además, 20 tanto el metabolismo neuronal como el astrocítico se alteran tras la lesión, incluyendo acumulación aumentada de lactato y un aumento en el glutamato intracelular, aunque la interacción entre los metabolitos derivados de astrocitos y el metabolismo neuronal tras la lesión no se comprende completamente. Se necesitan nuevos métodos de tratamiento para la inhibición y/o prevención de la patología asociada con traumatismo craneoencefálico.

**Sumario de la invención**

25 Según la presente invención, se proporciona una composición para su uso en métodos para inhibir, reducir, tratar y/o prevenir en un sujeto la patología asociada con traumatismo craneoencefálico. En una realización particular, el método comprende administrar al sujeto al menos un aminoácido de cadena ramificada (BCAA), en particular los tres aminoácidos de cadena ramificada. En una realización particular, los BCAA se administran por vía oral.

30 Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden los aminoácidos de cadena ramificada y, opcionalmente, al menos un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden estar en una forma aceptable por vía oral, tal como un líquido o polvo (por ejemplo, liofilizado).

35 Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones para su uso en métodos para tratar un trastorno del sueño asociado con traumatismo craneoencefálico en un sujeto. Estos métodos comprenden administrar al sujeto al menos un aminoácido de cadena ramificada, en particular valina, leucina e isoleucina. Los aminoácidos de cadena ramificada pueden administrarse en una composición con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como las composiciones orales de la presente invención.

**Breves descripciones de los dibujos**

40 La figura 1 proporciona un gráfico del porcentaje de bloqueo en un ensayo de respuesta condicionada de miedo (CFR) de ratones que reciben dieta de BCAA (tratamiento) o que reciben placebo sin la dieta de BCAA (placebo) durante 2, 3, 4 o 5 días después de lesión por percusión de fluido.

La figura 2 proporciona un gráfico del porcentaje de bloqueo en un ensayo de CFR de ratones que reciben dieta de BCAA durante 10 días (tratamiento), animales con lesión cerebral sin la dieta de BCAA durante 10 días (placebo), o con la dieta de BCAA durante 5 días y luego sin la dieta durante 5 días (5 días +/5 días -) después de lesión por percusión de fluido.

45 La figura 3 proporciona un gráfico del porcentaje de bloqueo en un ensayo de CFR de ratones que reciben dieta de BCAA a 100 mM o 50 mM (tratamiento) o controles sin la dieta de BCAA (placebo) durante 5 días después de lesión por percusión de fluido.

50 La figura 4 proporciona un gráfico del porcentaje de bloqueo en un ensayo de CFR de ratones que reciben dieta de BCAA a través de sonda nasogástrica (tratamiento) o controles sin la dieta de BCAA (placebo) durante 3 o 5 días después de lesión por percusión de fluido.

La figura 5 proporciona un gráfico del porcentaje de bloqueo en un ensayo de CFR de ratones con cirugía simulada,

ratones que reciben triacetato de glicerilo (GTA) a través de sonda nasogástrica después de la lesión (FPI-acetato) o controles sin la dieta de GTA después de la lesión (FPI) durante 5 días después de lesión por percusión de fluido. \*  $P < 0,05$ .

La figura 6A proporciona el cronograma de monitorización de la actividad. Los patrones de actividad se agruparon en puntos de tiempo posoperatorio, agudo, subagudo y crónico después de la lesión o cirugía simulada. La figura 6B muestra que el porcentaje de tiempo de actividad durante la fase de oscuridad disminuye a lo largo de los periodos agudo, subagudo y crónico después del TBI. La duración promedio de cada episodio de inactividad no difirió significativamente entre los grupos (figura 6C). Sin embargo, la duración promedio de cada episodio de actividad disminuyó significativamente después del TBI en los tres puntos de tiempo (figura 6D). Los episodios activos de más de 30 minutos resultaron particularmente afectados después del TBI en las tres fases (figura 6E). El número de transiciones de episodios activos a inactivos aumentó significativamente después del TBI en los tres puntos de tiempo (figura 6F). +  $p < 0,1$ , \* $p < 0,05$ .

La figura 7 proporciona el cronograma experimental para el registro de EEG/EMG.

Las figuras 8A-8D muestran que los registros de EEG de nivel inicial a lo largo de 24 horas muestran alteraciones significativas en los patrones de vigilia y sueño, que mejoran con la intervención de una dieta de BCAA. Los ratones con TBI pasan menos tiempo despiertos y más tiempo en sueño NREM (figura 8A). La figura 8B proporciona hipnogramas representativos de ratones con cirugía simulada, con TBI y con TBI+BCAA. Debe señalarse que la ausencia del periodo de vigilia prolongado a las 19:00 (luces apagadas) en el ratón con TBI se restablece en el ratón con TBI+BCAA. La figura 8C proporciona la distribución de la duración del episodio de vigilia a lo largo del ciclo circadiano y muestra que el TBI acorta significativamente los episodios de vigilia a lo largo de las fases de luz y oscuridad, y se elimina la fluctuación diurna normal en la duración del episodio de vigilia. La figura 8D proporciona la distribución de la duración del episodio de sueño (NREM+REM) a lo largo del ciclo circadiano y muestra episodios de sueño significativamente más cortos en ratones con TBI durante la fase de oscuridad. ZT = tiempo de Zeitgeber; ZT0-3 = 7:00 AM-10:00 AM, ZT13-15 = 7:00 PM-10:00 PM, y así sucesivamente. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Las figuras 9A-9E muestran que el TBI provoca una inestabilidad significativa del estado de comportamiento, que se restablece mediante terapia con BCAA. El TBI aumenta significativamente el número total de transiciones de vigilia a sueño (NREM+REM) durante la fase de oscuridad o la activa (figura 9A). La figura 9B muestra las transiciones subclasificadas por vigilia a NREM (WN), NREM a vigilia (NW), NREM a REM (NR), REM a NREM (RN) y REM a vigilia (RW) durante la fase de luz. La figura 9C muestra las subcategorías de transiciones durante la fase de oscuridad. Debe señalarse que los ratones con TBI tienen más transiciones a y desde la vigilia (WN, NW, RW) y esto se restablece mediante la terapia con BCAA. Además, las diferencias de grupo son más sólidas en la fase de oscuridad en comparación con la fase de luz. Los ratones con TBI tienen episodios de vigilia significativamente más cortos en comparación con los ratones con cirugía simulada, y la terapia con BCAA restablece la distribución de episodios de vigilia prolongados. Las figuras 9D y 9E muestran que las diferencias de grupo en la duración de los episodios de vigilia son más sólidas en la fase de oscuridad en comparación con la fase de luz. +  $p < 0,1$ , \* $p < 0,05$ .

La figura 10A proporciona espectros de potencia de vigilia. Las diferencias de grupo estadístico se indican como una barra negra por encima de las curvas espectrales de potencia desde 7 hasta 24 Hz. Debe señalarse el desplazamiento significativo hacia la izquierda en la frecuencia de pico theta (TPF) después del TBI. La figura 10B proporciona espectros de potencia de NREM. Las diferencias de grupo se indican como una barra negra por encima de las curvas espectrales de potencia desde 7 hasta 24 Hz. La figura 10C proporciona espectros de potencia de REM. Las diferencias de grupo se indican como una barra negra por encima de las curvas espectrales de potencia que oscilan de nuevo entre 7-24 Hz. De nuevo, hay un desplazamiento significativo hacia la izquierda en la TPF después del TBI. Barra negra fina,  $p < 0,10$ , barra negra media,  $p < 0,05$ , barra negra gruesa,  $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,01$ .

La figura 11A muestra que después de colocarse en un entorno novedoso, los ratones con TBI tienen una latencia más corta hasta el primer episodio de sueño que se restaura con terapia con BCAA. La figura 11B muestra el porcentaje de épocas calificadas como vigilia en agrupaciones de 5 minutos calculado, y muestra que los ratones con TBI tienen menos épocas de vigilia a lo largo del estímulo de 2 horas. La terapia con BCAA restablece el estado de vigilia durante el estímulo ambiental novedoso. + $p < 0,10$ .

Las figuras 12A-12D muestran que los ratones con TBI muestran una presión de sueño mayor después de la privación de sueño. Tras un periodo de privación de sueño relativamente corto de 3 horas, los ratones con TBI pasan más tiempo en sueño NREM durante el periodo de recuperación. La terapia con BCAA disminuye el sueño NREM hasta los niveles de la cirugía simulada (figura 12A). La terapia con BCAA también restablece la duración del episodio de NREM hasta los niveles de la cirugía simulada (figura 12B). La figura 12C muestra la potencia delta, que indica una mayor presión de sueño, durante el sueño de recuperación. La figura 12D muestra que los ratones con TBI también tienen un porcentaje menor de estado de vigilia durante el periodo de recuperación después de la privación de sueño. + $p < 0,10$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

La figura 13A proporciona una sección coronal esquemática de un cerebro de ratón que muestra el hipotálamo lateral (LH, recuadro izquierdo), la región donde residen las neuronas de orexina y donde se contaron las células de orexina. El recuadro derecho representa el área representada en microfotografías en las figuras 13D, 13E, y 13F. La

figura 13B proporciona una microfotografía de LH que muestra vesículas presinápticas de glutamato (VGLUT1 inmunomarcaje) en estrecha proximidad a los cuerpos celulares de orexina (inmunomarcaje de orexina A) a 40x. La figura 13C proporciona la cuantificación de neuronas de orexina positivas para Fos, que son un marcador de la activación neuronal después del estímulo de vigilia de 3 horas, que muestra activación de orexina significativamente disminuida después del TBI, en comparación con los ratones con cirugía simulada, que se restablece con terapia con BCAA ( $F=22,47$ ,  $p<0,0001$ ; TBI frente a cirugía simulada  $p<0,001$ , TBI frente a TBI+BCAA  $p<0,01$ ; ANOVA de un factor seguido por pruebas de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett). La figura 13D, 13E, y 13F proporcionan fotos representativas de LH de ratones con cirugía simulada, TBI y TBI+BCAA que muestran colocalización de orexina con Fos a 20x. f = trigono cerebral. Barra de escala = 50  $\mu$ m. \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

## Descripción detallada de la invención

Los estudios en ratones han demostrado que el hipocampo, una estructura cerebral implicada en el aprendizaje y la memoria y que a menudo se lesiona en una conmoción cerebral, tiene niveles reducidos de los tres aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), valina, isoleucina y leucina, después de un traumatismo craneoencefálico. La administración en la dieta de BCAA restableció las concentraciones de estos aminoácidos en el hipocampo lesionado y restableció la función cognitiva hasta niveles no significativamente diferente a los de los animales no lesionados.

Se ha estudiado ampliamente la administración en la dieta de BCAA en personas sanas y en una variedad de estados de enfermedad a lo largo de muchas décadas (Fernstrom, J.D. (2005) *J. Nutr.*, 135:1539S-1546S). La terapia con BCAA se ha estudiado en lo que se refiere a la fisiología del ejercicio, la patología hepática y diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos (Richardson *et al.* (2003) *Am. J. Psychiatry* 160:1117-1124; Richardson *et al.* (1999) *Psychopharmacol.*, 143:358-364; Tandan *et al.* (1996) *Neurology* 47:1220-1226; Mori *et al.* (2002) *J. Neurol. Sci.*, 195:149-152; Mori *et al.* (1999) *Intern. Med.*, 38:401-406; Scarna *et al.* (2003) *Br. J. Psychiatry* 182:210-213). Se han tratado pacientes con BCAA en duraciones de tiempo variables incluyendo de manera crónica durante más de 2 años (Muto *et al.* (2005) *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3:705-713). Los BCAA se han administrado por vía oral y como infusión intravenosa (Aquilani *et al.* (2005) *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 86:1729-1735; Aquilani *et al.* (2008) *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 89:1642-1647; Kirvela *et al.* (1998) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 60:77-82). La dosificación usada en estos estudios previos oscila entre algunos gramos por día hasta más de 100 g/d (Tangkijvanich *et al.* (2000) *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31:152-157; Kuroda *et al.* (2010) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 25:1550-1555). Por ejemplo, se ha demostrado que dosis orales de 60 g/d son eficaces para reducir los síntomas de manía (Scarna *et al.* (2003) *Br. J. Psychiatry* 182:210-213). También se han observado beneficios en la discinesia tardía (~15 g/d), degeneración espinocerebelosa (6 g/d), anorexia en pacientes con cáncer (14 g/d) y encefalopatía hepática (la mediana de la cantidad de BCAA en 11 ensayos aleatorizados fue de 28 g/d, con el intervalo de 11 a 57 g/d) (Richardson *et al.* (2003) *Am. J. Psychiatry* 160:1117-1124; Richardson *et al.* (1999) *Psychopharmacol.*, 143:358-364; Mori *et al.* (2002) *J. Neurol. Sci.*, 195:149-152; Mori *et al.* (1999) *Intern. Med.*, 38:401-406; Cangiano *et al.* (1996) *J. Natl. Cancer Inst.*, 88:550-552; Als-Nielsen *et al.* (2003) *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2003:CD001939).

Varios artículos de revisión han examinado estos estudios y han resumido los acontecimientos adversos infrecuentes (Als-Nielsen *et al.* (2003) *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2003:CD001939; Fernstrom, J.D. (2005) *J. Nutr.*, 135:1539S-1546S). En general, los BCAA se toleran bien y están asociados con efectos secundarios mínimos o nulos. Hay informes de efectos secundarios gastrointestinales leves, tales como distensión abdominal, diarrea y estreñimiento. No se han notificado efectos secundarios graves o potencialmente mortales. Estos estudios indican que los seres humanos pueden consumir BCAA en cantidades considerables sin efectos adversos y, en algunos casos, con beneficio significativo para las poblaciones de estudio. De hecho, los deportistas ya consumen BCAA como suplementos nutricionales de venta libre para aumentar su programa de ejercicios.

Hay varios estudios clínicos sobre el uso de BCAA en niños. Los estudios para determinar las necesidades medias de BCAA en niños sanos en edad escolar y niños con enfermedad hepática colestásica de leve a moderada se realizaron administrando a los niños cantidades variables de BCAA (Mager *et al.* (2003) *J. Nutr.*, 133:3540-3545; Mager *et al.* (2006) *J. Nutr.*, 136:133-139). Se han administrado BCAA de forma segura a niños con fenilcetonuria en un intento por inhibir la entrada de fenilalanina en el cerebro y reducir sus efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central (Berry *et al.* (1982) *Ped. Res.*, 16:751-755; Berry *et al.* (1990) *Am. J. Dis. Child.*, 144:539-543; Jordan *et al.* (1985) *Dev. Med. Child Neurol.*, 27:33-39). También se han observado efectos beneficiosos cuando niños con enfermedad hepática en fase terminal en espera de trasplante se alimentan con una fórmula enriquecida con BCAA en comparación con una fórmula convencional (Chin *et al.* (1992) *Amer. J. Clin. Nutr.*, 56:158-163; Chin *et al.* (1990) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 5:566-572). Los síntomas de la discinesia tardía se redujeron en niños y adolescentes tras el tratamiento con BCAA, y niños epilépticos tratados con hasta 20 g/d de BCAA conjuntamente con una dieta cetogénica mostraron reducción en la frecuencia de las convulsiones y una mejora en el comportamiento y el funcionamiento cognitivo (Richardson *et al.* (2004) *J. Clin. Psychiatry* 65:92-96; Evangelidou *et al.* (2009) *J. Child Neurology* 24:1268-1272). En todos los estudios de niños y adolescentes tratados con BCAA, los suplementos se toleraron bien y no tuvieron efectos secundarios.

Un número limitado de estudios han examinado la eficacia de los BCAA en seres humanos después del TBI. Un estudio evaluó las concentraciones plasmáticas de aminoácidos en pacientes ingresados en un centro de

rehabilitación aproximadamente dos meses después del TBI y encontraron niveles significativamente reducidos de BCAA, entre otros aminoácidos, en relación con los controles no lesionados de edad equivalente (Aquilani *et al.* (2000) Arch. Phys. Med. Rehab., 81:176-181). Un estudio de seguimiento en una cohorte posterior de pacientes con TBI encontró que las concentraciones plasmáticas de aminoácidos todavía estaban reducidas 120 días después de la lesión, motivado principalmente por los niveles de más bajos de valina (Aquilani *et al.* (2003) Arch. Phys. Med. Rehab., 84:1258-1265). Un trabajo del mismo grupo demostró que BCAA intravenosos administrados a pacientes en la fase de rehabilitación después de TBI grave mejoraron las puntuaciones de escala de clasificación de incapacidad cuando se comparó con placebo (Aquilani *et al.* (2005) Arch. Phys. Med. Rehab., 86:1729-1735). Adicionalmente, demostraron que los BCAA podrían mejorar la recuperación de un estado vegetativo o mínimamente consciente tras traumatismo (Aquilani *et al.* (2008) Arch. Phys. Med. Rehab., 89:1642-1647).

La presente invención proporciona una composición rica en BCAA, en particular un producto que puede consumirse líquido, para el tratamiento de deterioro cognitivo asociado con conmoción cerebral. En una realización particular, la composición comprende valina, leucina e isoleucina en cantidades aproximadamente equivalentes (por ejemplo, una razón de 1:1:1). La cantidad de BCAA puede determinarse, por ejemplo, en peso o cantidad molar. Aunque los BCAA a menudo estarán presentes en cantidades equivalentes, las composiciones de la presente invención pueden comprender cantidades en exceso de uno o dos de los BCAA. Por ejemplo, la composición puede comprender hasta diez veces, hasta cinco veces, o hasta tres veces exceso de uno o dos aminoácidos ramificados de aminoácido en comparación con otra. Por ejemplo, la composición puede comprender valina en exceso.

Los aminoácidos de cadena ramificada son aminoácidos que tienen una bifurcación o ramificación en la cadena lateral. Los aminoácidos de cadena ramificada incluyen leucina, isoleucina y valina y precursores o análogos de los mismos. Los BCAA pueden administrarse en sus formas libres o sales de los mismos, como dipéptidos, tripéptidos, polipéptidos (por ejemplo, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 aminoácidos), y/o proteínas ricas en BCAA (por ejemplo, proteínas que comprenden al menos el 25 %, al menos el 50 % o al menos el 75 % o más de contenido en BCAA). En una realización particular, los dipéptidos y tripéptidos y polipéptidos pueden incluir dos o más BCAA. Cuando se incluyen aminoácidos distintos de BCAA en un dipéptido, tripéptido o polipéptido, los aminoácidos distintos de BCAA pueden ser cualquier aminoácido, en particular alanina y/o glicina. Los ejemplos de dipéptidos incluyen, sin limitación: isoleucil-leucina, leucil-alanina, alanil-leucina, alanil-isoleucina, alanil-valina, glicil-leucina, glicil-isoleucina y glicil-valina.

Los precursores de leucina, tales como piruvato, y metabolitos, tales como  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato y  $\alpha$ -cetoisocaproato, muestran propiedades similares a las de la leucina. Estos compuestos pueden administrarse como BCAA, ya que se convierten en los BCAA mencionados anteriormente *in vivo*.

En una realización particular, la composición comprende de manera independiente desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, desde aproximadamente 5 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, desde aproximadamente 10 mg/ml hasta aproximadamente 20 mg/ml, desde aproximadamente 13 mg/ml hasta aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 16 mg/ml de cada uno de los tres BCAA.

En una realización particular, se administran al sujeto al menos aproximadamente 40 g, al menos aproximadamente 50 g, al menos aproximadamente 60 g, al menos aproximadamente 70 g, o más de BCAA por día. En una realización particular, se administran de aproximadamente 40 g a aproximadamente 100 g de BCAA al día, en particular de aproximadamente 60 g a aproximadamente 100 g, de aproximadamente 60 g a aproximadamente 75 g, o aproximadamente 60 g. Teniendo en cuenta el peso del sujeto, se administran al sujeto al menos aproximadamente 40 g/70 kg, al menos aproximadamente 50 g/70 kg, al menos aproximadamente 60 g/70 kg, al menos aproximadamente 70 g/70 kg, o más de BCAA por día. En una realización particular, se administran de aproximadamente 40 g/70 kg a aproximadamente 100 g/70 kg de BCAA al día, en particular de aproximadamente 60 g/70 kg a aproximadamente 100 g/70 kg, de aproximadamente 60 g/70 kg a aproximadamente 75 g/70 kg, o aproximadamente 60 g/70 kg. Los BCAA pueden administrarse en más de una dosificación hasta alcanzar el objetivo diario (por ejemplo, administrados dos veces, tres veces, cuatro veces o más al día).

