

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 004 332**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61K 31/09** (2006.01)  
**A61K 31/706** (2006.01)  
**A61K 31/7052** (2006.01)  
**C07C 15/52** (2006.01)  
**C07C 39/205** (2006.01)  
**C07H 19/02** (2006.01)  
**C07H 19/048** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2018 PCT/US2018/032932**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018 WO18213420**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2018 E 18803104 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3624783**

---

(54) Título: **Tratamiento y prevención de la esclerosis lateral amiotrófica con nicotinamida ribosidas y pterostilbeno**

(30) Prioridad:

**17.05.2017 US 201762507585 P  
05.01.2018 US 201862614003 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2025**

(73) Titular/es:

**UNIVERSITAT DE VALENCIA - ESTUDI GENERAL (33.33%)  
Avda. Blasco Ibañez 13  
46010 Valencia, ES;  
FUNDACIÓN UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA SAN VICENTE MÁRTIR (33.33%) y ELYSIUM HEALTH, INC. (33.33%)**

(72) Inventor/es:

**ESTRELA ARIGÜEL, JOSÉ MARÍA;  
DE LA RUBIA ORTI, JOSÉ ENRIQUE y  
DELLINGER, RYAN**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 3 004 332 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento y prevención de la esclerosis lateral amiotrófica con nicotinamida ribosidas y pterostilbeno

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional estadounidense No. 62/507585, presentada el 17 de mayo de 2017, y la Solicitud Provisional estadounidense No. 62/614003, presentada el 5 de enero de 2018.

Antecedentes

10 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad degenerativa progresiva del sistema motor voluntario que se caracteriza por rigidez muscular, espasmos musculares y debilidad que empeora gradualmente debido a la disminución del tamaño de los músculos. La progresión de la enfermedad produce dificultad para hablar, tragar y respirar, lo que finalmente conduce a insuficiencia respiratoria y muerte en la mayoría de los pacientes afectados. La supervivencia media desde la aparición de la enfermedad hasta la muerte es de dos a cuatro años. Hasta la fecha, no existe cura y se han desarrollado pocas terapias para la ELA. De acuerdo con lo anterior, existe una gran necesidad de nuevas composiciones y métodos para el tratamiento de la ELA y otras enfermedades de las neuronas motoras.

15 El documento WO 2007/008548 se refiere a métodos y composiciones para tratar o prevenir trastornos metabólicos, como la obesidad y la diabetes. Los métodos ejemplares comprenden poner en contacto una célula con un compuesto activador de sirtuina, tal como una flavona, estilbeno, flavanona, isoflavona, catequina, chalcona, tanino o antocianidina, o un compuesto inhibidor, tal como nicotinamida.

Resumen

20 De acuerdo con ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones para su uso en métodos de tratamiento o prevención de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto mediante la administración al sujeto (por ejemplo, administrar por vía oral al sujeto) una composición que comprende un ribósido de nicotinamida y pterostilbeno.

25 En ciertos aspectos, las composiciones proporcionadas en este documento son para su uso en un método para retardar o revertir la progresión de la ELA en un sujeto mediante la administración al sujeto (por ejemplo, administrar por vía oral al sujeto) una composición que comprende ribósido de nicotinamida y pterostilbeno.

30 En ciertas realizaciones, la composición comprende al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 300 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, al menos 1000 mg, al menos 1100 mg, al menos 1200 mg, al menos 1300 mg, al menos 1400 mg, al menos 1500 mg, al menos 1600 mg, al menos 1700 mg, al menos 1800 mg, al menos 1900 mg, al menos 2000 mg, al menos 2100 mg, al menos 2200 mg, al menos 2300 mg o al menos 2400 mg de ribósido de nicotinamida. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg o al menos 600 mg de pterostilbeno. En ciertas realizaciones, 35 la composición comprende al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 300 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, al menos 1000 mg, al menos 1100 mg, al menos 1200 mg, al menos 1300 mg, al menos 1400 mg, al menos 1500 mg, al menos 1600 mg, al menos 1700 mg, al menos 1800 mg, al menos 1900 mg, al menos 2000 mg, al menos 2100 mg, al menos 2200 mg, al menos 2300 mg, o al menos 2400 mg de ribósido de nicotinamida y al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg o al menos 600 mg de pterostilbeno. En ciertas realizaciones, 40 la composición comprende al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 300 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, al menos 1000 mg, al menos 1100 mg, al menos 1200 mg, al menos 1300 mg, al menos 1400 mg, al menos 1500 mg, al menos 1600 mg, al menos 1700 mg, al menos 1800 mg, al menos 1900 mg, al menos 2000 mg, al menos 2100 mg, al menos 2200 mg, al menos 2300 mg, o al menos 2400 mg de ribósido de nicotinamida y al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg o al menos 600 mg de pterostilbeno.

45 En ciertas realizaciones, el método comprende administrar una pluralidad de dosis de la composición. En algunas realizaciones, se administran al menos 7 dosis de la composición. En algunas realizaciones, se administran al menos 30 dosis de la composición. En algunas realizaciones, se administran al menos 60 o más dosis de la composición. En algunas realizaciones, cada dosis comprende al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 300 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, al menos 1000 mg, al menos 1100 mg, al menos 1200 mg, al menos 1300 mg, al menos 1400 mg, al menos 1500 mg, al menos 1600 mg, al menos 1700 mg, al menos 1800 mg, al menos 1900 mg, al menos 2000 mg, al menos 2100 mg, al menos 2200 mg, al menos 2300 mg, o al menos 2400 mg de ribósido de nicotinamida. En algunas realizaciones, cada dosis comprende al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg o al menos 600 mg de pterostilbeno. 50 En ciertas realizaciones, cada dosis comprende al menos 2200 mg, al menos 2300 mg, o al menos 2400 mg de ribósido de nicotinamida. En algunas realizaciones, cada dosis comprende al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg o al menos 600 mg de pterostilbeno.

55 En ciertas realizaciones, cada dosis comprende al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 300 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, al menos

1000 mg, al menos 1100 mg, al menos 1200 mg, al menos 1300 mg, al menos 1400 mg, al menos 1500 mg, al menos 1600 mg, al menos 1700 mg, al menos 1800 mg, al menos 1900 mg, al menos 2000 mg, al menos 2100 mg, al menos 2200 mg, al menos 2300 mg o al menos 2400 mg de ribósido de nicotinamida y al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg o al menos 600 mg de pterostilbeno.

En ciertas realizaciones, se administra una dosis de la composición a intervalos regulares durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, se administra una dosis de la composición al menos una vez a la semana. En algunas realizaciones, se administra una dosis de la composición al menos dos veces por semana. En ciertas realizaciones, se administra una dosis de la composición al menos tres veces por semana. En algunas realizaciones, se administra una dosis de la composición al menos una vez al día. En algunas realizaciones, se administra una dosis de la composición al menos dos veces al día. En algunas realizaciones, las dosis de la composición se administran durante al menos 1 semana, durante al menos 2 semanas, durante al menos 3 semanas, durante al menos 4 semanas, durante al menos 1 mes, durante al menos 2 meses, durante al menos 3 meses, durante al menos 4 meses, durante al menos 5 meses, durante al menos 6 meses o durante al menos 1 año.

En algunas realizaciones, al sujeto se le realiza una prueba de función motora y/o una prueba de función cognitiva y de conducta. La prueba de función motora puede ser la Escala Revisada de Calificación Funcional para la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALSFRS-R). La prueba de cognición y conducta puede incluir el Test de Aprendizaje Verbal Complutense (TAVEC), el Test de Modalidades Símbolo-Dígito (SDMT), el Test de Fluidez Verbal, la Prueba de Dígitos (Escala de Memoria de Wechsler III), el Test de Atención D2, la Escala de Memoria de Wechsler III para Letras y Números, el Test de la Torre de Londres, el Test de Stroop, la Escala de Conducta del Sistema Frontal (FrSBe) o el Test Breve (conducta subjetiva).

En algunas realizaciones, el método comprende además medir una característica (por ejemplo, una característica asociada con la inflamación) en el sujeto. Algunos ejemplos de características que pueden evaluarse son el nivel de una citocina, el nivel de proteína amiloide A, el nivel del marcador de activación de macrófagos neopterina, el nivel de creatina fosfoquinasa (CPK), el nivel de velocidad de sedimentación globular, el nivel de proteína C reactiva, la viscosidad plasmática y/o el recuento de glóbulos blancos.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un suplemento de ácido graso (por ejemplo, aceite de coco) al sujeto.

En ciertas realizaciones, la composición está formulada para administración oral. En algunas realizaciones, la composición se formula como una píldora, un comprimido o una cápsula. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía oral. En ciertas realizaciones, la composición se autoadministra.

#### Breve Descripción De Los Dibujos

35 La FIG. 1 muestra curvas de Kaplan-Meier que comparan el tiempo de supervivencia entre grupos de ratones. WT, ratones de tipo silvestre B6SJLF1/J; SOD1, ratones transgénicos SOD1 G93A; NR, ratones tratados con nicotinamida ribósido; PT, ratones tratados con pterostilbeno; R, ratones tratados con resveratrol.

La FIG. 2 muestra el número de ratones sobrevivientes cada semana para diferentes grupos de tratamiento de ratones.

La FIG. 3 muestra las puntuaciones neurológicas de diferentes grupos de tratamiento de ratones en cada semana.

40 La FIG. 4 muestra los resultados de la prueba de elevación de la cola de diferentes grupos de tratamiento de ratones en cada semana.

La FIG. 5 muestra los resultados de la prueba rotarod de diferentes grupos de tratamiento de ratones en cada semana.

La FIG. 6 muestra los resultados de la prueba del alambre colgante de diferentes grupos de tratamiento de ratones en cada semana.

45 La FIG. 7 muestra los resultados de la prueba del plano inclinado de diferentes grupos de tratamiento de ratones en cada semana.

La FIG. 8 muestra los resultados de la actividad motora mediante la evaluación automática de diferentes grupos de tratamiento de ratones en cada período.

50 La FIG. 9 muestra los resultados de las mediciones electrofisiológicas de diferentes grupos de tratamiento de ratones en la semana 8 y la semana 18.

#### Descripción detallada

##### General

Se proporcionan aquí composiciones para su uso en un método para tratar y/o prevenir la ELA y/o para retardar o revertir la ELA mediante la administración de una composición que comprende ribósido de nicotinamida y pterostilbeno.

#### Definiciones

Para mayor comodidad, se recogen aquí ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

Los artículos "un" y "una" se utilizan aquí para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administrar" significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto, e incluye, pero no se limita a, la administración por un profesional médico y la autoadministración. La administración de una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto puede llevarse a cabo utilizando uno de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un compuesto o un agente se puede administrar por vía intravenosa, arterial, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, ocular, sublingual, oral (por ingestión), intranasal (por inhalación), intraespinal, intracerebral y transdérmica (por absorción, por ejemplo, a través de un conducto cutáneo). Un compuesto o agente también puede introducirse de forma apropiada mediante dispositivos poliméricos recargables o biodegradables u otros dispositivos, por ejemplo, parches y bombas, o formulaciones, que proporcionan una liberación prolongada, lenta o controlada del compuesto o agente. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, varias veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Los métodos apropiados para administrar una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto también dependerán, por ejemplo, de la edad y/o la condición física del sujeto y de las propiedades químicas y biológicas del compuesto o agente (por ejemplo, solubilidad, digestibilidad, biodisponibilidad, estabilidad y toxicidad). En algunas realizaciones, un compuesto o un agente se administra por vía oral, por ejemplo, a un sujeto por ingestión. En algunas realizaciones, el compuesto o agente administrado por vía oral se encuentra en una formulación de liberación prolongada o de liberación lenta, o se administra utilizando un dispositivo para dicha liberación lenta o prolongada.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en este documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente o material encapsulante de solvente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" significa un animal humano o no humano seleccionado para tratamiento o terapia.

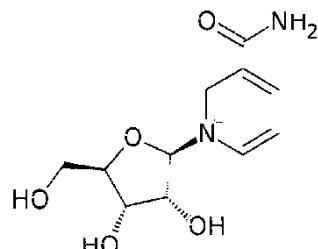
Las frases "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad efectiva" como se utiliza en este documento significa la cantidad de un agente que es eficaz para producir el efecto terapéutico deseado en al menos una subpoblación de células en un sujeto con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

"Tratar" una enfermedad en un sujeto o "tratar" a un sujeto con una enfermedad se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un medicamento, de manera que al menos un síntoma de la enfermedad se reduzca o se prevenga su empeoramiento.

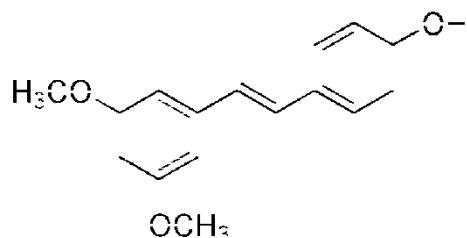
#### Composiciones

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden ribósido de nicotinamida y pterostilbeno, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones.

El ribósido de nicotinamida es una forma de nucleósido de piridina de niacina (es decir, vitamina B<sub>3</sub>) que sirve como precursor del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>). Tal como se utiliza en el presente documento, "ribósido de nicotinamida" también incluye sales de ribósido de nicotinamida, tales como cloruro de ribósido de nicotinamida. La estructura química del ribósido de nicotinamida se proporciona a continuación:



El pterostilbeno es un estilbenoide y un análogo del polifenol resveratrol que presenta mejor biodisponibilidad debido a la presencia de dos grupos metoxi que le permiten tener mayor absorción lipofílica y oral así como una vida media más larga debido a la oxidación reducida. La estructura química del pterostilbeno se proporciona a continuación:



Se proporcionan aquí composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos aquí (es decir, ribósido de nicotinamida y/o pterostilbeno), formulados junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los agentes descritos en este

5 documento pueden administrarse como tales o administrarse en mezclas con portadores farmacéuticamente aceptables y también pueden administrarse junto con otros agentes. La terapia conjuntiva incluye así la administración secuencial, simultánea y separada, o coadministración, de uno o más compuestos de la invención, en el que los efectos terapéuticos del primer compuesto administrado no han desaparecido completamente cuando se administra el compuesto subsiguiente.

10 Como se describe en detalle a continuación, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluidas aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, brebajes (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellos destinados a la absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, 15 pastas para aplicación en la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; o (3) por vía sublingual.

20 En algunas realizaciones, la composición comprende agentes adicionales. Por ejemplo, la composición puede comprender un agente nutricional, tal como un antioxidante. Algunos ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

25 Las formulaciones de los compuestos descritos en este documento pueden presentarse en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única generalmente será la cantidad del agente que produce un efecto terapéutico.

30 En ciertas realizaciones, una formulación descrita en este documento comprende un excipiente, que incluye, pero no se limitan a, ciclodextrinas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo, ácidos biliares y portadores poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un agente de la invención. En algunas realizaciones, una formulación antes mencionada hace que un agente de la invención esté biodisponible por vía oral. Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones pueden incluir la etapa de asociar un compuesto de la invención con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios.

35 Las formas de dosificación líquidas para administración oral de las formulaciones proporcionadas en este documento incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

40 Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

45 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

50 Las formulaciones proporcionadas en este documento adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sobres, píldoras, comprimidos, pastillas (utilizando una base saborizada, normalmente sacarosa y goma

arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de un compuesto de la invención como ingrediente activo. Un compuesto de la invención también puede administrarse como bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tampón. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina de cubierta blanda y dura utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Se puede fabricar una tableta por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos comprimibles se pueden preparar utilizando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmelcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Las tabletas moldeadas se pueden fabricar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Las tabletas y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo que contienen utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmelcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Las composiciones descritas en este documento también pueden formularse para una liberación rápida, por ejemplo, liofilizado. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retenga bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libere el o los ingredientes activos sólo, o preferentemente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede presentarse en forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites de coco, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluides adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

#### Métodos terapéuticos

En el presente documento se proporcionan composiciones para su uso en métodos de tratamiento de ELA en un sujeto mediante la administración al sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesita) una composición divulgada en este documento (por ejemplo, nicotinamida ribósido y pterostilbeno). En algunos aspectos, se proporcionan en este documento composiciones para su uso en métodos para retardar o revertir la progresión de ELA en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una composición divulgada en este documento (por ejemplo, una composición que comprende ribósido de nicotinamida y pterostilbeno).