Las composiciones que comprenden grandes cantidades de aminoácidos de cadena ramificada no tienen sabor agradable para muchos sujetos, en particular para los seres humanos. Por consiguiente, las composiciones de la presente invención comprenden al menos un agente de enmascaramiento del sabor, en particular un bloqueante del receptor del sabor amargo. En una realización particular, el agente de enmascaramiento del sabor es una sal de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen, sin limitación, ácido glucurónico y ácido láctico. Las sales adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, lactato de calcio, lactato de magnesio, lactato de sodio, gluconato de calcio, gluconato de magnesio y gluconato de sodio. En una realización particular, el agente de enmascaramiento del sabor es gluconato de sodio.

En una realización particular, el agente de enmascaramiento del sabor está presente en la composición en aproximadamente 5 g, en aproximadamente 10 g, en aproximadamente 15 g, en aproximadamente 20 g, o más por 30 g de BCAA. En una realización particular, la composición comprende al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 75 mM, al menos aproximadamente 100 mM, o más del agente de enmascaramiento del sabor. Las composiciones también pueden comprender al menos un edulcorante. Puede usarse cualquier edulcorante natural o artificial. Los ejemplos de edulcorantes incluyen, sin limitación, sacarosa, fructosa, maltosa,

dextrosa, sucralosa, aspartamo, sacarina, y similares. En una realización particular, el edulcorante es sucralosa.

En una realización particular, el edulcorante está presente en la composición en aproximadamente 2 g, en aproximadamente 5 g, en aproximadamente 10 g, en aproximadamente 15 g, o más por 30 g de BCAA. En una realización particular, la composición comprende al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 35 mM, o más del edulcorante.

Las composiciones también pueden comprender al menos un agente saborizante. En la presente invención puede usarse cualquier agente saborizante natural o sintético. Pueden usarse uno o más agentes saborizantes para potenciar la palatabilidad de las composiciones. El agente saborizante puede ser una emulsión, un concentrado, líquido soluble en aceite o acuoso, polvo seco, o una combinación de los mismos. En una realización particular, el agente saborizante es un concentrado o polvo. En una realización particular, el agente saborizante es un sabor a frutas. En una realización particular, el agente saborizante es un polvo concentrado (por ejemplo, polvo de ponche tropical sin azúcar KoolAid®).

Los métodos de la presente invención pueden comprender además la administración de acetato. Las composiciones de la presente invención también pueden comprender acetato. El acetato puede administrarse al sujeto como ácido acético o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como acetato de calcio. En una realización particular, el acetato se administra en forma hidrófoba, tal como triacetato de glicerilo (GTA; el triéster de glicerol de acetato). Se ha demostrado que el GTA puede usarse como suplemento en la dieta para aumentar los niveles de acetato en el cerebro en más de 15 veces en el plazo de una hora de administración (Mathew *et al.* (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315:297-303). En una realización particular, se administran diariamente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de GTA, en particular de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 7,5 mg/kg, o aproximadamente 5 mg/kg.

En una realización particular, la composición de la presente invención comprende 10 g de valina, 10 g de leucina, 10 g de isoleucina, 13 g de gluconato de sodio, 9 g de sucralosa y un concentrado de sabor en 630 ml de agua. La composición puede comprender además acetato (por ejemplo, 175 mg de GTA). Las composiciones de la presente invención pueden tener la misma razón de componentes ( $\pm 5\%$ ) en diferentes volúmenes de agua.

Tal como se usa en el presente documento, "traumatismo craneoencefálico" o "TBI" se refiere a una lesión cerebral adquirida o un traumatismo craneal, cuando un traumatismo produce daño al cerebro. Traumatismo incluye, por ejemplo, traumatismo en la parte posterior de la cabeza, traumatismo por impacto y otros traumatismos en la cabeza tales como, por ejemplo, traumatismos producidos por accidentes y/o lesiones deportivas, lesiones por conmoción cerebral, heridas penetrantes en la cabeza, tumores cerebrales, accidente cerebrovascular, ataque cardíaco, meningitis, encefalitis vírica, y otros estados que privan al cerebro de oxígeno. En una realización preferida, el traumatismo es una fuerza física externa.

El daño puede ser focal (limitado a un área del cerebro) o difuso (que implica más de un área del cerebro). Clínicamente, el traumatismo craneoencefálico puede clasificarse como leve, moderado o grave, basándose en variables del TBI que incluyen la duración de la pérdida de conocimiento (LOC), puntuación de coma de Glasgow (GCS; por ejemplo, leve 13-15; moderado = 9-12; grave =  $\leq 8$ ) y amnesia por estrés postraumático (véase, por ejemplo, Levin *et al.* (1979) *J. Nervous Mental Dis.*, 167:675-84; Holm *et al.* (2005) *J. Rehabil. Med.*, 37:137-41). En una realización particular, el TBI es leve o moderado.

En algunas realizaciones, el traumatismo craneoencefálico puede ser crónico, cuando el cerebro se somete a lesión por traumatismo repetido en el cerebro. En general, el traumatismo craneoencefálico crónico normalmente es una forma de leve a moderada de lesión cerebral cerrada que un sujeto (por ejemplo, un deportista) sufre de manera repetida, dando como resultado un aumento de la incidencia de deterioros motores, cognitivos y/o del comportamiento afectados de meses a años tras los acontecimientos de traumatismo craneoencefálico. Los individuos sometidos a una lesión cerebral crónica de este tipo parecen presentar un aumento de la sensibilidad a determinados trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la encefalopatía por traumatismo crónico (CTE) y/o la enfermedad de Parkinson.

En algunas realizaciones, el traumatismo craneoencefálico puede resultar de un traumatismo craneal cerrado. El traumatismo craneal cerrado puede ser transitorio o prolongado. Un "traumatismo craneal cerrado" se refiere a una lesión cerebral cuando la cabeza se golpea de manera repentina y violenta contra un objeto, pero el objeto no produce rotura del cráneo. En algunas realizaciones, el traumatismo craneal cerrado es una conmoción cerebral o contusión. Una conmoción cerebral es una forma leve de traumatismo craneoencefálico que da como resultado el deterioro temporal de la función neurológica que se resuelve rápidamente por sí misma, y donde generalmente no hay cambios estructurales macroscópicos en el cerebro como resultado del estado. Una contusión es un área diferenciada de tejido cerebral hinchado mezclado con sangre liberada de vasos sanguíneos rotos. Una contusión también puede producirse en respuesta a la sacudida del cerebro hacia delante y hacia atrás dentro de los límites del cráneo, una lesión denominada "contragolpe". Tal como se usa en el presente documento, un traumatismo craneal cerrado se refiere a una lesión debida a un traumatismo físico, externo y no engloba la lesión cerebral que resulta de fuerzas "internas" tales como isquemia/reperfusión y accidente cerebrovascular.

Los trastornos del sueño son una patología común asociada con traumatismo craneoencefálico y pueden afectar significativamente a la rehabilitación cognitiva. A continuación en el presente documento, se usó un modelo de ratón bien establecido de lesión cerebral leve (es decir, lesión por percusión de fluido lateral) que recapitula las alteraciones crónicas del sueño observadas en el estado en seres humanos. Los ratones con lesión cerebral demuestran una incapacidad persistente para mantener el estado de vigilia y fragmentación grave del ciclo de sueño-vigilia. Los análisis espectrales de potencia de EEG muestran un cambio a frecuencias theta pico más lentas. Cuando se colocan en un entorno novedoso, los ratones con lesión tienen una latencia más corta y una mayor presión para dormir. La alteración del sueño inducida por TBI se asemeja al fenotipo narcoléptico, y el neuropéptido orexina (también conocido como hipocretina) se ha implicado en ambos trastornos. Los ratones con lesión cerebral muestran una activación significativamente menor de las neuronas de orexina en respuesta al estado de vigilia sostenido. Para mejorar la patología inducida por TBI, incluyendo la activación de neuronas de orexina, se administró a los ratones un suplemento en la dieta que consistía en aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) que son precursores de la síntesis *de novo* del glutamato en el cerebro. La terapia con BCAA restauró la activación de neuronas de orexina en ratones con lesión y restableció el estado de vigilia al aumentar el tiempo de vigilia, consolidar los episodios de sueño y vigilia y aumentar la activación cerebral durante estímulos de vigilia. Los datos identifican mecanismos novedosos subyacentes a las alteraciones del sueño en un modelo de TBI leve e indican que la intervención de BCAA, que probablemente actúa en parte a través de la orexina, puede normalizar las alteraciones del sueño inducidas por lesiones y, por tanto, facilitar la rehabilitación cognitiva.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o inhibir un trastorno del sueño asociado con un traumatismo craneoencefálico. Los métodos comprenden administrar aminoácidos de cadena ramificada a un sujeto que ha sufrido un traumatismo craneoencefálico. Los trastornos del sueño asociados con un traumatismo craneoencefálico se conocen generalmente en la técnica (véase, por ejemplo, Kushner, D. (1998) Arch. Intern. Med. 158: 1617-24; Parsons *et al.* (1982) Nurs. Res. 31: 260-264; Viola-Saltzman *et al.* (2012) Neurol. Clin., 30: 1299-312; Castriotta *et al.* (2011) CNS Drugs 25: 175-85). En una realización particular, el trastorno del sueño es un problema/alteración con el inicio y/o mantenimiento del sueño (por ejemplo, fragmentación del ciclo de sueño-vigilia). Los ejemplos de trastornos del sueño asociados con un traumatismo craneoencefálico incluyen, sin limitación, insomnio (por ejemplo, dificultad para conciliar el sueño y/o permanecer dormido), fatiga, somnolencia, apnea del sueño, narcolepsia y/o somnolencia (por ejemplo, somnolencia diurna excesiva). Los trastornos del sueño pueden diagnosticarse mediante cualquier medio, tal como un estudio del sueño, polisomnografía, pruebas de latencia múltiple del sueño, pruebas de mantenimiento del estado de vigilia y/o actigrafía. Los métodos de la presente invención pueden comprender además examinar/diagnosticar al paciente por un trastorno del sueño después del traumatismo craneoencefálico y antes del tratamiento. Los métodos también pueden comprender además examinar/diagnosticar al paciente por un trastorno del sueño tras el traumatismo craneoencefálico y después del tratamiento. El tratamiento con los BCAA puede interrumpirse una vez que se ha resuelto el trastorno del sueño.

Tal como se indicó anteriormente, los métodos comprenden administrar aminoácidos de cadena ramificada a un sujeto que ha sufrido un traumatismo craneoencefálico. Los BCAA pueden administrarse antes, durante y/o después del traumatismo craneoencefálico. Por ejemplo, los BCAA pueden administrarse al sujeto antes de sufrir un traumatismo craneoencefálico (por ejemplo, antes de participar en una actividad con una mayor probabilidad de sufrir un traumatismo craneoencefálico, tal como participar en un deporte de contacto (por ejemplo, hockey, fútbol, rugby, etc.). La terapia con BCAA puede administrarse al sujeto después de sufrir la lesión. En una realización particular, al sujeto se le administra terapia BCAA (por ejemplo, diariamente) antes de dormir (por ejemplo, en el plazo de aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 1 hora).

Los BCAA pueden administrarse al sujeto mediante cualquier medio. En una realización particular, los BCAA se administran en un producto que puede consumirse líquido (por ejemplo, las composiciones de sabor agradable/bebibles descritas anteriormente en el presente documento). Los BCAA administrados al sujeto pueden incluir uno, dos, o los tres de valina, leucina e isoleucina. En una realización particular, se administran valina, leucina e isoleucina en cantidades aproximadamente equivalentes (por ejemplo, una razón 1:1:1). La cantidad de BCAA puede determinarse, por ejemplo, en peso o cantidad molar. Aunque los BCAA a menudo se administrarán en cantidades equivalentes, pueden administrarse cantidades en exceso de uno o dos de los BCAA. Por ejemplo, puede administrarse un exceso de hasta diez veces, hasta cinco veces, o hasta tres veces de uno o dos aminoácidos en comparación con otros. Por ejemplo, puede administrarse valina en exceso en comparación con leucina y/o isoleucina.

Tal como se explicó anteriormente en el presente documento, los BCAA pueden administrarse en sus formas libres o sales de los mismos, como dipéptidos, tripéptidos, polipéptidos (por ejemplo, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 aminoácidos), y/o proteínas ricas en BCAA (por ejemplo, proteínas que comprenden al menos el 25 %, al menos el 50 %, o al menos el 75 % o más de contenido en BCAA). Los BCAA pueden aislarse. En una realización particular, los dipéptidos, tripéptidos y polipéptidos pueden incluir dos o más BCAA. Cuando se incluyen aminoácidos distintos de BCAA en un dipéptido, tripéptido o polipéptido, los aminoácidos distintos de BCAA pueden ser cualquier aminoácido, en particular alanina y/o glicina. Los ejemplos de dipéptidos incluyen, sin limitación: isoleucil-leucina, leucil-alanina, alanil-leucina, alanil-isoleucina, alanil-valina, glicil-leucina, glicil-isoleucina, y glicil-valina.

Los precursores de leucina, tales como piruvato, y metabolitos, tales como  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato y  $\alpha$ -cetioisocaproato, muestran propiedades similares a las de la leucina. Estos compuestos pueden administrarse como BCAA, ya que se convierten en los BCAA mencionados anteriormente *in vivo*.

- 5 En una realización particular, se administran al sujeto al menos aproximadamente 40 g, al menos aproximadamente 50 g, al menos aproximadamente 60 g, al menos aproximadamente 70 g, o más de BCAA por día. En una realización particular, se administran de aproximadamente 40 g a aproximadamente 100 g de BCAA al día, en particular de aproximadamente 60 g a aproximadamente 100 g, de aproximadamente 60 g a aproximadamente 75 g, o aproximadamente 60 g. Teniendo en cuenta el peso del sujeto, se administran al sujeto al menos aproximadamente 40 g/70 kg, al menos aproximadamente 50 g/70 kg, al menos aproximadamente 60 g/70 kg, al menos aproximadamente 70 g/70 kg, o más de BCAA por día. En una realización particular, se administran de aproximadamente 40 g/70 kg a aproximadamente 100 g/70 kg de BCAA al día, en particular de aproximadamente 60 g/70 kg a aproximadamente 100 g/70 kg, de aproximadamente 60 g/70 kg a aproximadamente 75 g/70 kg, o aproximadamente 60 g/70 kg. Los BCAA pueden administrarse en más de una dosificación hasta alcanzar el objetivo diario (por ejemplo, administrados dos veces, tres veces, cuatro veces o más al día).
- 10
- 15 En una realización particular, los BCAA se administran inmediatamente o poco después del acontecimiento de traumatismo craneoencefálico. Por ejemplo, los BCAA se administran al menos en el plazo de un mes después de la lesión, en el plazo de dos semanas después de la lesión, en el plazo de aproximadamente los primeros 2, 3, 4 o 7 días después de la lesión, en el plazo de aproximadamente los primeros día después de la lesión, o en el plazo de aproximadamente la primera hora después de la lesión. En una realización particular, los BCAA se administran en el
- 20 plazo de aproximadamente los primeros 2 días de la lesión. Los BCAA pueden administrarse de manera continua (por ejemplo, todos los días) después de la lesión durante al menos una semana, en particular al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas o más.

#### I. Definiciones

- 25 Las formas en singular “un,” “una” y “el/la” incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Tal como se usa en el presente documento, “deterioro cognitivo” se refiere a un déficit adquirido en al menos uno de los siguientes: función de memoria, resolución de problemas, orientación y abstracción. La deficiencia generalmente afecta la capacidad de un individuo para funcionar de manera independiente.

- 30 El término “sustancialmente puro” se refiere a una preparación que comprende al menos el 50-60 % en peso de un material dado (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). Más preferiblemente, la preparación comprende al menos el 75 % en peso y lo más preferiblemente el 90-95 % en peso del compuesto dado. La pureza se mide mediante métodos apropiados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, análisis mediante HPLC y similares).

- 35 El término “aislado” no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental, y que puedan estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta, o a la adición de estabilizadores.

“Farmacéuticamente aceptable” indica la aprobación de una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más en particular en seres humanos.

- 40 Un “portador” se refiere, por ejemplo, un diluyente, conservante, antioxidante, solubilizante, emulsionante, adyuvante, excipiente, sustancias de carga, agente auxiliar o vehículo con el que se administra un agente activo de la presente invención. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Preferiblemente se emplean como portadores agua o soluciones salinas acuosas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para disoluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados, por ejemplo, en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin.
- 45

El término “patología” se refiere a cualquier desviación de un estado sano o normal, tal como una enfermedad, un trastorno, un síndrome o cualquier estado médico anómalo.

- 50 El término “tratar” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de tratamiento que confiere un beneficio a un paciente que padece una lesión (por ejemplo, TBI), incluyendo la mejora en el estado del paciente (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la evolución del estado, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término “prevenir” se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que está en riesgo de desarrollar un estado y/o de sufrir una lesión (por ejemplo, TBI) dando como resultado una disminución en la probabilidad de que el sujeto desarrolle estados asociados con la lesión.

55

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto o una composición farmacéutica se refiere a una cantidad eficaz para prevenir, inhibir o tratar una lesión particular y/o los síntomas de la misma. Por ejemplo, “cantidad terapéuticamente eficaz” puede referirse a una cantidad suficiente para modular el traumatismo craneoencefálico asociado a patología en un paciente.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un animal, en particular un mamífero, en particular un ser humano.

## II. Administración

- 10 Los agentes de la presente invención usados para tratamiento, inhibición, reducción y/o prevención de los síntomas y/o la patología asociados con el traumatismo craneoencefálico (por ejemplo, deterioro cognitivo, aumento en la tasa de convulsiones) pueden administrarse a un paciente por vía oral, tal como una preparación líquida que puede consumirse o farmacéutica. El término “paciente” tal como se usa en el presente documento se refiere a sujetos humanos o animales.

- 15 La presente invención engloba composiciones que comprenden BCAA y, opcionalmente, al menos un portador farmacéuticamente aceptable u otro componente tal como se describió anteriormente en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión y similares que pueden ser apropiados para la vía de administración deseada de la preparación farmacéutica. Se conoce en la técnica el uso de tales medios para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las moléculas que van a administrarse, se contempla su uso en la preparación farmacéutica.

- 20 Las composiciones que comprenden al menos uno de los agentes de la presente invención pueden formularse convenientemente para su administración con un portador farmacéuticamente aceptable. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente los límites de los agentes dentro del portador farmacéuticamente aceptable particular.

- 25 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral. La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse, por ejemplo, en forma líquida (incluyendo la forma líquida concentrada que requiere dilución (por ejemplo, con agua) antes del consumo), o puede estar en forma de polvo seco (por ejemplo, liofilizado para reconstitución posterior (por ejemplo, con agua). Las formas de dosificación para administración oral incluyen, sin limitación, comprimidos (por ejemplo, recubiertos y no recubiertos, masticables), cápsulas de liberación sostenida, cápsulas de gelatina (por ejemplo, blandas o duras), disoluciones, bebidas, concentrados, emulsiones, suspensiones, jarabes, elixires y polvos/gránulos (por ejemplo, reconstituibles o dispersables).

- 30 Los BCAA de la presente invención también pueden administrarse por vía nasal (por ejemplo, a través de bomba nasal, nebulización nasal, gotas nasales, etc.). Por ejemplo, una composición que comprende los BCAA puede administrarse como una formulación en aerosol que contiene los BCAA en forma disuelta, suspendida o emulsionada en un propelente o una mezcla de disolvente y propelente. La formulación en aerosol se administra entonces a través del sistema respiratorio o las fosas nasales. Una formulación en aerosol usada para administración nasal puede ser una solución acuosa diseñada para administrarse a las fosas nasales en gotas o nebulización. Las disoluciones nasales también pueden administrarse sin propelente, por ejemplo, a través de gotas nasales, nebulización o niebla (por ejemplo, un nebulizador atomizado). Las disoluciones nasales se preparan generalmente para que sean similares a las secreciones nasales y generalmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, aunque también pueden usarse valores de pH fuera de este intervalo (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8). También pueden incluirse en la formulación agentes antimicrobianos o conservantes.