En algunas realizaciones, el sujeto puede tener o estar predispuesto a una enfermedad de la neurona motora (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), como la ELA del bulbo raquídeo o la ELA del tronco encefálico).

Los niveles de dosificación reales y el régimen de administración de las composiciones divulgadas en este documento se pueden variar para obtener una cantidad de ribósido de nicotinamida y pterostilbeno que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxica para el paciente.

En algunas realizaciones, la administración de la composición comprende la administración de la composición en una o más dosis. En algunas realizaciones, la administración de la composición comprende la administración de la composición en una o más, cinco o más, diez o más, veinte o más, treinta o más, cuarenta o más, cincuenta o más, cien o más, o mil o más dosis. En algunas realizaciones, la dosis comprende al menos 100 mg, al menos 200 mg, al menos 300 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, al menos 1000 mg, al menos 1100 mg, al menos 1200 mg, al menos 1300 mg, al menos 1400 mg, al menos 1500 mg, al menos 1600 mg, al menos 1700 mg, al menos 1800 mg, al menos 1900 mg, al menos 2000 mg, al menos 2100 mg, al menos 2200 mg, al menos 2300 mg, al menos 2400 mg, al menos 2500 mg, al menos 2600 mg, al menos 2700 mg, al menos 2800 mg, al menos 2900 mg o al menos 3000 mg de ribósido de nicotinamida. En algunas realizaciones, la dosis comprende al menos 5 mg, al menos 10, al menos 20 mg, al menos 30 mg, al menos 40 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 80 mg, al menos 100 mg, al menos 120 mg, al menos 140 mg, al menos 160 mg, al menos 180 mg, al menos 200 mg, al menos 220 mg, al menos 240 mg, al menos 260 mg, al menos 280 mg, al menos 300 mg, al menos 320 mg, al menos 340 mg, al menos 360 mg, al menos 380 mg, al menos 400 mg, al menos 500 mg, al menos 600 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 900 mg, o al menos 1000 mg de pterostilbeno.

Las composiciones aquí descritas pueden administrarse durante cualquier período de tiempo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxicas para el paciente. El período de tiempo puede ser de al menos 1 día, al menos 10 días, al menos 20 días, al menos 30 días, al menos 60 días, al menos tres meses, al menos seis meses, al menos un año, al menos tres años, al menos cinco años o al menos diez años. La dosis puede administrarse cuando sea necesario, esporádicamente o a intervalos regulares. Por ejemplo, la dosis puede administrarse mensualmente, semanalmente, quincenalmente, trisemanalmente, una vez al día o dos veces al día.

En algunas realizaciones, al sujeto se le realiza una prueba para medir la progresión general o la progresión sintomática de una enfermedad de la neurona motora. En algunas realizaciones, al sujeto se le realiza una prueba de función motora y/o una prueba de función cognitiva y de conducta. La prueba de función motora puede ser la Escala Revisada de Clasificación Funcional para la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALSFRS-R). La prueba de cognición y conducta puede incluir el Test de Aprendizaje Verbal Complutense (TAVEC), el Test de Modalidades Símbolo-Dígito (SDMT), el Test de Fluidez Verbal, la Prueba de Dígitos (Escala de Memoria de Wechsler III), el Test de Atención D2, la Escala de Memoria de Wechsler III para Letras y Números, el Test de la Torre de Londres, el Test de Stroop, la Escala de Conducta del Sistema Frontal (FrSBe) y/o el Test Breve (conducta subjetiva). En algunas realizaciones, a los sujetos se les realizan pruebas tanto de función motora como de función cognitiva. Es posible que se le realicen al sujeto pruebas de función motora o de función cognitiva una o varias veces.

En algunas realizaciones, el método comprende además medir una característica (por ejemplo, una característica asociada con la inflamación) en el sujeto. En algunas realizaciones, la característica se mide mediante un análisis de sangre. Algunos ejemplos de características que pueden evaluarse son el nivel de una citocina, el nivel de proteína amiloide A, el nivel del marcador de activación de macrófagos neopterina, el nivel de creatina fosfoquinasa (CPK), el nivel de velocidad de sedimentación globular, el nivel de proteína C reactiva, la viscosidad plasmática y/o el recuento de glóbulos blancos. En algunas realizaciones, la citocina es una citocina proinflamatoria. En algunas realizaciones, la citocina es una citocina antiinflamatoria. Los ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan a, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-8 o TGF $\beta$ .

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un suplemento de ácidos grasos al sujeto. En algunas realizaciones, el suplemento de ácido graso comprende un aceite. El aceite puede procesarse (por ejemplo, refinarse, blanquearse o desodorizarse). En otras realizaciones, el aceite no está procesado o es un aceite virgen. En algunas realizaciones, el suplemento de ácidos grasos se deriva o fracciona de una fuente para producir ácidos grasos separados. En algunas realizaciones, el aceite es un aceite de coco. El aceite de coco, tal como se utiliza en este documento, puede incluir cualquier aceite producido por la nuez de la palma de coco. Los ácidos grasos que se encuentran en los suplementos divulgados en este documento pueden ser ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena media o ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos ejemplares que se pueden encontrar en el suplemento incluyen, pero no se limitan a, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y/o ácido linolénico. El suplemento de ácidos grasos divulgado en este documento puede comprender ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos monoinsaturados y/o ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, el suplemento de ácido graso puede comprender un aceite hidrogenado. Los suplementos de ácidos grasos pueden comprender uno o más ácidos grasos. Los niveles de dosificación reales y el régimen de administración del suplemento de ácido graso divulgado en este documento se pueden variar para obtener una cantidad de suplemento de ácido

graso que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente.

#### Ejemplificación

##### **Ejemplo 1:** Estudio piloto en pacientes con ELA

5 Los pacientes con ELA desarrollan una pérdida insidiosa de función o una debilidad gradual, lentamente progresiva e indolora en una o más regiones del cuerpo, sin cambios en la capacidad de sentir y sin que ninguna otra causa sea inmediatamente evidente. En la afectación de la neurona motora inferior (LMN, médula espinal), pueden aparecer fasciculaciones al inicio de la enfermedad, particularmente en la lengua y las extremidades. Los pacientes con afectación de la neurona motora superior (UMN, cerebro) generalmente son hiperreflexivos y rígidos. Los reflejos 10 pueden estar disminuidos debido a la afectación de la LMN. Los síntomas de UMN pueden incluir espasmos y movimientos de enderezamiento repentinos e incontrolados de las extremidades inferiores. A medida que la ELA progresiva, la atrofia muscular se hace más evidente y la espasticidad puede comprometer la marcha y la destreza manual. La inmovilidad, si se combina con espasticidad, puede conducir al desarrollo de contracturas articulares 15 dolorosas. Los calambres musculares son comunes. En algunos pacientes, la rigidez persistente o los calambres musculares pueden tensionar las articulaciones relacionadas y la espalda. Algunas personas experimentan una dificultad creciente para moverse, tragar (disfagia) y hablar o formar palabras (disartria). Los síntomas de afectación de la UMN incluyen músculos tensos y rígidos (espasticidad) y reflejos exagerados (hiperreflexia).

Los pacientes involucrados en el estudio sufren de ELA en diferentes niveles de progresión, pero la mayoría muestra fasciculaciones musculares variables/constantes, entumecimiento, espasmos, rigidez y/o contracturas articulares.

20 Se dividirán sesenta pacientes con ELA en cinco grupos. El grupo 1 será de control (sin tratamiento), al grupo 2 se le administrará placebo, al grupo 3 se le administrará un suplemento de ácidos grasos (aceite de coco), al grupo 4 se le administrará BASIS (nicotinamida ribósido y pterostilbeno) y al grupo 5 se le administrará Basis en combinación con un suplemento de ácidos grasos. A los pacientes se les pueden realizar pruebas de función motora y de función 25 cognitiva para determinar la progresión de los síntomas de la enfermedad en el sujeto. Durante el estudio, se pueden medir en el paciente parámetros relacionados con la inflamación, incluidas las citocinas (por ejemplo, TNFa, IFNg, IL-1, IL-6, IL-8 o TGFb), la proteína amiloide A (proteína de fase aguda de bajo peso molecular, que se produce principalmente en el hígado en respuesta a citocinas proinflamatorias), el marcador de activación de macrófagos neóptera, CPK, la velocidad de sedimentación globular, la proteína C reactiva, la viscosidad plasmática y el recuento de glóbulos blancos.