- 45 Las composiciones farmacéuticas que contienen agentes de la presente invención como principio activo en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable pueden prepararse según técnicas convencionales de composición farmacéutica. El portador puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral.

- 50 Los compuestos/composiciones de la presente invención también pueden encapsularse dentro de un material protector (por ejemplo, uno que sea de naturaleza polimérica o uno que esté basado en lípidos (por ejemplo, liposomas o micelas)). El sistema de administración polimérico de fármacos puede ser de naturaleza coloidal o no coloidal y puede estar compuesto por materiales poliméricos biodegradables o no biodegradables. Las estructuras de encapsulación poliméricas coloidales incluyen, sin limitación, micropartículas, microesferas, nanopartículas y nanoesferas, micelas de copolímeros de bloque y similares. En una realización particular, los compuestos y/o composiciones de la presente invención pueden formularse dentro de un portador de nanomaterial. Los expertos en la técnica conocen portadores de nanomaterial adecuados. En una realización particular, el portador de nanomaterial es una nanopartícula o una nanoesfera. Las nanopartículas o nanoesferas normalmente oscilan entre 55 aproximadamente 1 y 1000 nanómetros (nm), en particular entre aproximadamente 50 y 300 nm. El término “nanoesfera” se refiere a un tipo de nanopartícula que tiene una forma aproximadamente esférica. La nanoesfera puede tener un núcleo hueco dentro del cual pueden colocarse uno o más compuestos.

Una preparación farmacéutica de la invención puede formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la

administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente diferenciada de la preparación farmacéutica apropiada para el paciente que se somete al tratamiento. Cada dosificación debe contener una cantidad de principio activo calculada para producir el efecto deseado en asociación con el portador farmacéutico seleccionado. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para determinar la unidad de dosificación apropiada.

Las unidades de dosificación pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente basándose en el peso del paciente. Las concentraciones apropiadas para el alivio de un estado patológico particular pueden determinarse mediante cálculos de la curva de concentración de dosificación, tal como se conoce en la técnica.

Según la presente invención, la unidad de dosificación apropiada para la administración de composiciones de la presente invención puede determinarse evaluando la toxicidad de las moléculas o células en modelos animales. Pueden administrarse a ratones diversas concentraciones de los agentes en preparaciones farmacéuticas, y pueden determinarse las dosificaciones mínima y máxima basándose en los resultados beneficiosos y los efectos secundarios observados como resultado del tratamiento. La unidad de dosificación apropiada también puede determinarse evaluando la eficacia del tratamiento en combinación con otros fármacos convencionales. Las unidades de dosificación pueden determinarse individualmente o en combinación con cada tratamiento según el efecto detectado.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a intervalos apropiados, por ejemplo, al menos dos veces al día o más hasta que los síntomas patológicos se reducen o alivian, después de lo cual la dosificación puede reducirse hasta un nivel de mantenimiento. El intervalo apropiado en un caso particular normalmente dependería del estado del paciente.

En una realización particular, la composición/las composiciones de la presente invención se administra(n) inmediatamente o poco después del acontecimiento de traumatismo craneoencefálico. Por ejemplo, la preparación farmacéutica se administra al menos en el plazo de un mes después de la lesión, en el plazo de dos semanas después de la lesión, en el plazo de aproximadamente los primeros 7 días después de la lesión, en el plazo de aproximadamente los primeros día después de la lesión, en el plazo de aproximadamente la primera hora después de la lesión.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse de manera continua (por ejemplo, todos los días) después de la lesión durante al menos una semana, en particular al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas o más.

En general, las composiciones de la presente invención pueden contener otros componentes en cantidades que no le resten valor a la preparación de formulaciones seguras eficaces. Las composiciones de la presente invención pueden comprender además al menos un conservante, estabilizador, portadores, excipientes y/o antibiótico. Las composiciones y los métodos de la presente invención también pueden combinarse con otras composiciones y métodos para el tratamiento de los síntomas y/o la patología de un traumatismo craneoencefálico.

Los siguientes ejemplos describen métodos ilustrativos de la puesta en práctica la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención en modo alguno.

#### EJEMPLO 1

La lesión por percusión de líquido lateral (LFPI; McIntosh *et al.* (1989) *Neurosci.*, 28: 233-244) da como resultado cambios en la excitabilidad de la red en el hipocampo de ratón, en particular una disminución de la excitabilidad de la eficacia sináptica neta en el área CA1 y un aumento de la eficacia sináptica neta en la circunvolución dentada. La suplementación en la dieta con aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), leucina, isoleucina y valina, iniciada 48 horas después de la LFPI y mantenida durante 5 días restablece la eficacia sináptica neta en el hipocampo de ratón y restaura la función cognitiva dependiente del hipocampo 7 días después de la LFPI (Cole *et al.* (2010) *PNAS* 107: 366-371).

#### Materiales y métodos

**Lesión por percusión de fluidos (FPI):** Después de la craneotomía, se sujetó un conector de aguja de tipo Luer (3 mm de diámetro interno) por encima de la abertura del cráneo. Al día siguiente, el conector se llenó con solución salina y se conectó mediante un tubo de alta presión al dispositivo de FPI. La lesión se indujo mediante un breve pulso de solución salina sobre la duramadre intacta. Los animales con cirugía simulada recibieron todo lo anterior excepto el pulso de fluido.

**Dieta de BCAA:** Dos días después de la FPI, los animales recibieron la dieta de BCAA a través de una botella de agua o mediante alimentación por sonda nasogástrica. Los animales que recibieron las botellas de agua (100 mM) pudieron consumir la dieta a voluntad. Los animales que recibieron la sonda nasogástrica se alimentaron (60 g/70 kg) todos los días. Los animales recibieron una LFPI y dos días después se inició la dieta de BCAA durante una duración de 2, 3, 4, 5 o 10 días. Después de la administración de la dieta, los animales se sometieron a prueba para determinar la mejora cognitiva a través de la respuesta condicionada de miedo. Un grupo adicional recibió la

dieta durante 5 días y posteriormente se retiró la dieta durante 5 días antes de someterse a pruebas de comportamiento.

**Comportamiento:** Los animales se sometieron a prueba para determinar la recuperación cognitiva anterógrada usando la respuesta condicionada de miedo (CFR) a los 4, 5, 6, 7 o 12 días después de la lesión. El día 1, los animales se colocaron en la caja de CFR durante un total de 3 minutos. En el minuto 2:32, los animales recibieron una descarga de 1,07 mA de 2 segundos y permanecieron en la caja durante 30 segundos adicionales. Al día siguiente, los animales se colocan en la caja de CFR y se observan cada 5 segundos durante un total de 5 minutos. Se usó un total de 60 observaciones para determinar el porcentaje de bloqueo. Los porcentajes de bloqueo se calcularon basándose en el número de veces durante un periodo de 5 minutos en que el animal quedó bloqueado.

## Resultados

Para determinar la concentración y la duración de la suplementación de BCAA necesaria para potenciar al máximo la restauración cognitiva, se evaluó la función cognitiva usando la respuesta condicionada de miedo (CFR). En resumen, se administró a los ratones una LFPI y se les administró un suplemento en la dieta de BCAA 100 mM durante 2, 3, 4, 5 o 10 días. Tal como se observa en la figura 1, la duración de la administración se correlacionó con un aumento de la eficacia en la CFR.

Tal como se observa en la figura 2, la administración de BCAA durante 10 días después de FPI mejora el rendimiento en CFR cuando se compara con ratones con lesión sin BCAA. Un tercer grupo de ratones se sometió a la dieta durante 5 días y luego se retiró la dieta durante 5 días. Cuando se compararon con ratones con lesión que recibieron la dieta durante 10 días, los animales de 5 días con dieta/5 días sin dieta no mostraron mejoras significativas en la cognición tal como se sometió a ensayo con CFR.

Tal como se observa en la figura 3, la disminución de la concentración original de BCAA de 100 mM a una concentración de 50 mM no fue eficaz para restablecer la capacidad cognitiva en ratones con FPI cuando se trataron durante 5 días.

La figura 4 muestra una eficacia mejorada como resultado de un tratamiento específico de dosis con BCAA durante 3 días y 5 días en comparación con los que presentaban lesión solo. Específicamente, los animales recibieron FPI y dos días después recibieron la dieta de BCAA a través de alimentación con sonda nasogástrica a una dosis de 60 mg/70 kg/día. Después de la administración de la dieta durante 3 o 5 días, se sometió a prueba los animales para determinar la mejora cognitiva a través de la respuesta condicionada de miedo. Los animales que recibieron alimentación por sonda nasogástrica mostraron un rendimiento mejorado cuando se compararon con los que presentaban lesión solo.

Estos resultados indican que es necesario que los animales con lesión cerebral permanezcan con la dieta para mantener los restablecimientos en la función cognitiva. Además, la intervención de la dieta durante cinco días es insuficiente para revertir de manera permanente las alteraciones en la función neuroglial provocadas por LFPI, lo que indica que las terapias clínicas para TBI pueden requerir un transcurso de tiempo prolongado.

La tabla 1 proporciona el porcentaje de bloqueo promedio y la desviación estándar por estado. Los datos demuestran que a los 10 días, los animales quedan bloqueados en porcentajes similares a los de los animales con cirugía simulada. Los animales con la dieta muestran un rendimiento mejorado cuando se comparan con animales del mismo punto de tiempo que no se sometieron a una terapia con dieta.

|                  | Con tratamiento | Sin tratamiento |
|------------------|-----------------|-----------------|
| Cirugía simulada | -               | 38,81 ± 11,77   |
| 2 días           | 21,46 ± 5,38    | 11,00 ± 4,01    |
| 3 días           | 25,24 ± 9,20    | 18,75 ± 8,90    |
| 4 días           | 25,63 ± 9,76    | 18,10 ± 6,83    |
| 5 días           | 32,89 ± 12,57   | 21,46 ± 10,63   |
| 10 días          | 40,67 ± 16,77   | 25,97 ± 10,60   |
| 5 días (50 mM)   | 17,33 ± 10,11   | -               |

Tabla 1: La incidencia promedio de congelación a lo largo de un periodo de observación de 5 minutos y desviaciones estándar.

Los resultados anteriores muestran que la administración de BCAA a través de una botella de agua o alimentación

por sonda nasogástrica a animales con FPI mejora el rendimiento de comportamiento en la CFR cuando se compara con animales con lesión en el mismo punto de tiempo que no se sometieron a la terapia con dieta de BCAA. Es necesario que los animales reciban la dieta de manera continua durante al menos 10 días para mostrar un rendimiento similar al de los animales con cirugía simulada.

## 5 EJEMPLO 2

Se realizó un ensayo por percusión de fluido. En resumen, se realizó una craneotomía en ratones anestesiados usando un trépano de 3 mm y un conector de aguja de tipo Luer unido al cráneo y tapado. Al día siguiente, se empleó un dispositivo de lesión por percusión de fluido para administrar un a través del conector a una presión de entre 1,4 - 2,14 atm, produciendo una lesión por percusión de leve a moderada. Todos los animales con cirugía simulada recibieron anestesia y procedimientos quirúrgicos, excepto el pulso de fluido.

Se permitió que los ratones se recuperaran durante un día. Entonces se trató a los ratones con 5 mg/kg de triacetato de glicerilo (GTA) a través de sonda nasogástrica oral durante 5 días. El ensayo de respuesta condicionada de miedo (CFR) se realizó en el día 7. Tal como se observa en la figura 5, los ratones tratados con GTA después de la lesión mostraron una respuesta de miedo similar a los animales con cirugía simulada y una respuesta estadísticamente superior ( $P < 0,05$ ) a los ratones que recibieron la lesión cerebral sin tratamiento.

## 15 EJEMPLO 3

Datos recientes de los Centros para el Control de Enfermedades estiman que el traumatismo craneoencefálico (TBI) afecta a casi 2 millones de personas en el país anualmente y es una causa de incapacidad principal en todos los grupos de edad. Incluso una conmoción cerebral o TBI leve puede tener secuelas neurológicas crónicas, incluyendo problemas cognitivos, motores y de sueño (McCrea *et al.* (2002) *Neurosurgery* 50:1032-1040; Giza *et al.* (2001) *J. Athl. Train.*, 36:228-235). Los trastornos del sueño son altamente prevalentes en pacientes con TBI (Castriotta *et al.* (2010) *CNS Drugs* 25:175-185; Castriotta *et al.* (2007) *J. Clin. Sleep Med.*, 3:349-356). Se han notificado alteraciones del sueño en hasta el 72 % de pacientes con TBI (incluyendo TBI leve) hasta tres años después de la lesión (Baumann *et al.* (2007) *Brain* 130:1873-1883; Kempf *et al.* (2010) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81:1402-1405). Los pacientes con TBI con alteraciones del sueño tienen estancias más prolongadas en el hospital, un mayor coste de rehabilitación y una mayor tasa de incapacidad funcional (Makley *et al.* (2008) *Neurorehabil. Neural Repair* 22:341-347; Makley *et al.* (2009) *Neurorehabil. Neural Repair* 23:320-326). Además, se sabe que la alteración del sueño afecta a la formación de la memoria y puede agravar los déficits cognitivos en TBI (McDermott *et al.* (2003) *J. Neurosci.*, 23:9687-9695; Ruskin *et al.* (2004) *Eur. J. Neurosci.*, 19:3121-3124). En la actualidad, no hay terapias probadas para mitigar o prevenir las consecuencias neurocognitivas y neuroconductuales del TBI (Castriotta *et al.* (2009) *J. Clin. Sleep Med.*, 5:137-144). Por tanto, hay una necesidad inminente de comprender los mecanismos neuronales que subyacen a la lesión cerebral y las alteraciones crónicas del sueño y una necesidad de opciones terapéuticas alternativas.

El setenta y cinco por ciento de los casos notificados de TBI son de naturaleza leve (es decir, conmoción cerebral), y se han notificado alteraciones del sueño en el 47 % de 639 pacientes que presentaban una clínica de traumatismo craneal poco grave (Haboubi *et al.* (2001) *Disabil. Rehabil.*, 23:635-638). Un modelo de ratón de TBI leve ampliamente aceptado, usado comúnmente, es el modelo de lesión por percusión de fluido lateral (FPI) (Dixon *et al.* (1987) *J. Neurosurg.*, 67:110-119; McIntosh *et al.* (1989) *Neuroscience* 28:233-244). Este método experimental proporciona un traumatismo craneal cerrado altamente reproducible que recapitula muchas características clave del TBI humano, incluyendo déficits de memoria, gliosis y perturbación electrofisiológica (Dixon *et al.* (1987) *J. Neurosurg.*, 67:110-119; McIntosh *et al.* (1989) *Neuroscience* 28:233-244). Se han usado una variedad de ensayos para demostrar que este modelo animal recapitula las alteraciones crónicas del sueño después de FPI. Por ejemplo, se usó la monitorización de la actividad a largo plazo usando un ensayo de interrupción de haz locomotor validado previamente (Pack *et al.* (2007) *Physiol. Genomics* 28:232-238). Para investigar adicionalmente los cambios en los perfiles de actividad, se realizaron registros de EEG/EMG en ratones que se comportaban libremente, lo que permitió la evaluación de los estados de sueño sin movimientos oculares rápidos (NREM), sueño con movimientos oculares rápidos (REM) y vigilia, y análisis espectrales de potencia.

Para investigar los mecanismos neuronales que subyacen a las alteraciones del sueño inducidas por lesión, se examinó el neuropéptido orexina, que está implicado en el mantenimiento del estado de vigilia (Chemelli *et al.* (1999) *Cell* 98:437-451). Los niveles de orexina en el líquido cefalorraquídeo (CSF) y el número de neuronas de orexina hipotalámica están significativamente disminuidas tanto en la narcolepsia (un trastorno del sueño humano caracterizado por somnolencia diurna excesiva y fragmentación del sueño), así como después de TBI humano (Chemelli *et al.* (1999) *Cell* 98:437-451; Baumann *et al.* (2009) *Ann. Neurol.*, 66:555-559; Baumann *et al.* (2005) *Neurology* 65:147-149; Krahn *et al.* (2002) *Sleep* 25:733-736). Por tanto, el TBI leve puede provocar disfunción en el sistema de orexina.

Los déficits inducidos por lesión en el sistema de orexina pueden revertirse con suplementación en la dieta de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA). Los BCAA sirven como precursores de la síntesis *de novo* del glutamato y la posterior síntesis de GABA en el cerebro. Se ha demostrado que la FPI induce una cascada secundaria de lesión que afecta al equilibrio de excitación - inhibición (E-I) y provoca cambios regionales en la excitabilidad de la

red en el hipocampo, todo lo cual se restablece con terapia con BCAA (Cole *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci., 107:366-371; Witgen *et al.* (2005) Neuroscience 133:1-15). Además, se ha demostrado que los aminoácidos de la dieta actúan directamente sobre las neuronas de orexina para modular la excitabilidad de la membrana (Karnani *et al.* (2012) Neuron 72:616-629). En el presente documento, se administró a los ratones suplementación con BCAA en su agua para consumo y se restauró tanto la activación de las neuronas de orexina como las alteraciones del sueño inducidas por lesión, lo que indica que los BCAA restablecen el estado de vigilia en parte mediante la activación de las neuronas orexigénicas (hipocretinérgicas).

Los datos presentados en el presente documento identifican mecanismos novedosos subyacentes a las alteraciones del sueño en un modelo de TBI leve y muestran por primera vez que la intervención de BCAA mejora las alteraciones del sueño inducidas por lesión, identificando de ese modo una terapia para las secuelas cognitivas y neuroconductuales del TBI leve.

### Métodos

#### *Animales*

Todos los experimentos se realizaron en ratones C57BL/J6 macho de 5-7 semanas de edad, 20-25 g (Jackson Laboratory). Se alojó a los animales en una sala de registro aislada e insonorizada que se mantuvo a una temperatura ambiental de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con una humedad relativa del  $25 \pm 5\%$  y que estaba en un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad controlado automáticamente (luz encendida a las 07:00 horas, intensidad de iluminación  $\approx 100$  lux). Los animales tenían libre acceso a comida y agua. Se hizo todo lo posible para minimizar el número de animales usados y cualquier dolor e incomodidad experimentados por los sujetos. Los experimentos con animales se realizaron según las directrices publicadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y se aprobaron por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania y el Children's Hospital de Filadelfia según las directrices internacionales sobre el uso ético de animales.

#### *Lesión cerebral por percusión de fluido en ratón*

Se dividieron los ratones en dos grupos: TBI (cirugía y lesión por percusión de fluido) y cirugía simulada. Se llevó a cabo el protocolo de lesión cerebral por percusión de fluido (FPI) durante 2 días tal como se describió anteriormente (McIntosh *et al.* (1989) Neuroscience 28:233-244; Cole *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci., 107:366-371). En el primer día, se anestesió al animal usando una combinación de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se colocó en un marco estereotáctico de ratón (Stoelting). Se practicó una incisión en el cuero cabelludo y se reflejó. Se llevó a cabo lo siguiente con un aumento de 0,7 - 3,5x: Se realizó una craneotomía con un trépano (diámetro exterior de 3 mm) sobre el área parietal derecha entre los puntos bregma y lambda, justo medial con respecto a la sutura sagital y lateral con respecto al borde craneal lateral. La duramadre permaneció intacta a lo largo de todo el procedimiento de craneotomía. Se sujetó un conector de aguja de tipo Luer rígido (diámetro interior de 3 mm) al cráneo sobre la abertura con adhesivo Loctite® y posteriormente con cianoacrilato más acrílico dental. Las suturas del cráneo se sellaron con el cianoacrilato durante este procedimiento para garantizar que el bolo de fluido procedente de la lesión permaneciera dentro de la cavidad craneal. El conector de aguja de tipo Luer se llenó con solución salina estéril isotónica y se tapó el conector. Entonces se colocó el ratón en una almohadilla térmica y se devolvió a la jaula una vez que pudo deambular. En el segundo día, al animal se le administró brevemente anestesia con isoflurano (500 ml/min) a través de un cono nasal, y se monitorizó visualmente la respiración. Cuando el animal estaba respirando una vez cada 2 segundos, se retiró el cono nasal, se retiró la tapa sobre el conector y se confirmó visualmente la integridad de la duramadre. El conector se llenó hasta arriba con solución salina estéril isotónica y una sección de 32 cm del tubo de alta presión que se extendía desde el dispositivo de FPI dispositivo se unió al accesorio de tipo Luer del conector (Department of Biomedical Engineering, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA). Entonces se colocó el animal sobre su lado izquierdo y se observó. Una vez que se reanudó la respiración normal y justo cuando el animal recuperó su reflejo de retirada con pellizco en el dedo, se administró un pulso de solución salina de 20 ms sobre la duramadre. Se usó un manómetro unido a un osciloscopio para garantizar presiones administradas de entre 1,4 y 2,1 atmósferas, que se había demostrado anteriormente que generan una lesión cerebral leve. Inmediatamente después de la lesión, se retiró el conector del cráneo y se colocó el animal en posición de decúbito supino. Entonces volvió a anestesiarse el animal con isoflurano para el cierre del cuero cabelludo. Los animales con cirugía simulada recibieron todo lo anterior, con la excepción del pulso de fluido. El animal se devolvió a una almohadilla térmica hasta que pudo deambular y entonces se devolvió a la jaula de alojamiento.

#### *Evaluación de la actividad y la inactividad: Interrupciones del haz de infrarrojos*

En la figura 6A se detalla el cronograma de monitorización de la actividad. Se determinó la actividad/inactividad usando el sistema de monitorización Accuscan (Omnitech Electronics, Inc.) y el sistema de recogida, software Fusion 4.0. Tras la FPI o cirugía simulada, se alojó individualmente a los ratones en sus jaulas de alojamiento dentro del sistema de monitorización Accuscan durante 30 días consecutivos (n=18 FPI, n=12 cirugía simulada). El sistema Accuscan consiste en un haz de infrarrojos que está a 1 pulgada de distancia del plano horizontal que proporciona una retícula de alta resolución que cubre el fondo de la jaula. El software de adquisición de datos proporciona recuentos de interrupciones de haz por el ratón en épocas de 10 segundos. Se consideró que el ratón estaba

inactivo si no había interrupciones de haz en cuatro épocas consecutivas de 10 segundos, según un algoritmo desarrollado para estimar el sueño y el estado de vigilia (Pack *et al.* (2007) *Physiol. Genomics* 28:232-238).

#### *Evaluación de EEG/EMG del sueño y el estado de vigilia*

Para evaluar el sueño y el estado de vigilia, se implantaron quirúrgicamente electrodos de EEG/EMG en ratones tal como se describió anteriormente, con ligeras modificaciones para la craneotomía de FPI (Pack *et al.* (2007) *Physiol. Genomics* 28:232-238). En resumen, se anestesió a los animales mediante inyección de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Se expuso el cráneo y se prepararon 3 pequeños orificios para la colocación de 3 electrodos de EGM de bola de plata, dos frontales y uno parietal izquierdo (anteroposterior, +1,0 mm; mediolateral, + 1,5 mm desde el punto bregma, y anteroposterior, -2,0 mm; mediolateral - 2,0 mm) según el atlas de Franklin y Paxinos (Paxinos, G. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*: Gulf Professional Publishing). Se introdujeron dos electrodos de EMG aislado, de acero inoxidable, desnudos en las puntas, en la superficie de los músculos dorsales del cuello. Todas las derivaciones de los electrodos se conectaron a un conector de enchufe de plástico (Plastics One), que se fijó al cráneo con acrilato dental. Tras la cirugía, se dejó que los animales se recuperaran durante 5 días antes de realizar cualquier estudio. Se amplificaron las señales de EEG y EMG usando el sistema amplificador Neurodata (modelo M15, Astro-Med Inc.). Las señales se amplificaron (20.000x) y se acondicionaron con neuroamplificadores/filtros (modelo 15A94, Grass). Los ajustes para las señales de EEG fueron una frecuencia de corte baja (-6 dB) de 0,1 Hz y una frecuencia de corte alta (-6 dB) de 100 Hz. Las muestras se digitalizaron a muestras de 256 Hz/segundo/canal. Todos los datos se adquirieron usando el software Grass Gamma (Natus).

#### *Administración de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA)*

Dos días después del procedimiento de FPI, se asignó aleatoriamente un subconjunto de ratones para recibir o bien agua suplementada con BCAA o bien agua corriente sin tratar (control). La suplementación de BCAA consistió en una combinación de L-leucina, L-isoleucina y L-valina a 100 mM cada una (obtenidas individualmente de Sigma-Aldrich) (Cole *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107:366-371). Se midió la cantidad de agua para consumo que quedaba en la botella cada día, y se reemplazó cada semana con BCAA recién preparados o agua de control. Los ratones bebieron como promedio 3-5 ml de disolución por día y se ha demostrado que los BCAA no afectan al peso corporal (Cole *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107:366-371).

#### *Cronograma de registro y pruebas de comportamiento*

En la figura 7 se muestra el cronograma de registro de EEG/EMG. Los ratones se conectaron a cables de registro ligeros en jaulas individuales (n = 7 cirugía simulada, n = 6 TBI, n = 6 TBI + BCAA). Los registros del sueño se iniciaron después de 24 horas de aclimatación a los cables. En todos los ratones estudiados se confirmó la capacidad para moverse libremente dentro de toda la jaula y sostenerse sobre las patas traseras para explorar la parte superior de la jaula. El sueño de nivel inicial se registró los días primero, segundo y quinto para garantizar una actividad estable de sueño/vigilia a lo largo de los días. Al comienzo de la fase de oscuridad (7:00 pm) en el día de registro 3, los ratones se expusieron a un entorno novedoso sin manipulación directa añadiendo nuevo lecho y material de anidamiento a sus jaulas domésticas. Las señales de EEG/EMG se registraron y analizaron desde las 7:00 hasta las 9:00 pm para responder a un entorno novedoso. En el día 4 de registro, se privó del sueño a los ratones usando manipulación suave durante 3 horas, desde las 10:00 a.m. hasta la 1:00 p.m., que es un momento de mayor sueño. La manipulación suave se logró proporcionando a los ratones materiales novedosos (lecho, material de anidamiento, trozos de papel absorbente, papel de aluminio y papel de plástico) y ocasionalmente acariciando a los ratones con un pincel suave como se describe (Naidoo *et al.* (2011) *Aging Cell*, 10: 640-649). Durante este estado de vigilia forzado, la vigilia se confirmó electrográficamente durante todo el periodo de 3 horas. Posteriormente, se registró el sueño de recuperación durante las siguientes tres horas y se analizó la probabilidad de despertar y la potencia delta como se describe a continuación en Análisis de datos.

#### *Análisis de datos: Calificación de EEG/EMG de nivel inicial*

Los registros poligráficos se calificaron fuera de línea por un calificador experimentado para el sueño sin movimientos oculares rápidos (NREM) y con movimientos oculares rápidos (REM) y el estado de vigilia (W) en épocas de 4 segundos a lo largo de un nivel inicial de 24 horas (ciclo de 12 horas de luz-oscuridad desde las 7:00 am hasta las 7:00 pm). Los datos recogidos usando el software Grass Gamma se convirtieron al formato de datos europeo y se calificaron automáticamente usando el paquete de análisis SleepSign según los criterios convencionales (Kissei Comtec). Entonces se inspeccionaron visualmente las épocas calificada automáticamente para determinar artefactos y se eliminaron manualmente (<0,5 % de todas las épocas). Como etapa final, se examinaron las fases definidas de ciclo de sueño-vigilia y se corrigieron si era necesario. Durante un periodo de nivel inicial de 24 horas que consistió exactamente en 21.600 épocas por ratón, se cuantificaron los minutos totales de vigilia, sueño NREM y REM, la duración promedio de cada episodio de sueño y vigilia, y las características de las transiciones dentro y entre los estados de sueño y vigilia.

#### *Análisis de datos: Análisis espectral de potencia de nivel inicial*

Las señales poligráficas calificadas se sometieron a la transformada rápida de Fourier (FFT) usando SleepSign para el análisis espectral de potencia de cada agrupación de frecuencia de 0,25 Hz desde 0 hasta 128 Hz en total para

cada fase de sueño (NR, R y W). Entonces se añadieron los datos usando R para la densidad de potencia dentro de bandas de frecuencia de EEG particulares: Delta (1-4 Hz), theta (5-8 Hz), alfa (9-13 Hz) y beta (14-30 Hz), gamma total (31-128 Hz), gamma lento (35-55 Hz) y potencia total (1-128 Hz). La densidad de potencia del EEG para cada época se normalizó mediante la potencia total promediada de todas las épocas y se sumó dentro de cada agrupación de frecuencia para cada fase de sueño. Las épocas que contenían artefactos se eliminaron del análisis espectral de potencia. La frecuencia pico theta se calculó identificando la frecuencia entre 5 y 8 Hz que tenía la mayor densidad de potencia para cada ratón individual, y luego promediando este valor dentro de los grupos.

#### *Análisis de datos: Entorno novedoso*

Los registros poligráficos a lo largo del periodo de análisis para el entorno novedoso se extrajeron desde las 7:00 hasta las 9:00 pm el día 3 de registro y se calificaron de la misma manera que se detalló anteriormente. Se cuantificó para cada ratón la latencia hasta el primer periodo de sueño, definida como 3 épocas de NREM o REM consecutivas en cualquier combinación. La gráfica cronológica del porcentaje de estado de vigilia se calculó tabulando el número total de épocas de vigilia dentro de agrupaciones consecutivas de 5 minutos y expresando esto como un porcentaje de las épocas totales, representado a lo largo de 120 minutos.

#### *Análisis de datos: Sueño de recuperación*

Las señales poligráficas se extrajeron del periodo de sueño de recuperación que se produjo inmediatamente después de un periodo de 3 horas de estado de vigilia forzado, desde la 1:00 pm hasta las 7:00 pm en el día de registro 4. Las épocas se calificaron tal como se indicó anteriormente y se analizaron para el tiempo total de NREM y la duración del episodio de NREM promedio. La potencia delta se calculó cuantificando la potencia de NREM promedio para cada hora inmediatamente después de la privación del sueño desde la 1:00 pm hasta las 7:00 pm, y luego se normalizó dividiendo entre la potencia delta de NREM de nivel inicial para cada ratón individual. La potencia delta de NREM de nivel inicial se calculó promediando los valores a lo largo de las últimas cuatro horas de luces encendidas (de 3:00 pm a 7:00 pm) durante el día 3 de nivel inicial, donde los valores están presumiblemente en su cénit (Franken *et al.* (2001) J. Neurosci., 21: 2610-2621.). La gráfica cronológica del porcentaje de estado de vigilia se calculó tabulando el número total de épocas de vigilia dentro de agrupaciones consecutivas de 5 minutos y expresando esto como un porcentaje de las épocas totales, representado a lo largo de 3 horas.

#### *Inmunohistoquímica*

Se usó inmunohistoquímica para caracterizar la respuesta de c-fos de vigilia en neuronas de orexina, un marcador genético temprano inmediato de activación neuronal reciente. Se perfundió a los ratones con paraformaldehído al 4 % y los cerebros se fijaron posteriormente y se crioconservaron en sacarosa. Se recogieron las secciones de criostato con un grosor de 40 µm en una serie 1:6. Las secciones que contienen el hipotálamo lateral se sometieron a un marcado doble para orexina y c-Fos tal como se ha descrito (Naidoo *et al.* (2011) Aging Cell 10: 640-649). En resumen, las secciones se incubaron en anticuerpo policlonal de cabra anti-orexina-A (Santa Cruz) a una concentración de 1:1000 y anticuerpo policlonal de conejo anti-c-Fos (Calbiochem) a una concentración de 1:6000. La orexina-A se visualizó con un anticuerpo secundario anti-cabra Alexa Fluor® 594 (rojo) a 1:200, y c-Fos se visualizó con un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor® 488 (verde) a 1:200 (Molecular Probes). Para el transportador de glutamato vesicular 1 (VGLUT1) y el doble marcaje de orexina-A, el protocolo fue el mismo con la excepción de que se usó el anticuerpo policlonal de rata anti-VGLUT1 (Synaptic Systems) a una concentración de 1:2000. Las secciones se montaron en portaobjetos de microscopio y se analizaron para el recuento de células usando un microscopio epifluorescente (Leica) con un aumento de 10x y 40x tal como se ha descrito anteriormente (Naidoo *et al.* (2011) Aging Cell 10: 640-649).

#### *Recuento celular*

Se analizaron todas las neuronas de orexina-A inmunopositivas con núcleos visibles en cuatro secciones de tipo rostral-caudal a través de núcleos bilaterales para cada ratón (n = 5 ratones por grupo). Las células se calificaron como positivas para c-Fos si el marcaje de c-Fos en el núcleo era más intenso que el fondo usando el software de análisis Image J (NIH) tal como se describió anteriormente (Naidoo *et al.* (2011) Aging Cell 10: 640-649). Dos calificadores, uno de los cuales no conocía las condiciones, contaron de forma independiente el número de neuronas de orexina y el marcaje de c-Fos con una concordancia > 90 %. Para cada ratón, se examinaron más de 150 neuronas por región.

#### *Procedimientos estadísticos*

Los cálculos y análisis estadísticos se realizaron usando R (versión 2.15.2, The R Foundation of Statistical Computing) (Team, R.C. (2012) R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing). Cuando fue apropiado, todos los datos se analizaron usando o bien pruebas de la t de Student bilaterales o bien un ANOVA de un factor seguido por pruebas de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett si los valores de F alcanzaban significación estadística. La significación estadística se definió en el nivel de confianza  $p < 0,05$  al comparar diferentes grupos de tratamiento. Todos los datos se presentan como medias de grupo  $\pm$  EEM.

## Resultados

### *Monitorización de la actividad: actividad disminuida y fragmentada*

Un modelo de ratón de TBI leve ampliamente aceptado y usado comúnmente es el modelo de lesión por percusión de fluido lateral (FPI). Este método experimental proporciona un traumatismo craneal cerrado, altamente reproducible que recapitula muchas características clave del TBI humano, incluyendo los déficits de memoria, la gliosis y la perturbación electrofisiológica (Dixon *et al.* (1987) *J. Neurosurg.*, 67:110; McIntosh *et al.* (1989) *Neuroscience* 28:233).

Ratones aleatorizados o bien a FPI o bien a cirugía simulada, se sometieron a una monitorización exhaustiva de la actividad locomotora en los días desde el 3 hasta el 34. En la figura 6A se muestra el cronograma experimental que indica los bloques de tiempo predeterminados, y consiste en el período postoperatorio inmediato (días 0-4), en los periodos agudo (días 5-14), subagudo (días 15-24) y crónico (días 25-34) tras la lesión o cirugía simulada. Se analizaron los patrones de actividad para cada uno de los bloques de tiempo. Se aplicó un algoritmo previamente establecido en el que se demostró que 40 segundos de inactividad continua son altamente predictivos del sueño (Pack *et al.* (2007) *Physiol. Genomics* 28: 232-238). Por tanto, se contó un episodio inactivo solo cuando los ratones permanecieron quietos durante más de 40 segundos seguidos.

Durante la fase de oscuridad (de 7:00 pm a 7:00 am), cuando ratones normalmente son más activos, los ratones con lesión fueron significativamente menos activos en comparación con los controles con cirugía simulada durante las fases subaguda y crónica (figura 6B). La duración promedio del tiempo transcurrido con inactividad continua, o "duración del episodio inactivo" no difirió significativamente entre grupos (figura 6C). Sin embargo, la duración promedio del tiempo transcurrido con actividad continua, o "duración del episodio activo" fue significativamente más corta en ratones con TBI en comparación con controles (figura 6D). Esto indica que el TBI leve disminuye la actividad total al provocar episodios más cortos de actividad continua.

Los ratones con TBI y cirugía simulada no difirieron significativamente en la cantidad total de actividad ni en las duraciones promedio de los episodios activos/inactivos durante la fase de luz (de 7:00 am a 7:00 pm), cuando los ratones normalmente son menos activos.

Con el fin de analizar adicionalmente la naturaleza de los episodios de actividad acortados después del TBI, se examinó la frecuencia de episodios de duración variable, que oscila entre 10-20 minutos, 20-30 minutos y más de 30 minutos de duración, durante la fase de oscuridad. Aunque la inmensa mayoría de duraciones de episodios son menores de 10 minutos de duración para ambos grupos de ratones, los ratones con TBI tiene significativamente más episodios en el intervalo de 10-20 minutos y significativamente menos episodios de más de 30 minutos de duración en comparación con los controles con cirugía simulada, a lo largo de todos los bloques de tiempo agudos, subagudos y crónicos (figura 6E).

Los ratones con TBI y cirugía simulada no mostraron la misma magnitud de diferencias de actividad durante la fase de luz, en comparación con la fase de oscuridad, pero el patrón de episodios de actividad disminuida y acortados todavía era evidente en los ratones con lesión cerebral.

El número total de transiciones entre episodios activos e inactivos continuos aumentó significativamente después del TBI en los tres bloques de tiempo (figura 6F). Esto indica que hay una fragmentación significativa de los episodios de actividad en ratones con lesión.

Para investigar si los ritmos diurnos resultaron afectados en ratones con TBI, se representaron gráficamente actogramas durante la totalidad del periodo de monitorización de la actividad de 30 días. Los ritmos de actividad diurna generales estaban intactos en los ratones tanto con cirugía simulada como con TBI, lo que está de acuerdo con el fenotipo de un reloj circadiano intacto. Esto indica que el TBI afecta a los mecanismos de actividad posteriores del reloj.

Considerados en conjunto, los datos de monitorización de la actividad locomotora demuestran que un solo episodio de lesión leve provoca alteraciones persistentes en la actividad que duran al menos 30 días. Dado que la actividad locomotora es altamente predictiva del estado de comportamiento, estos datos indican que hay alteraciones inducidas por lesión en el sueño y el estado de vigilia. En particular, los ratones con lesión cerebral muestran mayores diferencias durante la fase de oscuridad, cuando los ratones normalmente están más despiertos. Por tanto, se planteó la hipótesis de que habría déficits específicos en la capacidad para mantener el estado de vigilia.

### *Registro de EEG/EMG de nivel inicial: Incapacidad para mantener el estado de vigilia, mejorado por la intervención de BCAA*

Para investigar los mecanismos de comportamiento que subyacen a la disminución de la actividad inducida por lesión, se implantaron en ratones electrodos de EEG/EMG permanentes crónicos. Se analizaron los estados de comportamiento a lo largo de un periodo de cinco días tras un periodo inicial de 7 días de recuperación de la cirugía (figura 7). Dado que la FPI provoca cambios en la excitabilidad de la red cerebral que se normalizan mediante la administración de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en la dieta, se realizaron registros de EEG/EMG en

una cohorte independiente de ratones con lesión en terapia con BCAA. Se planteó la hipótesis de que déficits en la excitabilidad en la red del ciclo de sueño-vigilia mejoraría mediante este suplemento en la dieta en el agua para consumo.

5 Los registros de nivel inicial consistieron en periodos de 24 horas desde las 7:00 am hasta las 7:00 am. Durante las condiciones de nivel inicial, los ratones con TBI pasaron significativamente menos tiempo despiertos a lo largo de las fases tanto de luz como de oscuridad, y más tiempo en sueño NREM durante la fase de oscuridad en comparación con los controles con cirugía simulada (figura 8A). Los ratones con TBI+BCAA muestran una reversión parcial de los cambios en los estados de vigilia y NREM. Estos resultados indican que la disminución en la actividad medida mediante la monitorización locomotora se explica por un estado de vigilia reducido y un sueño NREM aumentado.