30 Después de dieciséis días de estudio, los pacientes que recibieron Basis experimentaron una disminución de la sintomatología relacionada con la degeneración de la función axónica. Además, los pacientes informaron que no podían dormir bien debido a la sintomatología relacionada con los músculos. Sin embargo, después de la administración de BASIS, los pacientes informan un aumento en la capacidad de dormir.

##### **Ejemplo 2:** Estudio de caso

35 A un sujeto diagnosticado con ELA que mostraba una pérdida progresiva de la función motora se le administró BASIS durante cuatro semanas. Antes de la administración, el sujeto no podía moverse y sus músculos no respondían a las pruebas de función motora. Después de cuatro semanas de tratamiento con BASIS, el sujeto mostró una mejoría en el funcionamiento motor.

40 **Ejemplo 3:** Eficacia del ribósido de nicotinamida y del pterostilbeno en la esclerosis lateral amiotrófica: un estudio piloto aleatorizado y controlado con placebo.

#### Objetivo de este ejemplo

Evaluar la eficacia y tolerabilidad de la combinación de ribósido de nicotinamida (una forma de vitamina B3) y pterostilbeno (un polifenol natural) (NR+Pter) en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

#### Métodos

45 Se realizó un estudio piloto prospectivo, doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, de un solo centro. Los pacientes con ELA fueron asignados aleatoriamente para recibir NR+Pter o placebo y se sometieron a una evaluación activa durante 4 meses.

#### Resultados

50 En total se aleatorizaron 27 pacientes. En comparación con placebo, los pacientes tratados con NR+Pter mostraron una mejoría significativa en la relación peso músculo esquelético/peso graso, la puntuación de la escala de calificación funcional ELA revisada (ALSFRS-R), la capacidad vital forzada (FVC) y la escala del Consejo de Investigación Médica (MRC) para la fuerza muscular.

#### Clasificación de la evidencia

Este estudio proporciona evidencia de Clase II de que para los pacientes con ELA la asociación de NR y Pter fue significativamente mejor que el placebo.

#### Glosario

ELA = esclerosis lateral amiotrófica; NR = ribósido de nicotinamida; Pter = pterostilbene; ALSFRS-R = Escala de calificación funcional de ELA revisada; CVF = capacidad vital forzada; MRC = Consejo de Investigación Médica; SARM1 = alfa estéril y motivo TIR restrictivo 1; ULN = límite superior de lo normal; BIM = índice de masa corporal; EMG = electromiograma; mtMP = potencial de membrana mitocondrial; mtPTP = complejo de poro de transición de permeabilidad mitocondrial; Nrf2 = factor relacionado con eritroide nuclear 2; GSH = glutatión.

#### Métodos: Descripción general del diseño del estudio y criterios de elegibilidad

Este estudio fue un ensayo piloto de grupos paralelos, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado y de un solo centro, de pacientes con ELA tratados con NR+Pter versus pacientes tratados con placebo. El objetivo principal fue evaluar la eficacia de la combinación de acuerdo con criterios clínicos estándar. Los participantes elegibles tenían 18 años de edad o más, eran mujeres (no lactantes, prueba de embarazo negativa y aceptaban usar un método anticonceptivo eficaz) y hombres, diagnosticados con ELA probable o definitiva (esporádica o familiar) de acuerdo con los criterios de El Escorial (Brooks 2000), y con un inicio de sintomatología durante más de 6 meses. Todos los pacientes también recibieron tratamiento con riluzol de acuerdo con la dosis estándar. Los criterios de exclusión fueron: traqueotomía, ventilación invasiva o ventilación con presión positiva no invasiva; gastrostomía; evidencia de trastorno psiquiátrico importante o demencia clínicamente evidente; diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa además de ELA; tener medicación actual aparte de riluzol; tener antecedentes recientes (dentro de los 6 meses anteriores) o evidencia actual de abuso de alcohol o drogas; tener enfermedad inestable concurrente que afecte a cualquier sistema, por ejemplo, carcinoma distinto del carcinoma de células basales, cualquier arritmia cardíaca, infarto de miocardio, signos clínicos o de ECG de isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca, síntomas de angina, síntomas actuales de enfermedad de la arteria coronaria; tener un QTc basal (Bazett) > 450 ms para hombres y > 470 ms para mujeres; pacientes con hepatitis B/C conocida o serología VIH positiva; tener insuficiencia renal definida como creatinina en sangre > 2 x LSN (límite superior de lo normal); tener insuficiencia hepática y/o enzimas hepáticas (ALAT o ASAT) > 3 x LSN; trastornos de la hemostasia o tratamiento actual con anticoagulantes orales; haber participado en cualquier otro estudio de investigación de fármacos o terapia con un medicamento no aprobado, dentro de los 3 meses anteriores; pacientes sin seguro médico.

#### Tamaño de la muestra, aleatorización y cegamiento

Los pacientes fueron asignados aleatoriamente. El número de pacientes evaluados por grupo fue: placebo (n=14 al inicio y a los 2 meses, 10 a los 4 meses), NR+Pter (n=13 al inicio y a los 2 meses, 10 a los 4 meses). El estudio fue doble ciego, incluyendo pacientes y personal sanitario, excepto los directores (J.E.R., J.M.E.).

#### Dieta

A todos los pacientes se les alimentó con una dieta de estilo mediterráneo (aproximadamente 2300 Kcal/día) (véase, por ejemplo, Davis 2015). Los pacientes del grupo placebo recibieron cápsulas que contenían azúcar moreno. La combinación de NR+Pter se administró en una dosis de aproximadamente 15 mg de NR y 2.5 mg de t-Pter/Kg x día. La dieta en el grupo placebo y en el grupo NR+Pter fue 55 % carbohidratos, 30 % grasas y 15 % proteínas. Los carbohidratos en la dieta correspondían a alimentos con carbohidratos de liberación lenta. Las vitaminas y oligoelementos en la dieta de ambos grupos se ajustaron siguiendo las recomendaciones dietéticas de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

#### Seguimiento, resultados y recopilación de datos

Se programaron visitas de seguimiento al inicio del estudio (tiempo 0), a los 2 y 4 meses de tratamiento. Se realizó un examen neurológico en los 3 puntos de tiempo y se registraron los siguientes elementos: análisis antropométrico, puntuación total de ALSFRS-R, FVC, fuerza de los músculos calificada de acuerdo con la escala de calificación MRC, electromiografía para evaluar la actividad eléctrica producida por los músculos esqueléticos. Durante toda la duración del estudio, los pacientes tuvieron comunicación permanente con el equipo médico y su evolución fue informada semanalmente.

#### Antropometría

Los pesos de la grasa y del músculo esquelético se calcularon siguiendo procedimientos antropométricos estándar (Wang 2000). Los datos de peso de la grasa y del músculo esquelético se refieren al cambio observado al comparar 2 o 4 meses con el valor inicial.

#### Puntuación ALSFRS-R

Este instrumento de calificación validado para monitorear la progresión de la discapacidad en pacientes con ELA (Kollewe 2008) se basa en 12 ítems, cada uno de los cuales se califica en una escala de 0 a 4 puntos. La tasa de incapacidad funcional total varía entre 0 (incapacidad máxima) y 48 (normal) puntos.

#### CVF

5 Este predictor clínicamente significativo de supervivencia y progresión de la enfermedad en pacientes con ELA (Czaplinski 2006) se midió utilizando un espirómetro táctil Datospir de Sibelmed (Barcelona, España), y se expresó como el % del valor estándar que corresponde a adultos humanos dependiendo de los parámetros de sexo, peso y edad) (García-Río 2013).