10 Se calcularon hipnogramas para cada animal representando gráficamente las fases de vigilia, NREM y REM consecutivamente, época por época a lo largo de un periodo de 24 horas, comenzando con las luces encendidas a las 7:00 am. Los ratones de tipo natural C57B16 adultos que no habían recibido tratamiento normalmente muestran episodios de estado de vigilia prolongados durante la fase de oscuridad, en particular al inicio de las luces apagadas, mientras que los ratones deficientes en orexina carecen de episodios de vigilia prolongados (Sakurai, T. (2007) Nat. Rev. Neurosci., 8:171-181). En la figura 8B se muestran hipnogramas de muestra de ratones con cirugía simulada, TBI y TBI+BCAA. Los ratones con cirugía simulada mantienen episodios de vigilia prolongados a las 7:00 pm con luces apagadas, mientras que ratones con TBI continúan teniendo episodios de vigilia fragmentados. La intervención de BCAA restaura los episodios de vigilia prolongados.

20 Se cuantificaron las duraciones promedio de episodios de vigilia continuos a lo largo del ciclo circadiano de 24 horas, subdivididas en agrupaciones de 3 horas comenzando con las luces encendidas a las 7:00 am (o tiempo de Zeitgeber (ZT) 0). Los ratones con TBI mostraron episodios de vigilia significativamente más cortos tanto en la fase de luz como en la de oscuridad, en comparación con los ratones con cirugía simulada (figura 8C). Esto es particularmente evidente en la parte inicial del periodo con luces apagadas. Los ratones con lesión no pueden lograr episodios de estado de vigilia prolongados en comparación con los ratones de control con cirugía simulada. La terapia con BCAA alarga significativamente los episodios de vigilia a lo largo del ciclo de 24 horas, mejorando de ese modo el mantenimiento normal del estado de vigilia, pero no restablece por completo la capacidad para mantener el estado de vigilia a los niveles de control (figura 8C).

30 También se cuantificaron las duraciones promedio de episodios de sueño continuos a lo largo del ciclo circadiano de 24 horas, subdividido en agrupaciones de 3 horas comenzando igual que anteriormente. Los ratones con TBI tienen episodios de sueño continuos significativamente más cortos durante la fase de oscuridad en comparación con los ratones con cirugía simulada, y esto se restablece parcialmente con la intervención de BCAA, en particular durante ZT 16-18, o de 10:00 pm a 1:00 am (figura 8D).

35 En general, estos datos indican que el TBI afecta a la capacidad para mantener el estado de vigilia y altera la fluctuación diurna normal observada en el estado de vigilia. El efecto es más marcado en la parte inicial del periodo de luces apagadas. La terapia con BCAA mejora la capacidad para permanecer despierto.

*Registro de EEG/EMG de nivel inicial: Fragmentación del estado de comportamiento, rescatada mediante terapia con BCAA*

40 Para investigar las transiciones entre los estados de comportamiento en la lesión cerebral, se cuantificó el número de cambios de episodios de sueño y de vigilia a lo largo de las fases de luz y oscuridad. Durante la fase de oscuridad, el número total de transiciones de sueño a vigilia (sueño = NREM y REM) aumentó significativamente en los ratones con TBI en comparación con los ratones con cirugía simulada, y la intervención de BCAA después del TBI disminuyó el número de transiciones de vuelta a los niveles de control con cirugía simulada (figura 9A).

45 Los tipos de transición se clasificaron en posibles combinaciones entre las fases de vigilia, NREM y REM y se subdividieron en fases de luz y oscuridad. Los ratones con TBI tienen más transiciones de vigilia a NREM (WN), de NREM a vigilia (NW) y de REM a vigilia (RW) en comparación con los controles con cirugía simulada, así como en comparación con TBI con intervención de BCAA durante la fase de oscuridad (figura 9C). No hubo diferencias significativas entre grupos para las subcategorías de transición durante la fase de luz, cuando los ratones normalmente pasan más tiempo durmiendo (figura 9B). Esto indica que las transiciones que implican específicamente el estado de vigilia (es decir, WN, NW y RW) son más sensibles a la lesión.

50 Con el fin de caracterizar adicionalmente la naturaleza de las transiciones de vigilia, se representó gráficamente un histograma de diversas duraciones de episodios de vigilia (figuras 9D y 9E). Durante las fases tanto de luz como de oscuridad, los ratones con TBI tuvieron significativamente más episodios de duración más corta (en particular, menos de 128 segundos de duración) en comparación con los ratones con cirugía simulada. La terapia con BCAA rescató completamente este desplazamiento hacia la izquierda hacia duraciones de episodios más cortas en el histograma. También se analizaron los episodios en el sueño NREM y REM durante las fases de luz y oscuridad. Aunque las diferencias de grupo más pronunciadas se producen durante el estado de vigilia, hay un patrón similar y constante de episodios más cortos después de la lesión durante los estados de NREM y REM, lo que indica cierto grado de fragmentación del sueño.

Considerados en conjunto, estos datos resaltan la gravedad de la fragmentación durante el estado de vigilia, y también en menor grado durante el sueño, inducida por TBI leve. La fragmentación del estado de comportamiento y la somnolencia diurna excesiva son fenómenos citados con frecuencia en los trastornos del sueño tales como narcolepsia e hipersomnia tras traumatismo (Guilleminault *et al.* (2000) *Neurology* 54:653-659; Rao *et al.* (2008) *Brain Inj.*, 22:381-386; Verma *et al.* (2007) *J. Clin. Sleep Med.*, 3:357-362; Baumann *et al.* (2007) *Brain* 130:1873-1883).

#### *Registro de ciclo de sueño-vigilia mediante EEG/EMG de nivel inicial: Análisis espectral de potencia*

El análisis espectral de potencia es un método ampliamente aceptado usado para la cuantificación de señales de EEG. La densidad espectral de potencia refleja la distribución de la potencia de señal (calculada mediante la transformada rápida de Fourier de la señal poligráfica) representada gráficamente con respecto a agrupaciones de frecuencia específicas.

Se analizaron las señales poligráficas de nivel inicial para determinar los espectros de potencia en diversas bandas de frecuencia para las diferentes condiciones (figura 10). Los espectros de vigilia para ratones con TBI fueron significativamente menores en el intervalo de frecuencia theta en comparación con los ratones de control con cirugía simulada (figura 10A). Esto también se encontró en los espectros de NREM y REM para ratones con TBI (figuras 10B y 10C). La potencia theta se restableció mediante BCAA durante los espectros en el estado de NREM. Los espectros de potencia se clasificaron además por la fase de sueño y las fases de luz/oscuridad, lo que resalta las diferencias de grupo en particular para los espectros de vigilia durante la oscuridad y los espectros de NREM/REM durante la luz.

Dado que se encontraron diferencias de grupo sólidas en la potencia theta, este efecto se evaluó adicionalmente calculando la frecuencia de pico theta para cada estado de comportamiento. La frecuencia de pico theta se derivó como el valor de frecuencia entre 5 y 8 Hz con la densidad de potencia máxima. En ambos estados de vigilia y REM, frecuencia de pico theta para ratones con TBI fue significativamente más lenta en comparación con los ratones de control con cirugía simulada. La terapia con BCAA aumentó la frecuencia de pico theta, aunque no para controlar los niveles (figura 10A y 10C).

Se calculó la densidad de potencia para bandas de frecuencia específicas durante cada estado de comportamiento. Se observaron diferencias de grupo en las densidades de potencia alfa, beta y gamma, mostrando los ratones con lesión una disminución en las tres en comparación con los ratones con cirugía simulada, con mejora parcial en algunas bandas con terapia con BCAA.

Considerados en conjunto, los análisis espectrales de potencia demuestran que el TBI leve produce alteraciones persistentes en los ritmos de EEG. En particular, la lesión reduce la potencia theta y desplaza el pico theta a frecuencias más lentas. Este fenotipo se mejora con la intervención de BCAA.

#### *Registro de EEG/EMG durante un estímulo de entorno novedoso*

A continuación, se determinó si la lesión afecta al estado de comportamiento en situaciones que estimulaban al sistema de activación cerebral. Se expuso a los ratones a un entorno novedoso al comienzo de la fase de oscuridad. Se calculó la latencia hasta el primer episodio de sueño para la prueba de comportamiento de dos horas (figura 11A). Los ratones con TBI tuvieron una latencia más corta hasta el sueño en comparación con los ratones con cirugía simulada, y esta latencia más corta se restableció parcialmente mediante la intervención de BCAA ( $F=2,805$ ,  $p=0,0923$ , cirugía simulada frente a TBI  $p=0,05$ ; ANOVA de un factor con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett). A continuación, se calculó una representación gráfica cronológica del estado de vigilia contando el número total de épocas de vigilia por agrupamientos de 5 minutos. Esta representación gráfica mostró que los ratones con TBI tenían de manera constante menores porcentajes de épocas de vigilia a lo largo de la prueba de dos horas, con una propensión creciente a dormir a medida que la prueba avanzaba (figura 11B). Los ratones de control con cirugía simulada y terapia con BCAA fueron indistinguibles, lo que indica que los BCAA restablecen la activación cerebral y estado de vigilia normal durante la exposición a la novedad.

#### *Registro de EEG/EMG tras la privación de sueño leve*

El segundo estímulo de vigilia consistió en examinar la respuesta de EEG a un periodo de 3 horas de estado de vigilia forzado usando privación de sueño mediante manipulación suave. El estímulo de vigilia se realizó desde las 10:00 am hasta la 1:00 pm, que es un periodo de alta presión de sueño en ratones. El periodo de 3 horas se eligió como una duración de tiempo abreviada durante el cual los ratones que no habían recibido tratamiento normalmente no muestran mucho rebote de sueño, para maximizar la dimensión del efecto (Franken *et al.* (1991) *Neurosci. Lett.*, 130:141-144). Los datos de las siguientes seis horas desde la 1:00 hasta las 7:00 pm, o "sueño de recuperación," se analizaron para el tiempo de NREM, la duración del episodio de NREM, la potencia delta de NREM y el porcentaje cronológico del estado de vigilia (figura 12).

Los ratones con TBI pasan significativamente más tiempo en sueño NREM en la primera hora inmediatamente después de la privación de sueño en comparación con los controles con cirugía simulada y los ratones que reciben terapia con BCAA (figura 12A). Resulta interesante que pese a tener más sueño NREM, los ratones con TBI tuvieron

duraciones más cortas del episodio de NREM (figura 12B). La potencia delta el sueño NREM está ampliamente aceptada como un indicador preciso para la presión de sueño tras un periodo de privación de sueño (Franken *et al.* (1991) *Neurosci. Lett.*, 130:141-144; Franken *et al.* (1991) *Am. J. Physiol.*, 261:R198-208). Los ratones con TBI mostraron más potencia delta en la segunda hora durante el sueño de recuperación en comparación con los ratones con cirugía simulada y TBI+BCAA ratones (figura 12C). La representación gráfica cronológica del estado de vigilia fue baja en los tres grupos, pero pareció más baja en el grupo de TBI en comparación con los ratones con cirugía simulada y TBI+BCAA, en particular dentro de las primeras dos horas (figura 12D).

Considerados en conjunto, estos datos indican que una lesión cerebral leve confiere una mayor presión para dormir tras situaciones de activación cerebral forzada. Sin embargo, pese al aumento de la presión de sueño, los ratones con TBI todavía no pueden mantener episodios prolongados de sueño NREM. La intervención de BCAA mejora y prolonga estado de vigilia tras la privación de sueño leve.

*La activación de las neuronas de orexina disminuye después del TBI y se restablece mediante la intervención de BCAA*

El fenotipo de la somnolencia diurna y la inestabilidad del estado se asemejan al fenotipo provocado por la disfunción de orexina (Sakurai, T. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, 8:171-181). Por consiguiente, la disfunción de orexina contribuía potencialmente al fenotipo de las alteraciones del sueño inducidas por lesión. Para someter a prueba esta hipótesis, se examinó la activación de las neuronas de orexina en respuesta a un periodo de 3 horas de estado de vigilia forzado desde las 10:00 am hasta la 1:00 pm (el mismo paradigma usado en la prueba de estímulo de vigilia descrito anteriormente). Los ratones eran de 4 semanas después de TBI o con cirugía simulada, y un tercer grupo de ratones recibió suplementación con dieta de BCAA durante 4 semanas antes del sacrificio. La activación neuronal se midió por la presencia del marcador temprano inmediato, proteína c-Fos (Morgan *et al.* (1991) *Annu. Rev. Neurosci.*, 14:421-451). En comparación con los grupos con cirugía simulada y TBI+BCAA, los ratones con TBI tuvieron significativamente menos neuronas de orexina activadas (figura 13C;  $F=22,47$ ,  $p=0,0001$ ; cirugía simulada frente a TBI  $p=0,001$ , TBI frente a TBI+BCAA  $p=0,01$ ; ANOVA de un factor con prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett). El número total de neuronas de orexina no fue significativamente diferente entre grupos, lo que indica que la lesión afecta al equilibrio fisiológico, y no a la pérdida total de células *per se*, de este circuito de ciclo de sueño-vigilia.

Se ha notificado que las alteraciones del sueño, incluyendo la somnolencia diurna excesiva y el insomnio de mantenimiento de sueño, son una consecuencia destacada y crónica del traumatismo craneoencefálico (TBI) leve. La intervención temprana de los problemas de sueño no solo mejoraría la calidad de vida, sino que también facilitaría la recuperación cognitiva y neuroconductual tras la lesión cerebral. Los datos presentados en el presente documento son los primeros en establecer un modelo de ratón de alteraciones crónicas de sueño/vigilia tras TBI leve, concretamente una incapacidad persistente para mantener el estado de vigilia. En el presente documento, la actividad locomotora y los estados de comportamiento basados en EEG después de un solo traumatismo craneal leve, no penetrante, en ratones se han caracterizado ampliamente. Se demuestra entonces que la activación de neuronas de orexina disminuye en respuesta a un estímulo de vigilia, lo que indica alteraciones en la excitabilidad de la red de orexina, similar a lo que se ha descrito para las redes del hipocampo después de lesión (Cole *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107:366-371).

Dado que los datos muestran déficits inducidos por lesión en la activación de neuronas de orexina, sería eficaz una intervención que restablezca la excitabilidad de la red de orexina, restableciendo de ese modo el estado de vigilia. De hecho, la intervención con aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en la dieta rescató la mayoría de las alteraciones de sueño/vigilia, incluyendo el aumento del tiempo de vigilia, consolidando los episodios de sueño y vigilia y elevando el nivel de activación cerebral al observado en los ratones de control durante situaciones de mayor estado de vigilia. La terapia con BCAA logra este efecto restableciendo los picos espectrales de potencia de EEG, en particular la potencia theta, y restaurando la activación de las neuronas de orexina durante el estado de vigilia.

Se encontró que una sola lesión cerebral leve provoca alteraciones persistentes en los patrones de actividad, en particular durante más de 4 semanas tras la lesión. Este transcurso de tiempo prolongado de enfermedad concuerda con los síntomas de sueño y fatiga notificados en el estado en seres humanos (Verma *et al.* (2007) *J. Clin. Sleep Med.*, 3:357-362; Kempf *et al.* (2010) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81:1402-1405). La persistencia de los síntomas indica una cascada secundaria de efectos tras la lesión que altera de manera cónica la fisiología cerebral.

Una sola lesión cerebral leve también provoca déficits profundos en el EEG cerebral en una imagen en el tiempo a las 2 semanas tras la lesión. Los ratones con lesión muestran déficits principalmente en la fase de oscuridad, cuando los ratones normalmente son más activos. Durante la fase de oscuridad, los ratones con lesión duermen más y no pueden mantener periodos prolongados del estado de vigilia. Tienen estados de comportamiento más fragmentados y pierden la fluctuación diurna normal en la duración del episodio de vigilia. Esto concuerda con las quejas aparentemente paradójicas de somnolencia diurna e insomnio durante la noche notificadas frecuentemente en los pacientes tanto con TBI como con narcolepsia (Verma *et al.* (2007) *J. Clin. Sleep Med.*, 3:357-362; Castriotta *et al.* (2010) *CNS Drugs* 25:175-185; Baumann *et al.* (2007) *Brain* 130:1873-1883). Además, los ratones con lesión no podían mantener el estado de vigilia en situaciones que requerían una activación cerebral aumentada, tal como exposición a un entorno novedoso, y mostraron presión de sueño aumentada tras estos cortos periodos de estado

de vigilia forzado. Estos datos indican que los ratones con lesión tienen menos de la denominada reserva de vigilia, un concepto quizá similar a "reserva cognitiva" en el envejecimiento y la enfermedad neurodegenerativa (Alexander *et al.* (1997) *Am. J. Psychiatry* 154:165-172). Es posible que los síntomas de fatiga y falta de atención notificados ampliamente descritos tras la conmoción cerebral podrían reflejar, de hecho, los mismos mecanismos subyacentes a la disminución de reserva de vigilia (Dockree *et al.* (2004) *Brain Res. Cogn. Brain Res.*, 20:403-414).

Tras la lesión, hay un desplazamiento global en la densidad de potencia de EEG hacia frecuencias más lentas durante el estado de vigilia, en particular para la potencia theta. La ralentización de la frecuencia de pico theta se ha implicado en los déficits cognitivos dependientes del hipocampo y el envejecimiento (Colas *et al.* (2005) *Neurobiol. Aging* 26:265-273; Perouansky *et al.* (2010) *Anesthesiology* 113:1299-1309). Resulta interesante que se observa el mismo desplazamiento hacia la izquierda en el espectro de potencia en pacientes con enfermedad de Alzheimer, que se cree que refleja desconexiones funcionales entre áreas corticales (Moretti *et al.* (2011) *Front Psychiatry* 1:152; Jeong, J. (2004) *Clin. Neurophysiol.*, 115:1490-1505). Las similitudes en la patología de EEG pueden reflejar mecanismos neuropatológicos compartidos entre el TBI y la enfermedad de Alzheimer.

Debido a las similitudes en el fenotipo con la narcolepsia humana, y con los estudios de TBI en humanos que implican la disfunción del sistema de orexina, se investigaron las alteraciones en la expresión del neuropéptido orexina. La implicación de otras regiones del cerebro candidatas que promueven la vigilia es menos probable dado que las lesiones de tales regiones (es decir, sustancia gris periacueductal ventral, locus cerúleo, prosencéfalo basal) no se ajustan con precisión al fenotipo de TBI de fragmentación del sueño superpuesta a la incapacidad para mantener el estado de vigilia (Lu *et al.* (2006) *J. Neurosci.*, 26:193-202; Gompf *et al.* (2010) *J. Neurosci.*, 30:14543-14551; Blanco-Centurion *et al.* (2007) *J. Neurosci.*, 27:14041-14048). En apoyo de la implicación de la orexina, varios estudios en seres humanos han notificado déficits en orexina después del TBI. Un pequeño estudio de 4 pacientes que murieron de 7 a 42 días después de TBI grave mostró una reducción del 27 % en el número de neuronas de orexina en comparación con los controles sin TBI (Baumann *et al.* (2009) *Ann. Neurol.*, 66:555-559). Los niveles medidos de orexina en el CSF fueron bajos en el 95 % de 44 pacientes dentro de los primeros cuatro días del TBI de moderado a grave, observándose los niveles menores de orexina en el CSF en pacientes que estaban en coma (Baumann *et al.* (2005) *Neurology* 65:147-149). Cuando se midió la orexina en el CSF en esos mismos pacientes 6 meses después de la lesión, 4 de los 14 pacientes con somnolencia diurna excesiva continuaban teniendo niveles de orexina bajos, mientras que los que no tenían somnolencia diurna mostraron normalización de los niveles de orexina en el CSF (Baumann *et al.* (2007) *Brain* 130:1873-1883). El impacto cortical controlado (lesión cerebral moderada, penetrante) disminuyó de manera aguda los niveles de orexina cerebral en ratones, tal como se midió mediante microdiálisis intracerebral dentro de los primeros tres días de la lesión (Lim *et al.* (2012) *J. Neurotrauma* 29:1908-1921). El número total de neuronas de orexina no cambió después de la lesión, a diferencia de los hallazgos en el pequeño estudio en seres humano, aunque esto probablemente se explica por las diferencias entre el TBI leve/moderado frente a grave (Lim *et al.* (2012) *J. Neurotrauma* 29:1908-1921; Baumann *et al.* (2009) *Ann. Neurol.*, 66:555-559). Los datos proporcionados en el presente documento indican que la lesión cerebral leve/moderada afecta principalmente a la fisiología de la orexina en lugar de a la pérdida celular total, al menos en las semanas inmediatas tras la lesión.

Aunque se desconocen los mecanismos exactos de la disfunción de la vigilia inducida por lesión, está claro que la intervención de BCAA restablece muchos aspectos del estado de vigilia, incluyendo los déficits subyacentes en las oscilaciones del EEG y la activación de las neuronas de orexina. La terapia con BCAA restablece la excitabilidad de la red y los déficits cognitivos dependientes del hipocampo, posiblemente al restablecer las reservas de glutamato vesicular liberable y GABA (Cole *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107:366-371). De hecho, está bien documentado que las entradas de glutamato en las neuronas de orexina regulan el estado de vigilia, y se ha sugerido que las interneuronas glutamatérgicas desempeñan un papel en un reclutamiento de retroalimentación positiva de orexina en las neuronas de orexina (Acuna-Goycolea *et al.* (2004) *J. Neurosci.*, 24:3013-3022). Además, se ha demostrado que los aminoácidos de la dieta afectan directamente a la excitabilidad de la membrana de las neuronas de orexina; se cree que este mecanismo de detección de macronutrientes explica el papel de la orexina en el apetito (Karnani *et al.* (2012) *Neuron* 72:616-629).

Los aminoácidos de cadena ramificada son aminoácidos esenciales y no pueden sintetizarse *de novo*, y por tanto deben adquirirse a través de la dieta. Una vez en el cerebro, los tres BCAA (L-leucina, L-valina y L-isoleucina) son aminoácidos clave implicados en la síntesis *de novo* del glutamato, ya que aproximadamente el 50 % del glutamato cerebral y el 40 % del glutamato sináptico liberable contienen nitrógeno derivado de BCAA (Yudkoff, M. (1997) *Glia* 21:92-98; Sakai *et al.* (2004) *J. Neurochem.*, 88:612-622). En un pequeño número de estudios en seres humanos, los niveles plasmáticos de BCAA estaban disminuidos con TBI leve y grave, y un estudio de seguimiento encontró que la terapia con BCAA i.v. en el TBI grave produjo una mejora en los desenlaces de incapacidad (Jeter *et al.* (2013) *J. Neurotrauma* 30:671-679; Vuille-Dit-Bille *et al.* (2012) *Amino Acids* 43:1287-1296; Aquilani *et al.* (2005) *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 86:1729-1735). La administración en la dieta de BCAA se ha estudiado ampliamente en personas sanas y en enfermedades a lo largo de muchas décadas (Fernstrom, J.D. (2005) *J. Nutr.*, 135:1539S-1546S). Se ha tratado a pacientes con una variedad de trastornos (incluyendo cirrosis hepática, trastorno bipolar, degeneración espinocerebelosa, por nombrar algunos), con BCAA durante duraciones de tiempo variables mayores de 2 años sin efectos adversos (Muto *et al.* (2005) *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3:705-713). En general, la terapia con BCAA se tolera bien y está asociada con efectos secundarios mínimos o nulos, y por tanto es una terapia viable para el TBI leve.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de traumatismo craneoencefálico, en la que la composición comprende valina, leucina, isoleucina, un agente de enmascaramiento del sabor, un edulcorante y un agente saborizante, y en la que el tratamiento es para reducir en un sujeto la patología asociada con traumatismo craneoencefálico.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho agente de enmascaramiento del sabor es una sal de gluconato.
4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho edulcorante es sucralosa.
5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es un líquido o un polvo.
6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende valina, leucina, isoleucina, un agente de enmascaramiento del sabor, y un edulcorante en una razón de 1:1:1:1,3:0,9.
7. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además acetato.
8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que dicho acetato es triacetato de glicerilo (GTA).
9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es para administración oral.
10. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es para administración durante al menos 10 días consecutivos.
11. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es para administración a una dosis para proporcionar al menos 60 g de valina, leucina e isoleucina por día.
12. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es para su uso en el tratamiento de deterioro cognitivo asociado con traumatismo craneoencefálico.
13. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición es para su uso en el tratamiento de una reducción en el umbral de convulsiones asociado con traumatismo craneoencefálico.
14. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición es para su uso en el tratamiento del trastorno del sueño asociado con traumatismo craneoencefálico.
15. Un aminoácido de cadena ramificada para su uso en el tratamiento de un trastorno del sueño en un sujeto asociado con traumatismo craneoencefálico.
16. Un aminoácido de cadena ramificada para su uso según la reivindicación 15, en el que el aminoácido de cadena ramificada se selecciona del grupo que consiste en valina, leucina e isoleucina.
17. El aminoácido de cadena ramificada para su uso según la reivindicación 15 o 16, en el que dicho tratamiento comprende administrar valina, leucina e isoleucina a dicho sujeto.
18. El aminoácido de cadena ramificada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que dicho aminoácido de cadena ramificada está en una composición con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
19. El aminoácido de cadena ramificada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que dicho trastorno del sueño se selecciona del grupo que consiste en insomnio, fatiga y somnolencia.
20. El aminoácido de cadena ramificada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el tratamiento comprende además administrar acetato a dicho sujeto.
21. El aminoácido de cadena ramificada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que dicho aminoácido de cadena ramificada es para administración por vía oral o por vía nasal.

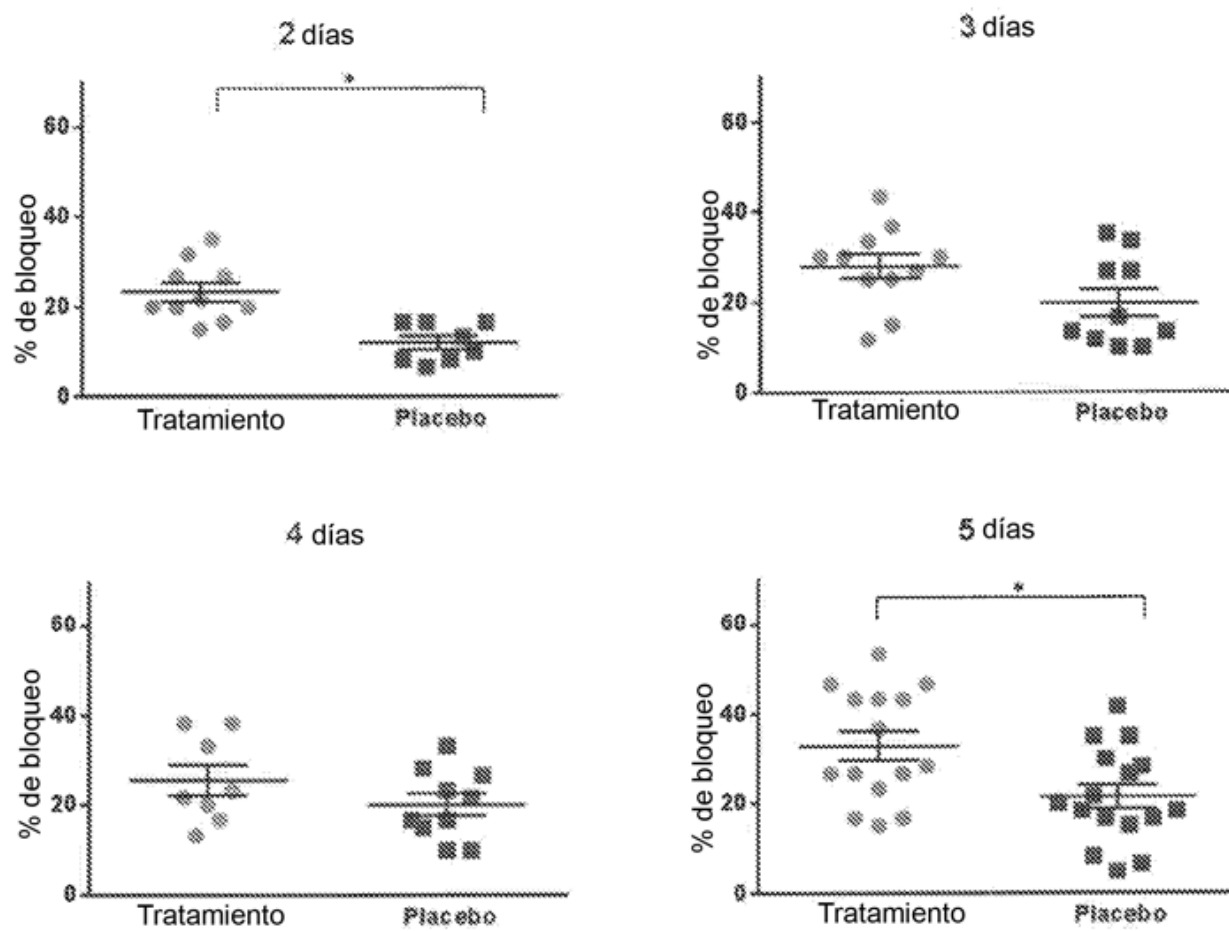


Figura 1

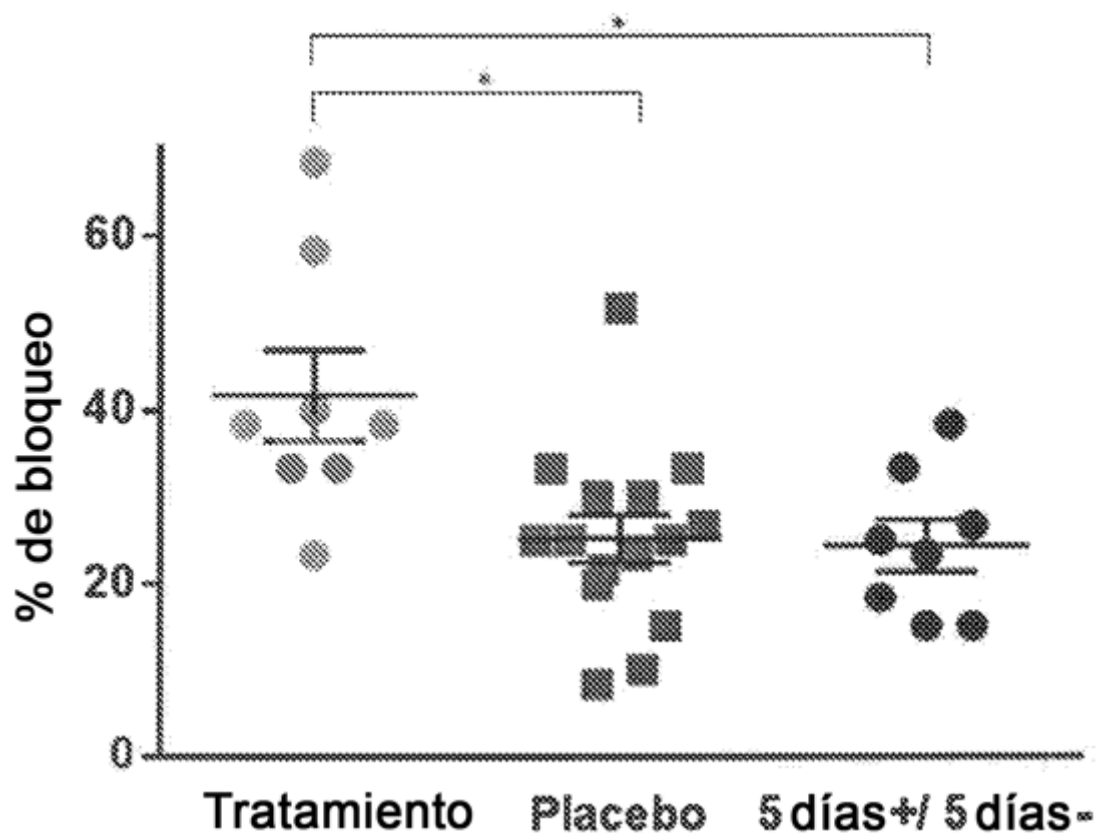


Figura 2

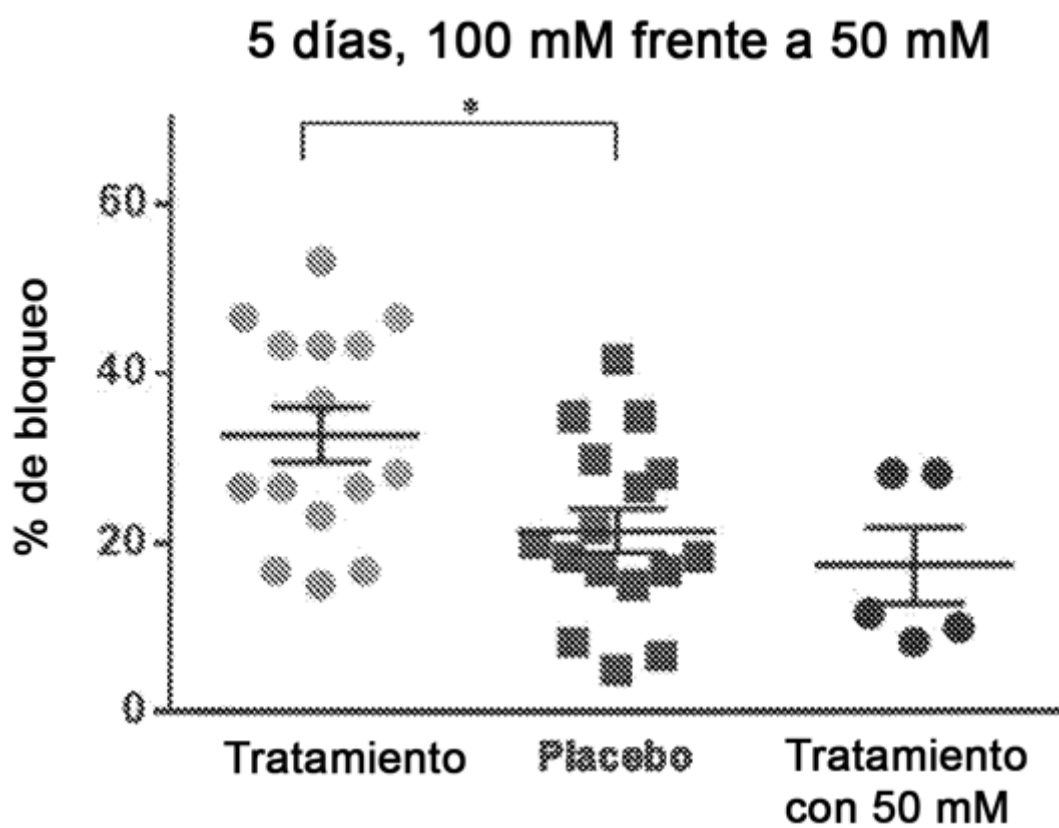
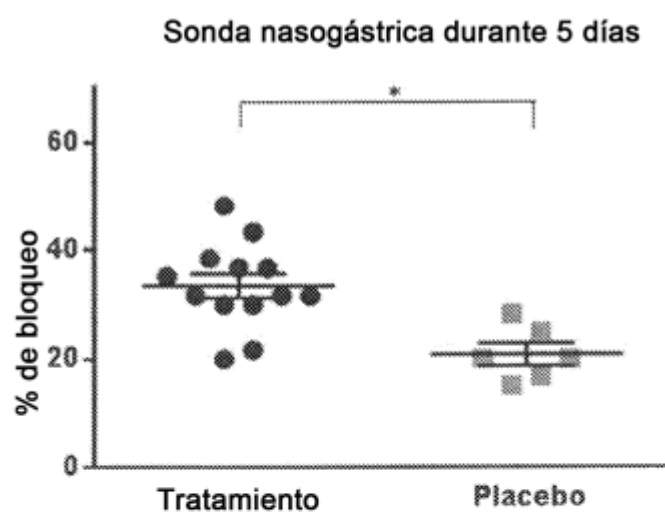
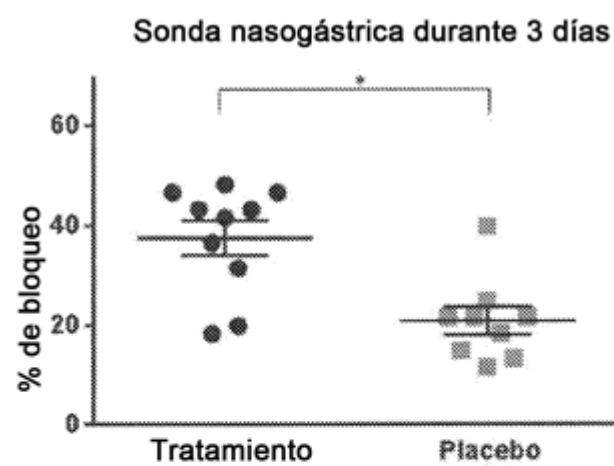


Figura 3



**Figura 4**

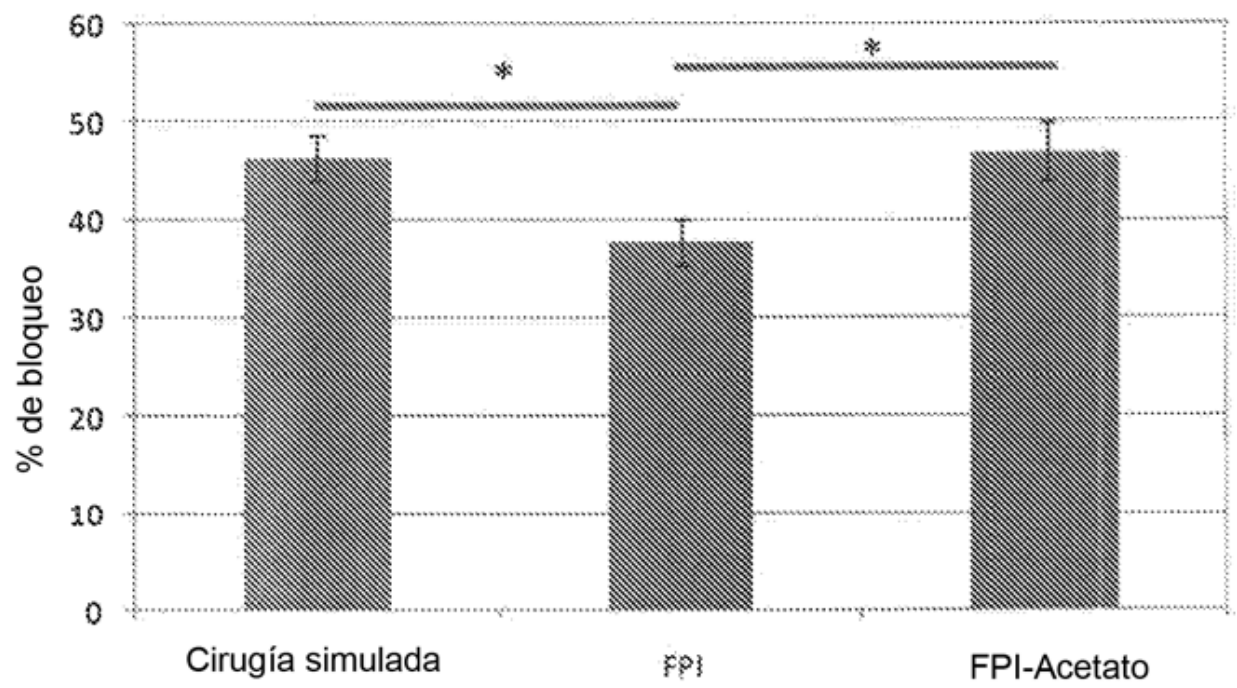
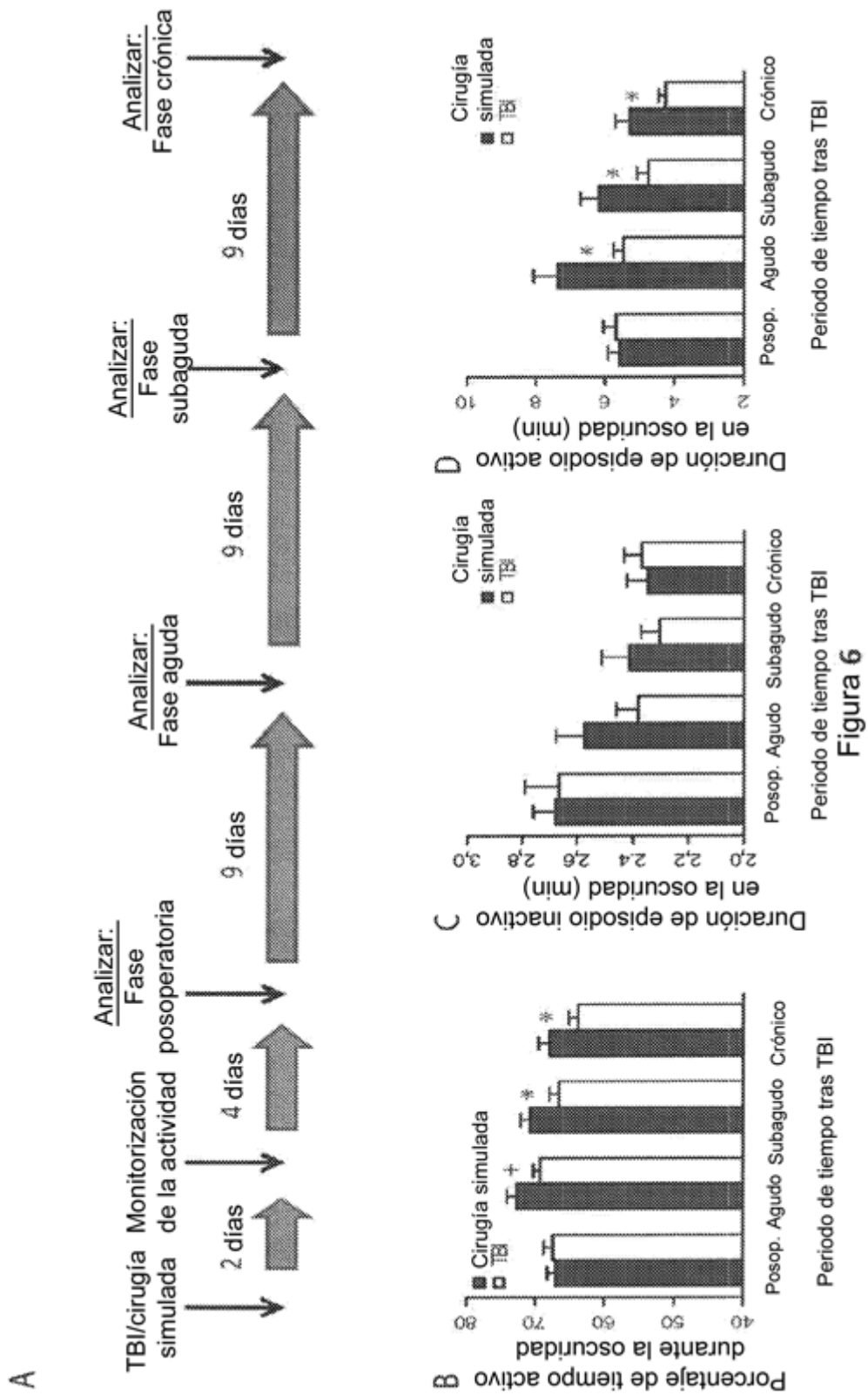