#### Escala MRC

10 La fuerza muscular se evaluó según una escala de calificación MRC modificada de 11 pasos ([www.medscape.com](http://www.medscape.com)) (5, potencia normal; 5-, equívoco, debilidad apenas detectable; 4+, debilidad definitiva pero leve; 4, capaz de mover la articulación contra una combinación de gravedad y algo de resistencia; 4-, capaz de una resistencia mínima; 3+, capaz de una resistencia transitoria pero colapsa abruptamente; 3, movimiento activo contra la gravedad; 3-, capaz de moverse contra la gravedad pero no en todo su rango; 2, capaz de moverse con la gravedad eliminada; 1, contracción traza; 0, sin contracción). Se obtuvo la puntuación MRC en cada paciente para 8 músculos diferentes [bíceps derecho (R) e izquierdo (L), tríceps, cuádriceps y tibial]. Para calcular el índice MRC total se le asignó a cada paso y a cada músculo un número progresivamente creciente de 0 (0 en la escala) a 10 (5 en la escala). El índice MRC total por paciente corresponde a la suma de los números asignados a los 8 músculos.

#### Electromiografía

20 Se utilizó un dispositivo de medición de electromiograma de superficie (EMG) (BTS FreeEMG 300, BTS SpA, Milán, Italia) para medir la actividad muscular en los mismos músculos indicados anteriormente para el índice MRC. Las señales EMG por músculo se analizaron mediante el método de raíz cuadrada media (RMS), que refleja la actividad fisiológica en la unidad motora durante la contracción. El RMS representa la raíz cuadrada de la potencia promedio de la señal EMG para un período de tiempo determinado (por ejemplo, Boe 2008).

#### Métodos estadísticos

Los datos se presentan como valores medios  $\pm$  DE para el número de experimentos diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student. \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  comparando 2 o 4 meses versus el valor inicial en todos los grupos; + $P < 0.05$  y ++ $P < 0.01$  comparando NR+Pter versus placebo.

#### Resultados

30 Treinta y dos pacientes con ELA que cumplían los criterios de inclusión fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 17 (placebo) y 15 (NR+Pter) pacientes. El estudio comenzó a finales de febrero de 2017. A lo largo del estudio algunos pacientes se retiraron por diferentes causas. Durante el período inicial entre 0 y 2 meses se eliminaron 3 pacientes del grupo placebo (1 caso por infección urinaria, 1 caso de neumonía y 1 muerte por parálisis respiratoria) y 2 pacientes del grupo NR+Pter (1 caso por gastroenteritis, 1 muerte por neumonía). Durante el período entre 2 y 4 meses, también se separaron 4 pacientes más del grupo placebo (2 eventos relacionados con traumatología, 1 gastroenteritis y 1 bronquitis) y 3 del grupo NR+Pter (1 evento relacionado con traumatología, 1 hepatitis y 1 depresión mental profunda). Como se muestra en la Tabla 1, donde se muestran las características demográficas y clínicas de los pacientes, la edad media en ambos grupos fue de 55-56 años. Los valores de peso corporal y BIM (índice de masa corporal) no fueron significativamente diferentes cuando se compararon pacientes de ambos grupos y tratamientos a lo largo del estudio. Sin embargo, el tratamiento con NR+Pter indujo un cambio significativo en el peso de la grasa (disminución) y del músculo esquelético (aumento) (Tabla 1). Estos cambios se asociaron con un aumento significativo en la puntuación ALSFRS-R y el rendimiento de FVC del grupo NR+Pter a los 4 meses (en comparación con el valor inicial) (Tabla 1). Estas mejoras también se asocian con datos de fuerza y actividad muscular. Como se muestra en la Tabla 2, el índice total de la escala MRC aumentó en el grupo tratado con NR+Pter comparando el valor inicial y los 4 meses, y comparando los valores de NR+Pter versus placebo; mientras que el mismo índice disminuyó en los pacientes tratados con placebo durante el mismo período de tiempo. Los cambios en los valores de EMG solo se encontraron significativos para 1 músculo (tríceps) a los 4 meses comparando NR+Pter versus placebo (Tabla 2).

Tabla 1. Características demográficas y características clínicas de pacientes con ELA aleatorizados al inicio del tratamiento (BL) y después de 2-4 meses (2M-4M) de tratamiento.

		Placebo	BASIS	BASIS+ aceite de coco
Edad (años)	BL	55.6 ± 10.5	56.7 ± 9.4	53.8 ± 7.0
Masculino/Femenino	BL 4M	8/6 6/4	9/4 8/2	5/2 5/2
Antecedentes familiares de ELA (No. de casos)		0	1	0
Inicio: Bulbar/Espinal	BL 4M	4/10 1/9	3/10 1/9	5/2 5/2
Muertes		1 (ELA)	1 (neumonía)	1 (accidente)
Peso corporal (kg)	BL 2M 4M	70.2 ± 8.4 68.8 ± 7.9 64.5 ± 8.4	69.4 ± 7.9 68.4 ± 7.7 69.3 ± 9.3	68.6 ± 9.9 68.9 ± 8.6 68.6 ± 8.1
BIM (kg/m <sup>2</sup> )	BL 2M 4M	24.6 ± 2.1 23.8 ± 1.9 22.3 ± 2.4	24.7 ± 3.7 23.5 ± 2.3 24.0 ± 2.0	25.0 ± 4.8 25.1 ± 3.7 24.8 ± 2.6
Peso de la grasa (kg)	2M-BL 4M-BL	0.92 ± 0.57 1.15 ± 0.41	-1.18 ± 0.35 <sup>++</sup> -1.61 ± 0.44 <sup>++</sup>	-0.73 ± 0.44 <sup>++</sup> -1.17 ± 0.26 <sup>++</sup>
Peso del músculo esquelético (kg)	2M-BL 4M-BL	-0.58 ± 0.31 -1.14 ± 0.47	0.41 ± 0.27 <sup>++</sup> 0.41 ± 0.16 <sup>++</sup>	0.72 ± 0.40 <sup>++</sup> 0.95 ± 0.33 <sup>++</sup>
Puntuación ALSFRS-R (0-48)	BL 2M 4M	41.5 ± 5.2 38.5 ± 6.0 35.2 ± 3.1	38.8 ± 4.9 42.4 ± 4.7 41.3 ± 2.8 <sup>+</sup>	40.7 ± 5.4 41.5 ± 5.0 40.8 ± 4.2
FVC (%)	BL 2M 4M	92.3 ± 12.6 88.5 ± 9.7 77.8 ± 10.0	95.3 ± 7.4 101.4 ± 4.5 (n=11) 97.2 ± 7.4 <sup>++</sup>	89.1 ± 10.5 105.0 ± 5.5 <sup>***</sup> 101.4 ± 4.6 <sup>++</sup>
Duración de los síntomas (meses hasta el inicio)		24.0 ± 9.6	20.6 ± 12.5 (n=11; 1 caso=64)	16.4 ± 7.0 (n=6; 1 caso=72)

Tabla 2. Cambios inducidos por el tratamiento en la fuerza muscular en pacientes con ELA

			Placebo			BASIS			BASIS + aceite de coco	
Índice de escala MRC total	BL	46 ± 3		41 ± 3		44 ± 4				
	2M	36 ± 4**		50 ± 3****		55 ± 5* **				
	4M	34 ± 7**		57 ± 15***		58 ± 10** **				
EMG	BL	2M	4M	BL	2M	4M	BL	2M	4M	
Bíceps	D	233 ± 87	201 ± 56	185 ± 46	285 ± 103	292 ± 87	273 ± 77	190 ± 54	202 ± 79	174 ± 76
	I	245 ± 91	246 ± 101	190 ± 38	264 ± 86	261 ± 97	276 ± 84	211 ± 46	239 ± 114	174 ± 55
Tríceps	D	187 ± 53	134 ± 71	126 ± 51	170 ± 66	194 ± 74	212 ± 55*	165 ± 58	183 ± 65	192 ± 59
	I	211 ± 77	177 ± 65	155 ± 44	234 ± 59	250 ± 71	327 ± 74 *	190 ± 45	207 ± 58	201 ± 74
Cuádriceps	D	151 ± 46	136 ± 44	141 ± 35	133 ± 36	147 ± 75	152 ± 50	179 ± 64	190 ± 78	190 ± 53
	I	177 ± 65	146 ± 68	133 ± 47	138 ± 55	148 ± 69	148 ± 39	190 ± 88	184 ± 77	176 ± 46
Tibial	D	167 ± 49	135 ± 53	125 ± 42	101 ± 57	97 ± 50	164 ± 44	248 ± 102	240 ± 68*	274 ± 89*
	I	139 ± 50	116 ± 55	94 ± 33	122 ± 57	123 ± 68	182 ± 56	208 ± 90	240 ± 71*	197 ± 71*

Los datos se presentan como valores medios ± DE para el número de experimentos diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student. \*P< 0.05 y \*\*P< 0.01 comparando 2M versus BL en todos los grupos; +P< 0.05 y ++P< 0.01 comparando BASIS o aceite de coco BASIS versus Placebo.