Figura 5



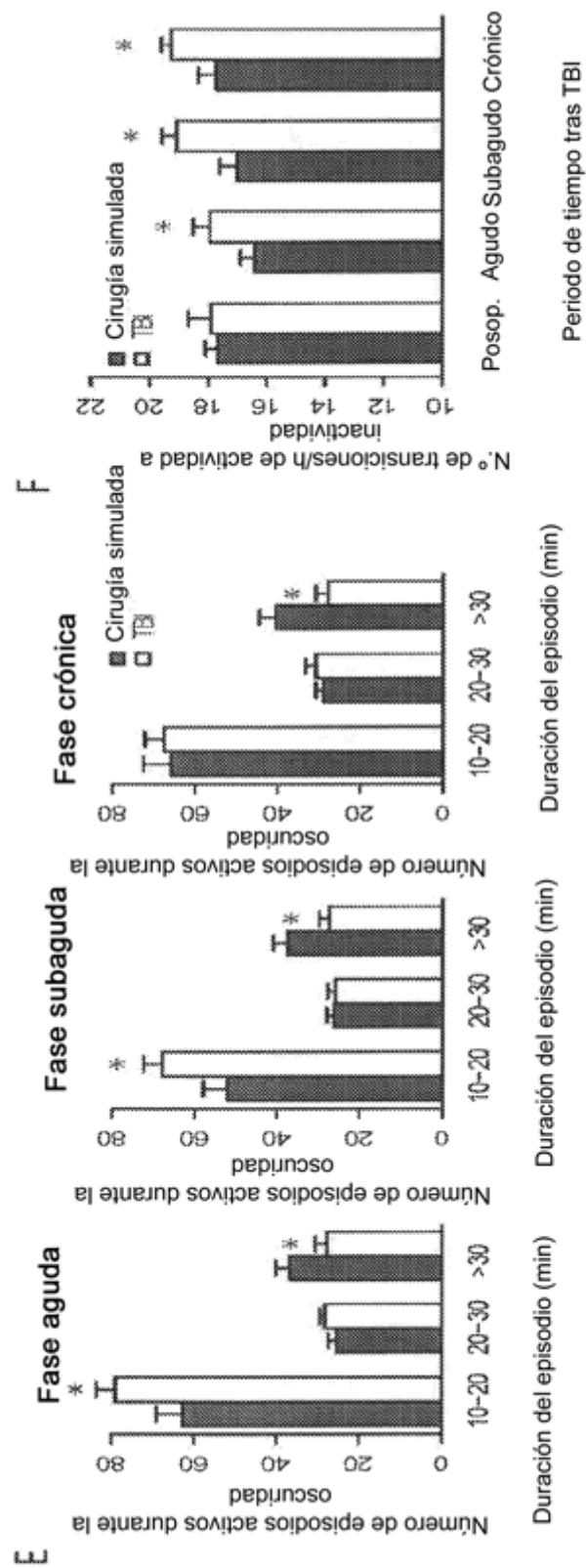


Figura 6

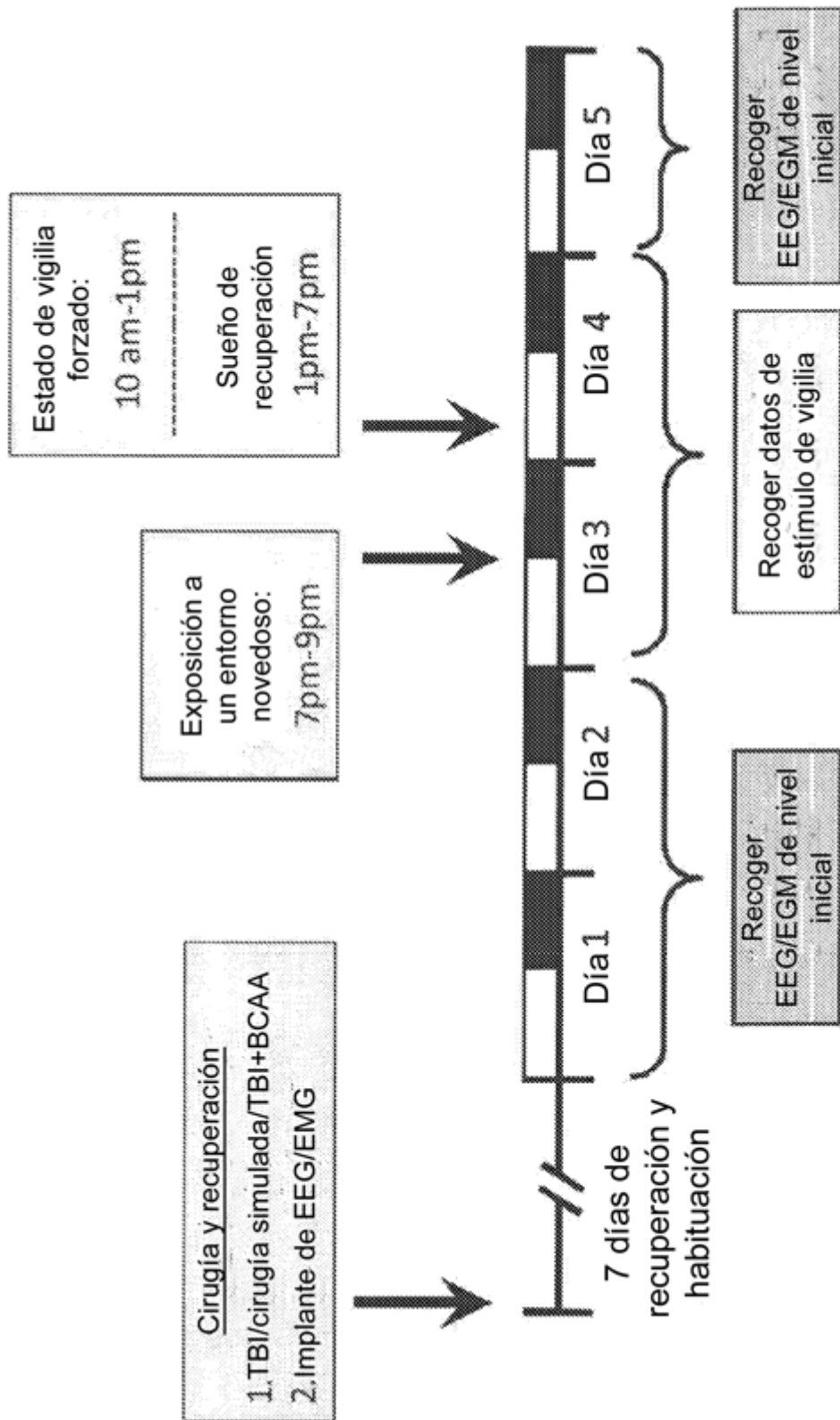
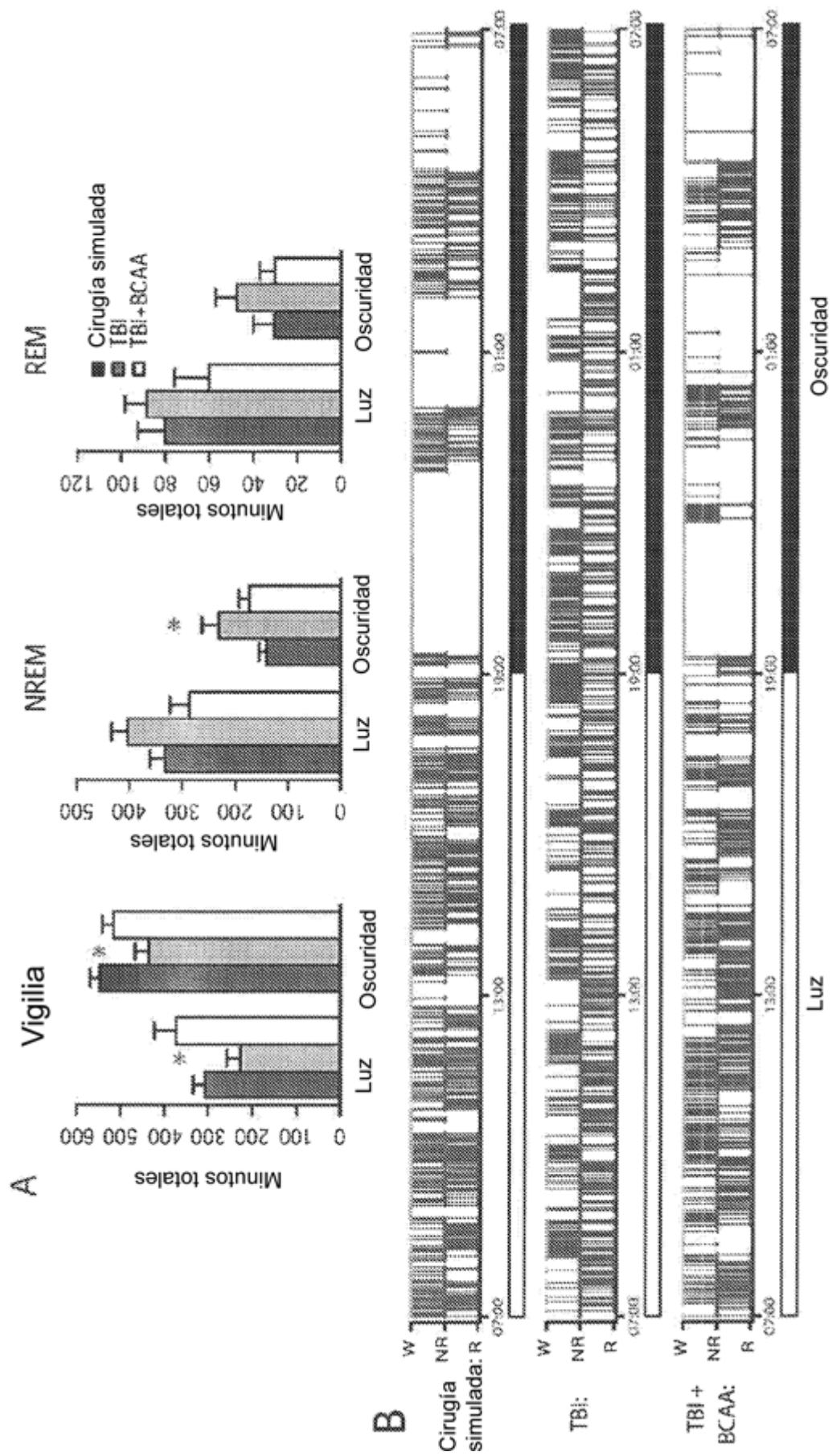
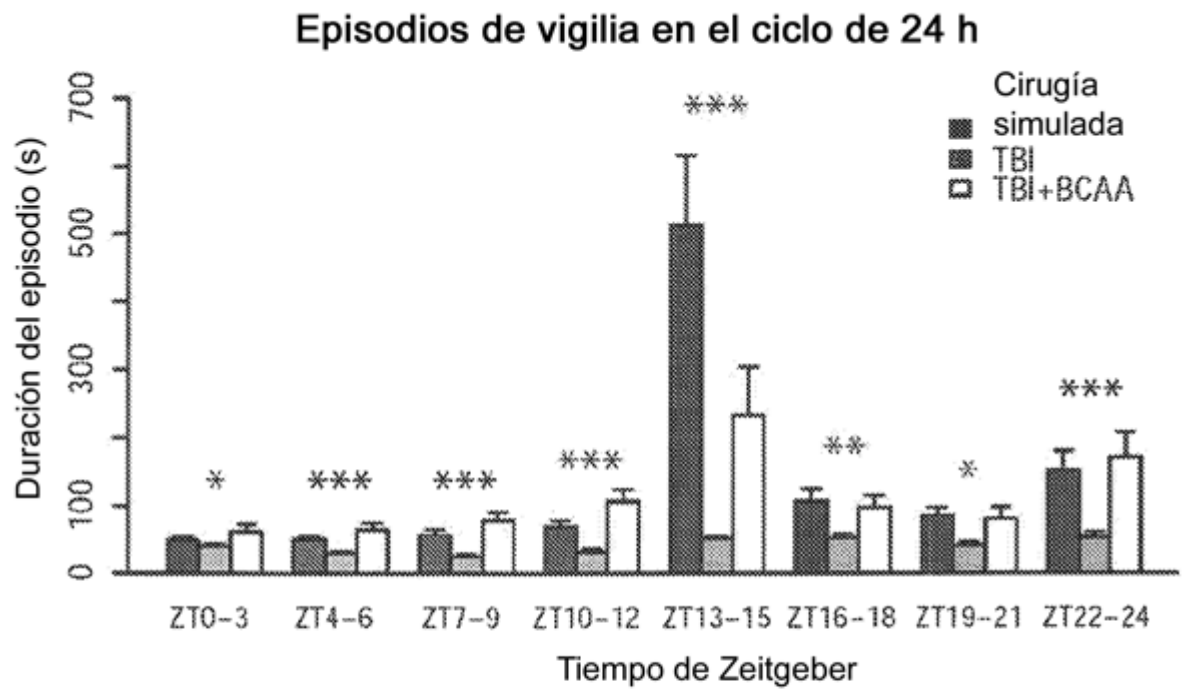


Figura 7



**Figura 8**

C



D

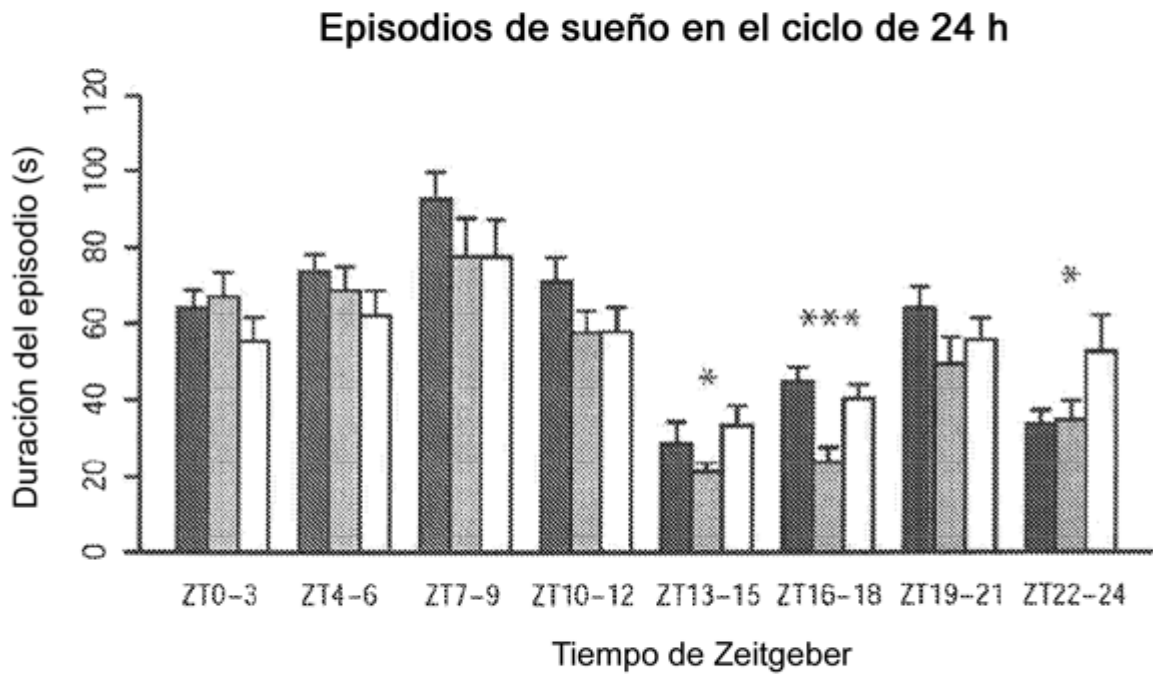


Figura 8

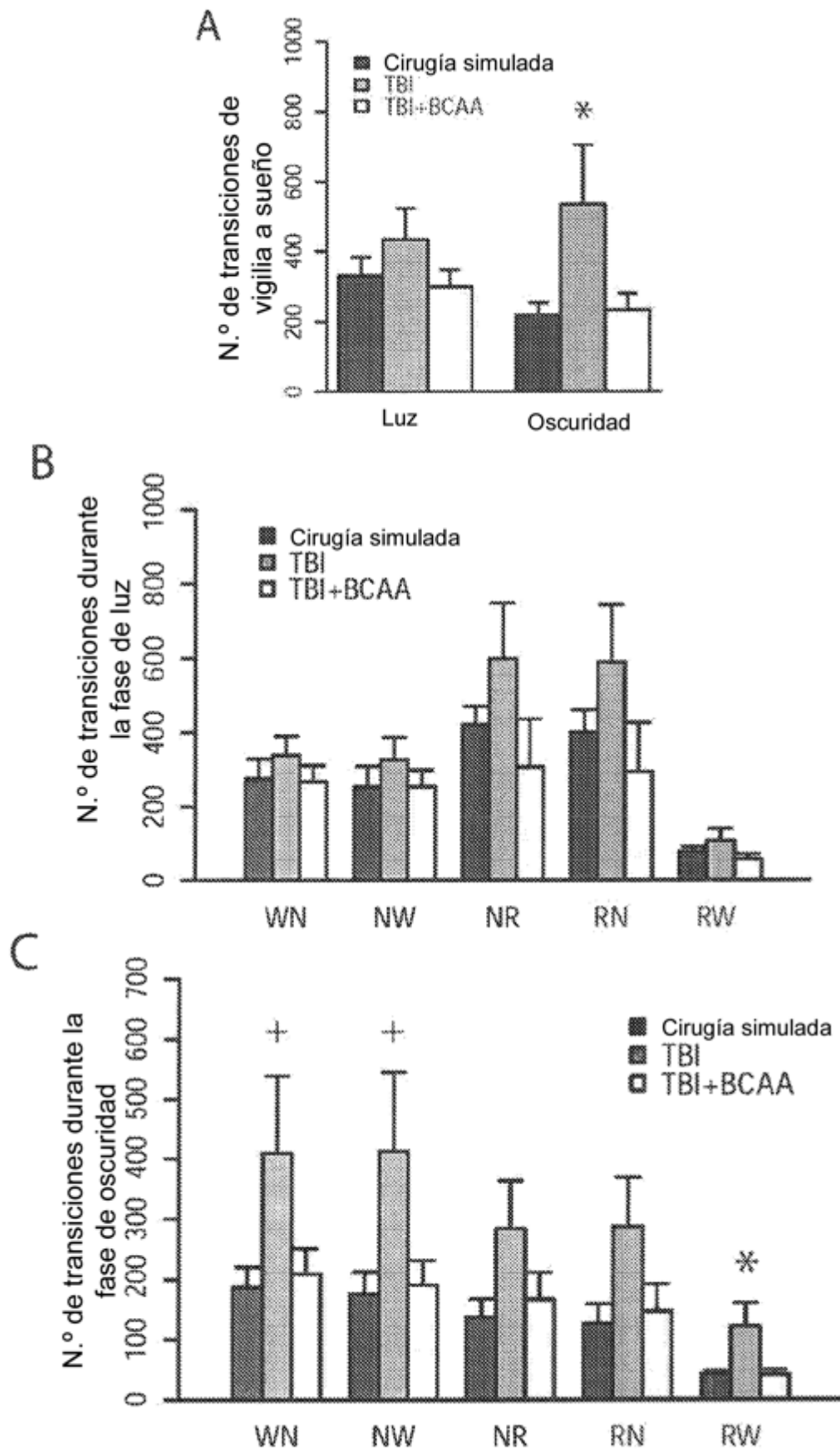


Figura 9

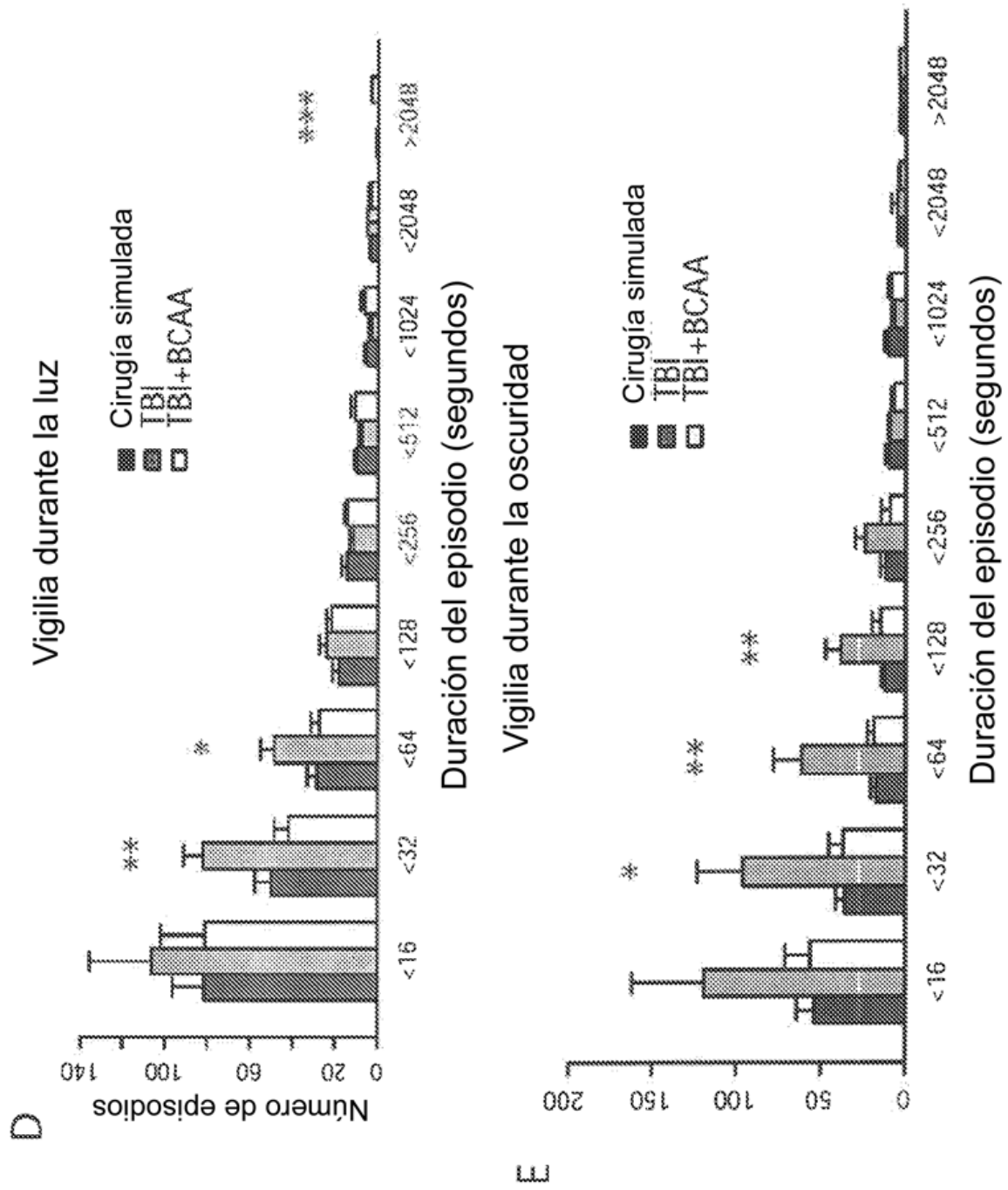


Figura 9

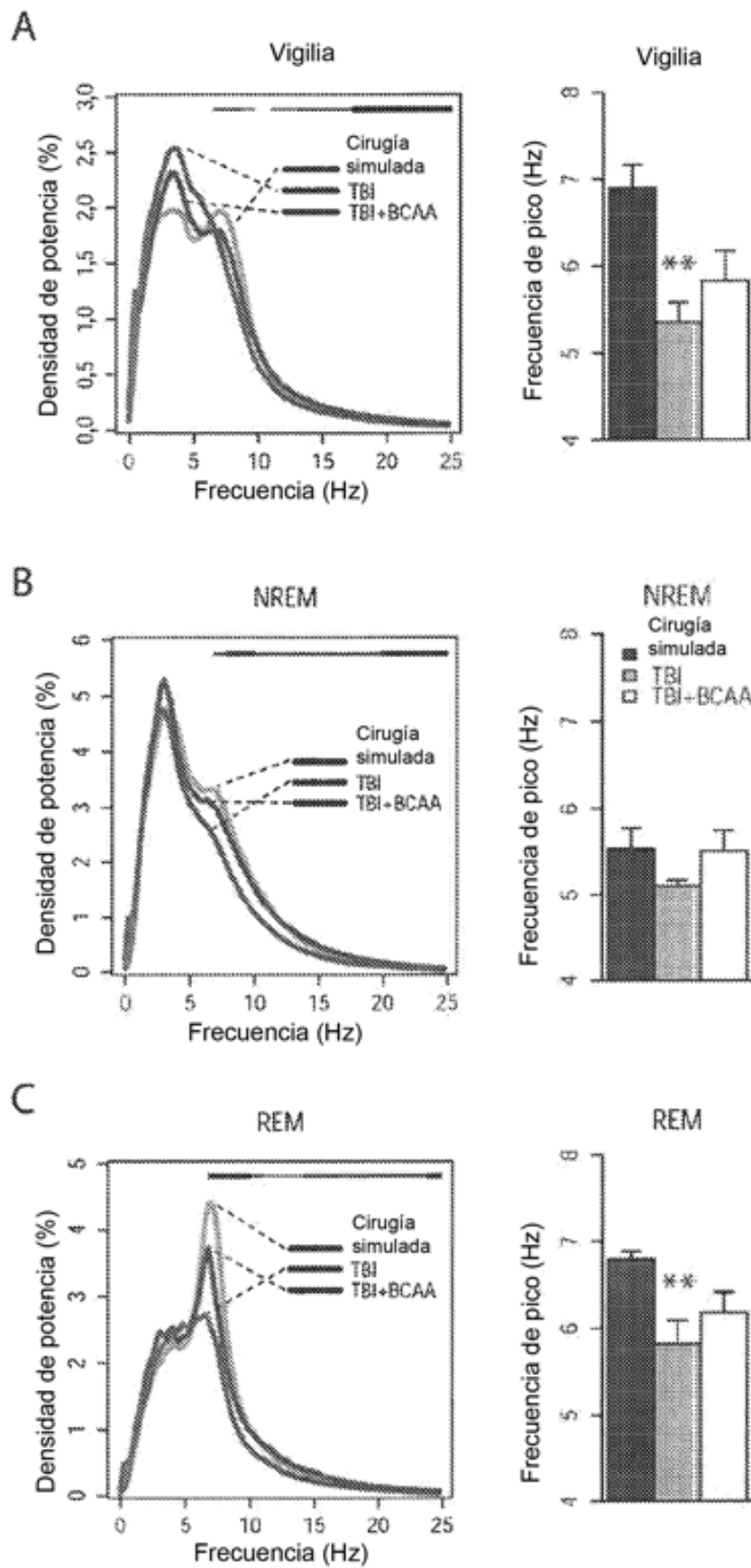


Figura 10

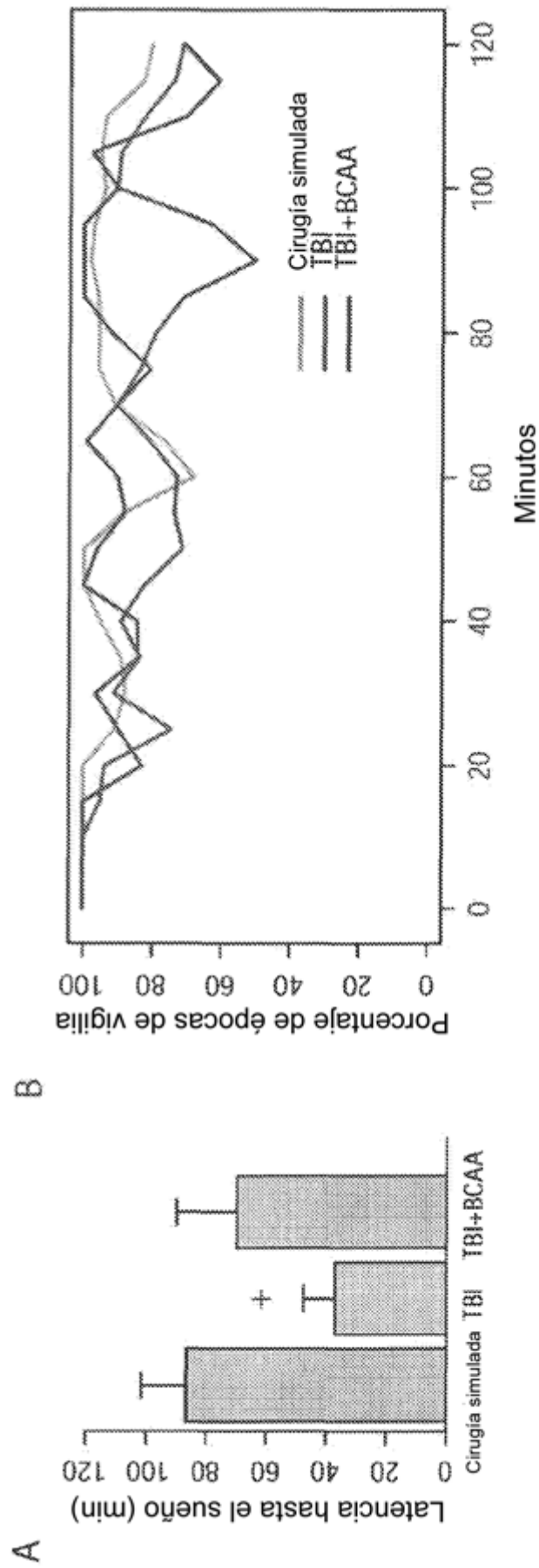


Figura 11

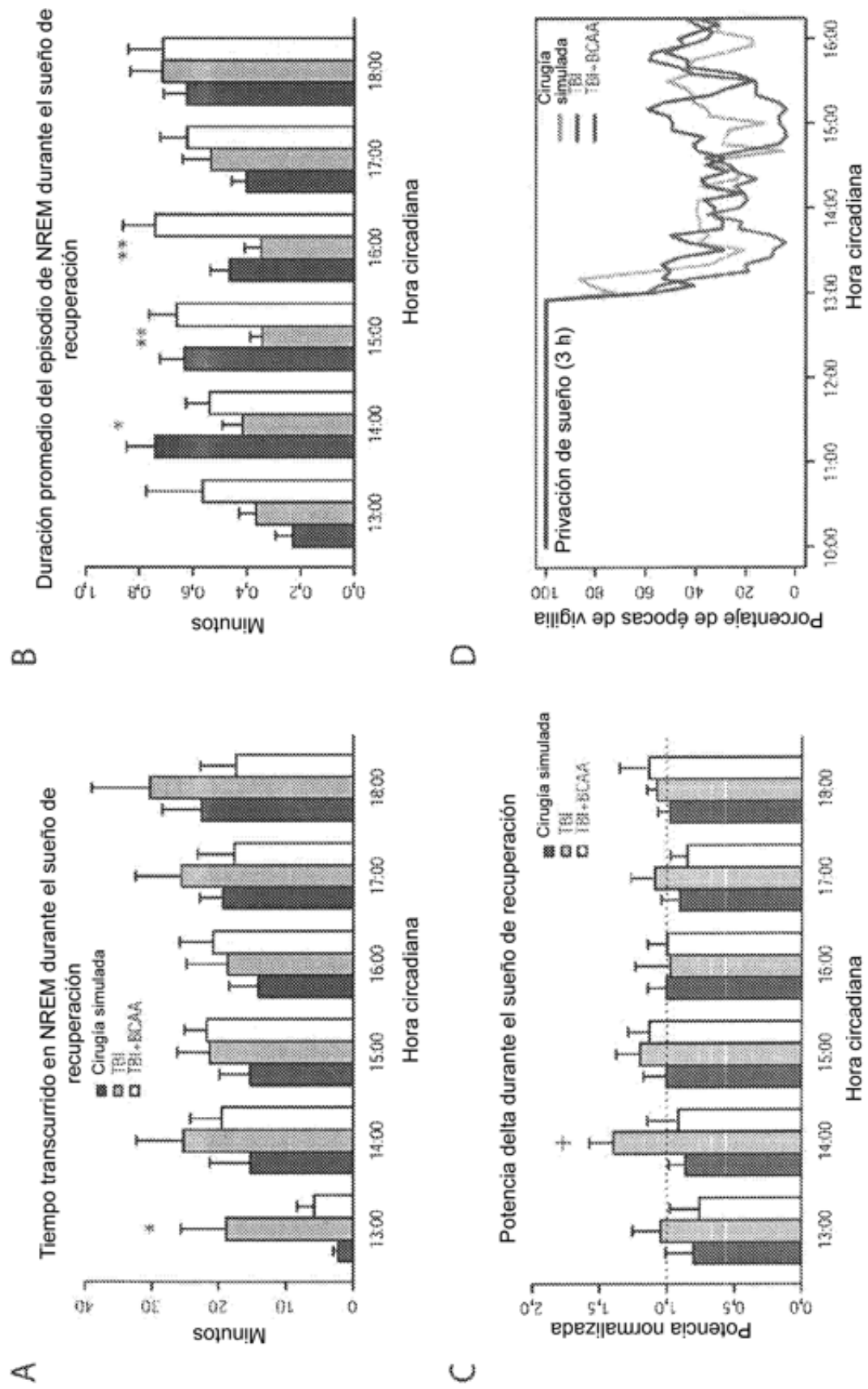


Figura 12

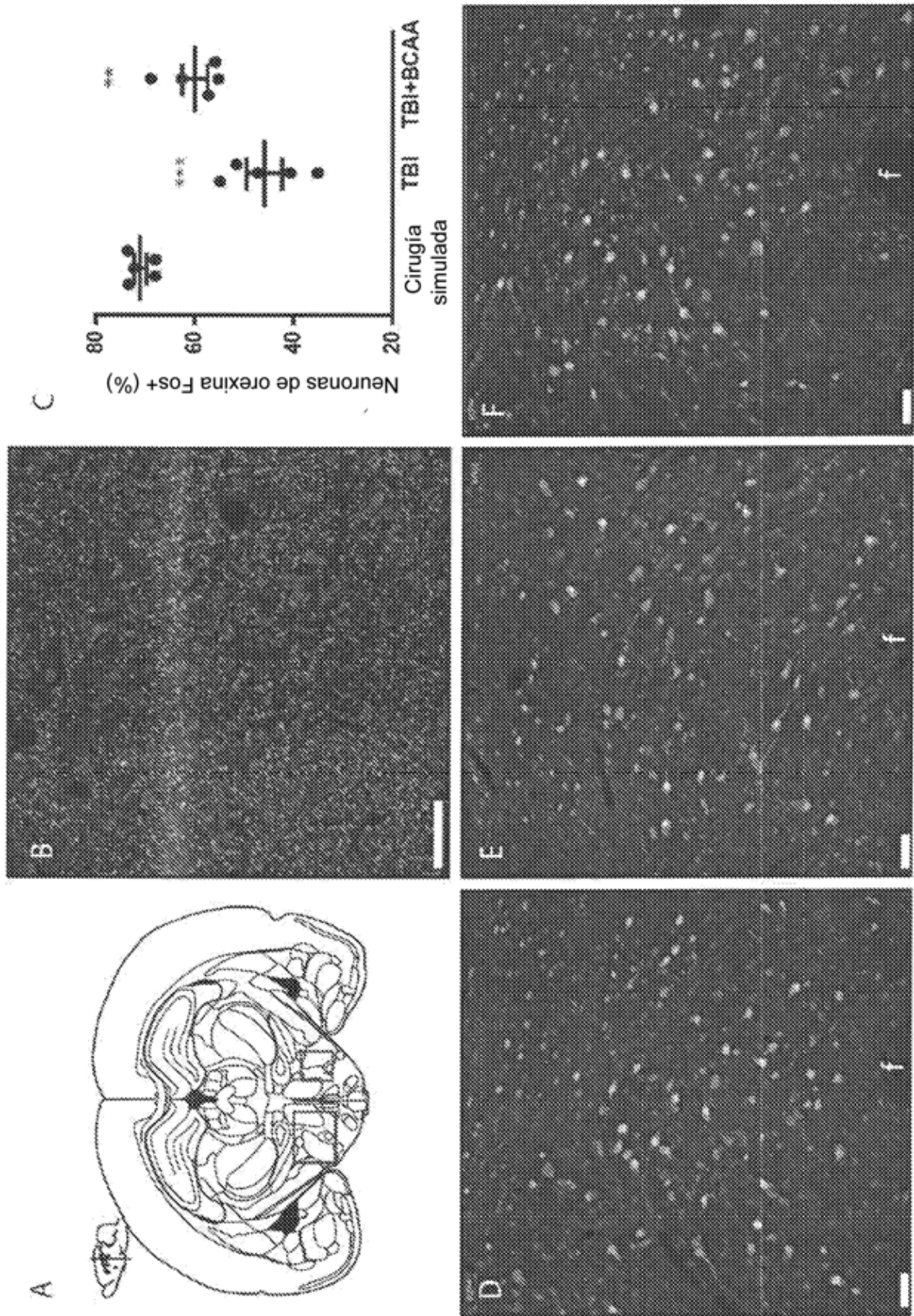


Figura 13