#### Conclusiones

1. Los pacientes a los que se les administró BASIS, en comparación con el tratamiento placebo, experimentaron una disminución significativa del peso de la grasa y un aumento del peso del músculo esquelético.

10 2. Los pacientes a los que se les administró BASIS, en comparación con el tratamiento placebo, experimentaron un aumento en la puntuación ALSFRS-R y en la capacidad vital.

3. Los pacientes a los que se les administró BASIS, en comparación con el tratamiento con placebo, experimentaron aumentos significativos en el índice de la escala MRC. Al comparar la EMG de 4M vs BL, los pacientes a los que se les administró BASIS mantuvieron o aumentaron la actividad muscular, mientras que los pacientes a los que se les administró controles placebo mostraron una disminución de la actividad muscular.

15

**Ejemplo 4:** Evaluación de la coordinación motora y el equilibrio en modelos de roedores con esclerosis lateral amiotrófica

#### Métodos: Ratones

FUS R521C de tipo silvestre y transgénico. Nombre de la cepa: B6;SJL-Tg(Prnp-FUS\*R521C)3313Ejh/J.

20 Antecedentes genéticos: Transgénico inyectado en ovocitos B6SJL. Se mantiene en C57BL/6, por lo tanto las generaciones posteriores tienen un mayor porcentaje de C57BL/6. El laboratorio de Jackson: Stock# 026406.

A una edad temprana, este ratón transgénico desarrolla un deterioro motor grave y otros fenotipos relacionados con la ELA. En particular, se produce una pérdida neuronal importante en la médula espinal, denervación de las uniones neuromusculares y atrofia muscular. El desarrollo del fenotipo es rápido (se detecta a las pocas semanas del nacimiento) y los ratones declinan rápidamente. La mayoría de los ratones de la generación N1F1

25 original alcanzaron la etapa final en tres meses (Qiu et al. 2014). Al mes de edad, los ratones expresan FUS mutante en niveles aproximadamente iguales a los niveles de FUS endógeno en el cerebro y la médula espinal.

La mayoría de la proteína transgénica FUS-R521C en estos ratones es nuclear. Ocasionalmente se detecta proteína citoplasmática; sin embargo, menos del 10 % de las neuronas motoras espinales contienen inclusiones

30 FUS citoplasmáticas. La proteína FUS endógena, pero no la proteína transgénica, aparece en las dendritas

como un patrón punteado. De manera similar al FUS endógeno, la proteína FUS-R521C se detecta en astrocitos y oligodendrocitos, pero no en la microglía.

5 Los ratones desarrollan una pérdida neuronal prominente en la médula espinal. Al nacer, el número de neuronas motoras espinales es normal. Sin embargo, hacia el día 16, el número de neuronas ChAT-positivas en el asta anterior de la médula espinal se reduce en un 20 por ciento. La degeneración continúa y en la etapa final solo queda aproximadamente la mitad de las neuronas. Las neuronas motoras supervivientes tienen una complejidad dendrítica reducida, defectos sinápticos y daños en el ADN. No hay pérdida detectable de neuronas corticales; sin embargo, las neuronas de la corteza sensoriomotora tienen una complejidad dendrítica reducida y una densidad sináptica reducida.

10 A pesar de la modesta expresión del transgén, los ratones FUS-R521C presentan una variedad de deficiencias motoras desde una edad temprana, incluyendo paraplejia espástica y agarre anormal de las extremidades traseras cuando se les levanta por la cola. También presentan anomalías en la marcha, incluida una distancia reducida entre las patas traseras al caminar. El rendimiento en el Rotarod es pobre.

15 La mayoría de los ratones de la generación N1F1 original alcanzaron la etapa final el día 100 postnatal. Los ratones de generaciones posteriores (por ejemplo, N2F2, N2F3), que tienen una mayor contribución de C57BL/6, viven más tiempo; alrededor del 40 por ciento alcanzó la etapa final el día 200 posnatal. Tanto los ratones machos como las hembras muestran fenotipos de enfermedad similares. Los machos hemicigotos pueden ser estériles o al menos tener una capacidad de reproducción muy reducida (Eric Huang, comunicación personal, marzo de 2016).

20 Caracterización del fenotipo específico

Pérdida de neuronas corticales. No se detecta pérdida de neuronas corticales; sin embargo, las neuronas de la corteza sensoriomotora muestran una complejidad dendrítica reducida y una densidad sináptica reducida.

25 Pérdida de neuronas motoras inferiores. No hay diferencia detectable en las neuronas motoras espinales en P0. En P16, aproximadamente el 20 % de pérdida de neuronas ChAT-positivas en el asta anterior de la médula espinal cervical. Entre P30 y P60, aproximadamente el 50 % de las neuronas del asta anterior se pierden. Las neuronas motoras restantes muestran una complejidad dendrítica y una densidad sináptica reducidas.

Gliosis

Aumento prominente de microgliosis y astrogliosis en el asta anterior de la médula espinal en la etapa final.

Atrofia muscular

30 La mayoría de los ratones presentan una atrofia grave del músculo esquelético en las extremidades traseras en la etapa final.

Deterioro motor

Deterioro motor posnatal temprano, que incluye agarre anormal de las extremidades traseras al ser levantado por la cola, anomalías en la marcha y deterioro del rendimiento en Rotarod.

35 Peso corporal

El crecimiento postnatal temprano se retrasa y los ratones experimentan una pérdida progresiva de peso corporal.

Muerte prematura

40 La mayoría de los ratones de la generación N1F1 alcanzaron la etapa final y fueron sacrificados el día 100 postnatal. Los ratones de las generaciones posteriores viven más tiempo: aproximadamente el 40 % alcanza la etapa final el día 200 después del nacimiento.

Tratamiento

Se administrarán por vía oral ribósido de nicotinamida y pterostilbene: 185 mg de nicotinamida ribósido y 30 mg de pterostilbene/Kg x día

45 Puntuación neurológica

50 Se realizó una puntuación neurológica en ratones semanalmente a partir del día postnatal 20 (P20) mediante inspección visual. La puntuación neurológica se basará en la escala de Weydt et al. (2003). Las puntuaciones del "0" al "5" se definen de la siguiente manera: "0" indica un ratón sano sin signos clásicos de ELA; "1" indica la presencia de temblores en las patas traseras que ocurren en la etapa temprana de la enfermedad; "2" indica que los ratones tienen dificultad para separar sus patas traseras cuando están suspendidos por sus colas, lo

que es indicativo de debilidad muscular; "3" se da cuando los ratones muestran dificultad para caminar, ya sea tropezando o tambaleándose; "4" se da cuando los ratones no pueden caminar en las cuatro patas y arrastran sus patas traseras; "5" se da cuando los ratones no pueden enderezarse después de 30 segundos. Cuando los animales alcancen una puntuación de "4", se facilitará el acceso al alimento y al agua colocando pellets de comida en el suelo de la jaula a todos los ratones transgénicos. Al alcanzar una puntuación de "5", los animales serán sacrificados por razones éticas. El inicio se define como el momento más temprano en que los ratones muestran síntomas (puntuación <4) durante  $\geq 2$  semanas consecutivas.

#### 5 Rotarod, alambre colgante y plano inclinado

10 A partir de P20 se analizará la función motora utilizando un aparato rotarod (Touchscreen Rota Rod, Panlab).

15 A cada animal se le darán tres pruebas y se le determinará el período máximo (segundos) que podría permanecer sobre un eje giratorio (3.5 cm de diámetro; velocidad de rotación: Se medirá 15 rpm) sin caída. La prueba se detendrá después de un límite arbitrario de 180 segundos. Durante las 2 primeras semanas se realizará un periodo de adaptación de tres pruebas antes del inicio de las grabaciones.

15 La prueba del cable colgante comenzará en P20 y se realizará semanalmente, 24 horas antes de la prueba del rotarod. Los animales se colocarán en la tapa de alambre de una jaula de alojamiento convencional. La tapa se girará suavemente hacia abajo, a 50 cm por encima de una superficie blanda para evitar lesiones. La latencia para caer será cronometrada. A cada ratón se le darán hasta tres intentos durante un máximo de 180 segundos y se registrará el período más largo.

20 El aparato de plano inclinado consiste en una tabla de madera con bisagras que se colocará en un ángulo de 0°. Los animales en P20 se colocarán con la cabeza hacia arriba en el tablero y este se elevará a velocidad constante hasta que el ratón se salga del tablero. Se registrará el ángulo máximo alcanzado sin deslizamiento.

#### Elevación de la cola

25 La elevación de la cola se determinará semanalmente a partir de los 20 años mediante inspección visual utilizando la puntuación de la cola durante la evaluación de la puntuación neurológica. La puntuación de la cola se basará en la escala de cola SHIRPA, procedimiento desarrollado por Rogers et al. en MRC, Reino Unido (Niimi y Takahashi 2009; Rogers et al. 1997). Las puntuaciones "0" a "3" se definen de la siguiente manera: "0" indica posición vertical de la cola (elevación máxima); "1" indica cola extendida horizontalmente; "2" indica arrastrar la cola durante más de 20 segundos; "3" se dará cuando la cola muestre contractura proximal y laxitud distal (los ratones con esta puntuación estarán en la fase terminal de la enfermedad).

#### 30 Evaluación automática de la actividad del sistema mediante sensor de movimiento infrarrojo

35 El comportamiento motor se evaluará en campo abierto mediante el registro automático de la actividad motora en función del tiempo de movimiento, sin ninguna intervención del investigador, utilizando un monitor con sensor de movimiento infrarrojo (Coulbourn Instruments, EE. UU.) como se describió anteriormente (Andrade et al. 2010). La sala experimental estará iluminada difusamente y se mantendrá a temperatura y humedad

40 constantes. Los ratones serán colocados individualmente en jaulas de polietileno (37×17×30 cm), que tienen un sensor de movimiento infrarrojo en la parte superior de la pared, y el registro se realizará en bloques de tiempo de observación de 2 minutos durante 30 minutos. A partir de los datos resultantes, se calcularán los siguientes parámetros de medidas dependientes: tiempo sin movimiento, que se define como la media del tiempo (segundos) durante el cual el animal no se movió o se movió durante un tiempo menor a 0.01 segundo

45 durante el tiempo de observación; eventos sin movimiento son la media del número de eventos registrados en cada tiempo sin movimiento durante el tiempo de observación; tiempo de pequeño movimiento, que se define como la media del tiempo (segundos), durante el cual el animal se movió entre un intervalo de tiempo superior a 0.01 segundo pero inferior a 0.1 segundo, durante el tiempo de observación; eventos de pequeño movimiento son la media del número de eventos registrados en cada tiempo de pequeño movimiento, durante el tiempo de observación; tiempo de gran movimiento, que se define como la media del tiempo (segundos) durante el cual el animal se movió en un intervalo de tiempo superior a 1.0 segundo; eventos de gran movimiento son la media del número de eventos registrados en cada tiempo de gran movimiento, durante el tiempo de observación. Los datos se transferirán a un ordenador y serán analizados por un software específico. Para la evaluación se utilizarán únicamente los números de eventos sin movimiento, con pequeño movimiento y con gran movimiento.

50 Los gráficos se trazarán por períodos correspondientes a: primer período (P40-60), segundo período (P70-80), tercero período (P90-100) y cuarto período o etapa final de la enfermedad (P110-120).

55 Latencia, velocidad y amplitud en la conducción de la entrada nerviosa en el nervio ciático (Alves et al. 2011). Las mediciones electrofisiológicas se registrarán en P20, P40, P60, P80, P100 y P120 en ratones anestesiados con clorhidrato de ketamina (Ketalar) y diazepam (Valium) (1 ml/kg de una solución que contiene 11.25 mg de ketalar y 0.375 mg de valium; IP).

La temperatura corporal normal se conservará utilizando un calentador. Se expondrá el nervio ciático y los animales serán sometidos a una evaluación electrofisiológica consistente en la medición del potencial de acción motora compuesta (CMAP). Esta evaluación tiene como objetivo comprobar la integridad electrofisiológica del

nervio y medir los parámetros utilizados para calcular la media entre las amplitudes, la media entre las latencias y la media entre las velocidades de conducción de cada potencial. Para reducir posibles interferencias, se instalarán 2 electrodos de tierra después de la exposición quirúrgica del nervio, uno de los cuales es un electrodo de aguja recta monopolar (26 G) colocado dentro del músculo adyacente al nervio; el otro electrodo de tierra estará fabricado con alambre de acero inoxidable 316 L y su extremidad será de configuración helicoidal para rodear el nervio y aumentar el área de contacto. Los electrodos bipolares para estimulación CMAP serán fabricados a partir de alambre de acero inoxidable 316 L de 0.5 mm de diámetro, con separación ánodo-cátodo de 1 mm. Las grabaciones se realizarán en un sistema de electromiografía de 2 canales (Keypoint portátil; Medtronic, Skovlunde, Dinamarca), con el filtro de alta frecuencia establecido a 5 kHz y el filtro de baja frecuencia establecido a 2 Hz. La estimulación eléctrica produce artefactos, para reducirlos se utilizarán pulsos eléctricos monofásicos rectangulares con un ancho de pulso de 0.04 ms. Para las mediciones de CMAP el electrodo de estimulación se colocará sobre el nervio a una distancia de 1 cm del electrodo de registro colocado sobre el músculo gastrocnemio mediante punción percutánea en el tercio distal de la pata, ipsilateral al procedimiento quirúrgico, con una aguja coaxial. Una desviación negativa inicial y una forma de onda bifásica indican registro en el punto motor. La latencia de los potenciales evocados se medirá en milisegundos. A partir de dicho potencial registrado, se calculará la velocidad de conducción utilizando la distancia de 1 cm dividida por la latencia.

#### Patología

La metodología para el aislamiento, preparación y análisis del SNC seguirá los procedimientos descritos en detalle por Jordania WH, Young JK, Hyten MJ, Hall DG. Preparación y análisis del sistema nervioso central. Toxicol Pathol. Enero de 2011;39(1):58-65, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

**Ejemplo 5:** Evaluación del efecto del ribósido de nicotinamida y el pterostilbeno sobre la coordinación motora y el equilibrio en modelos de roedores con esclerosis lateral amiotrófica

Objetivo de este ejemplo:

Evaluar el efecto de la asociación de ribósido de nicotinamida y pterostilbeno en la mejora de las funciones motoras en modelos de ratón con ELA, particularmente en comparación con el efecto del ribósido de nicotinamida y el resveratrol.

#### Métodos

##### Ratones

1. B6.Cg-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J (<https://www.jax.org/strain/004435>)

Los ratones hemicigotos para este transgén SOD1-G93A (también llamado G93A-SOD1) eran viables y fértiles, con expresión transgénica de una forma mutante G93A de SOD1 humana. Se informó que esta línea fundadora (a menudo denominada G1H) tenía un alto número de copias de transgenes. Los hemicigotos exhibieron un fenotipo similar a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en humanos; quedando paralizados en una o más extremidades debido a la pérdida de neuronas motoras de la médula espinal. La degeneración de la neurona motora se ha asociado con la función y/o degeneración de los astrocitos, el principal tipo de célula glial del sistema nervioso. Los ratones transgénicos tenían una esperanza de vida más corta: El 50 % sobrevive a los 157.1 +/- 9.3 días (en contraste con el fondo mixto B6SJL donde se observó una supervivencia del 50 % a los 128.9 +/- 9.1 días). Las hembras hemicigotas eran malas reproductoras y rara vez producían más de una camada antes de la aparición de la enfermedad. A diferencia de la microglía inducida por LPS y los macrófagos M1/M2 activados, la microglía de la médula espinal activada por la progresión de la enfermedad no reguló positivamente los genes que muestran un sesgo hacia un fenotipo M1 (neurotóxico) o un fenotipo M2 (protector). El patrón de expresión genética en la microglía activada por SOD1G93A representó una firma única y específica de ELA. Estos ratones transgénicos SOD1-G93A (también llamados G93A-SOD1) fueron útiles en el estudio de trastornos neuromusculares, incluida la esclerosis lateral amiotrófica.

El transgén SOD1-G93A fue diseñado con un gen SOD1 humano mutante (que alberga una única sustitución de aminoácido de glicina por alanina en el codón 93) impulsado por su promotor SOD1 humano endógeno. Este transgén se inyectó en óvulos fertilizados de ratón B6SJLF1 y se obtuvieron animales fundadores. Se enviaron ratones transgénicos con un fondo genético B6SJL mixto al Laboratorio Jackson (con número de stock 002726). Al llegar, algunos ratones fueron retrocruzados con C57BL/6J durante al menos 10 generaciones para generar esta cepa congénica (Stock No. 004435).

2. Control/No portador

Los ratones B6SJLF1/J (<https://www.jax.org/strain/100012>) se produjeron mediante un cruce entre ratones hembra C57BL/6J (B6) con ratones machos SJL/J (SJL). Los ratones B6SJLF1/J eran heterocigotos para los alelos B6 y SJL en todos los loci de su genoma. Esta cepa se utilizó a menudo en la producción de ratones transgénicos.

### Neuropatología

Aunque el transgén SOD1 G93A se expresó ampliamente, la patología en este modelo se limitó en gran medida a la médula espinal (especialmente la médula lumbar), el tronco encefálico, los tractos espinales descendentes y las uniones neuromusculares. Se desarrollaron diversas características patológicas en la médula espinal

5 antes de la aparición de los síntomas clínicos, incluida la vacuolización mitocondrial (Dal Canto y Gurney, *Brain Res.* 1995;676(1):25-40), fragmentación de Golgi (Mourelatos et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(11):5472-7), inclusiones positivas de neurofilamentos (Tu y otros, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(7):3155-60), inclusiones similares a cuerpos de Lewy (Dal Canto y Gurney, *Brain Res.* 1995;676(1):25-40) y agregados citoplasmáticos de SOD1 (Johnston y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(23):12571-6). Las uniones 10 neuromusculares se degeneraron alrededor de los 47 días de edad; las neuronas motoras rápidamente fatigables fueron las primeras en ser afectadas (Frey y col., *J Cell Biol.* 2000;149(7):1443-54; Pun et al., *Nat Neurosci.* 2006;9(3):408-19). Luego, las neuronas motoras espinales murieron, con una reducción de aproximadamente el 50 por ciento en los segmentos cervical y lumbar en la etapa final (Chiu et al., *Mol Cell Neurosci.* 1995;6(4):349-62).

15 La neuropatología no se limitó a las neuronas motoras inferiores. En las neuronas motoras superiores, los signos de degeneración incluían neuritas hinchadas, agregados de plata Gallyas positivos, vacuolas y esferoides neuríticos. Estos cambios ocurrieron alrededor de los cinco meses de edad, después de que la degeneración en la médula espinal estaba en marcha, y generalmente no progresaron hasta una pérdida neuronal total (Leichsenring y col., *Brain Res.* 2006;1096(1):180-95). Se ha observado degeneración de los 20 núcleos craneales, como los nervios trigémino, facial e hipogloso. Angenstein y col., *Neuroreport.* 2004;15(14):2271-4; Zang y col., *Eur J Neurosci.* 2004;20(7):1745-51) y hubo una regresión dependiente de la edad de los tractos corticoespinales descendentes, bulboespinales y rubroespinales (Zang y Cheema, *Neurosci Lett.* 2002;332(2):99-102).

25 La gliosis, incluida la proliferación de microglia reactiva y astrocitos, se desarrolló en paralelo con la degeneración de las neuronas motoras en la médula espinal. La inmunorreactividad de GFAP y MAC1 indicó un aumento de la glía reactiva a los 117 días de edad (Hall et al., *Glia.* 1998;23(3):249-56).

### Uso

Estos ratones han sido estudiados ampliamente durante muchos años, y esta investigación sentó las bases 30 para directrices actualizadas sobre la investigación preclínica en ELA (Ludolph et al., *Esclerótica lateral amiotrófica.* 2010; 11 (1-2):38-45). Las recomendaciones para el diseño experimental incluyeron el uso de suficientes ratones para potenciar los experimentos, el uso de cohortes experimentales equilibradas en cuanto a género y compañeros de camada y la presentación de esta información en todos los manuscritos. Dada la importancia del número de copias, se debe utilizar la genotipificación cuantitativa para garantizar que todos los 35 animales experimentales tengan el número de copias esperado (Alexander y col., *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;130(1-2):7-15).

### Detalles de la modificación

Estos ratones transgénicos expresaron múltiples copias de SOD1 humana que portan la mutación sin sentido G93A integrada aleatoriamente en el cromosoma 12 de los ratones.

### Resumen del fenotipo

40 Pérdida de neuronas corticales: se ha demostrado evidencia de degeneración (por ejemplo, neuritas hinchadas, agregados Gallyas-positivos, vacuolas y esferoides neuríticos) en la corteza motora. La pérdida total de la neurona motora superior fue rara.

Pérdida de neuronas motoras inferiores: se observó una pérdida de hasta el 50 % de neuronas motoras en los segmentos cervical y lumbar de la médula espinal en la etapa final.

45 Inclusiones citoplasmáticas: inclusión acumulada en las neuronas motoras espinales desde los 82 días de edad. Las inclusiones tomaron la forma de esferoides o inclusiones similares a cuerpos de Lewy y comúnmente incluían una variedad de proteínas de filamentos intermedios neuronales. Las inclusiones positivas de TDP-43 fueron raras.

Gliosis: la gliosis se desarrolló en paralelo con la degeneración de las neuronas motoras en la médula espinal.

50 Anormalidades de la unión neuromuscular: Las uniones NM se degeneraron alrededor de los 47 días de edad. Las neuronas motoras que se fatigan rápidamente fueron las primeras en ser afectadas.

Atrofia muscular: la resonancia magnética longitudinal ha mostrado un volumen muscular reducido a partir de las 8 semanas de edad. La atrofia fue progresiva. Se vieron afectados los músculos esqueléticos, incluidas las extremidades y el diafragma.

Deterioro motor: los signos de deterioro motor comenzaron a los 3 meses con un temblor que llevó a la parálisis.

Peso corporal: el peso corporal anormal fue uno de los primeros signos de enfermedad; se observó una desaceleración del crecimiento y una estabilización del peso.

5 Muerte prematura: los ratones alcanzaron la etapa final a los 5 meses de edad. Las hembras generalmente sobrevivieron más tiempo (entre 4 y 7 días más).

#### Tratamiento

Se administraron por vía oral ribósido de nicotinamida, pterostilbeno y resveratrol: A los ratones se les administraron 185 mg de ribósido de nicotinamida y/o 30 mg de pterostilbeno o resveratrol por kg por día.

#### Resultados

##### 10 Tiempo de supervivencia

La curva de Kaplan-Meier que compara el tiempo de supervivencia entre grupos de ratones se muestra en la FIG. 1. El número de ratones sobrevivientes de diferentes grupos de tratamiento en cada semana se muestra en la FIG. 2.

#### Puntuación neurológica

15 Esta puntuación se basó en la escala de Weydt y otros. (Neuroinforme 14: 1051-1054, 2003). Las puntuaciones de "0" a "5" se definieron de la siguiente manera: "0" indicó un ratón sano sin signos clásicos de ELA; "1" indicó la presencia de temblores en las patas traseras que ocurrieron en la etapa temprana de la enfermedad; "2" indicó que los ratones tenían dificultad para separar sus patas traseras cuando estaban suspendidos por sus colas, lo que era indicativo de debilidad muscular; "3" se dio cuando los ratones mostraron dificultad para caminar, ya sea tropezando o tambaleándose; "4" se dio cuando los ratones no podían caminar en las cuatro 20 patas y arrastraban sus patas traseras; "5" se dio cuando los ratones no pudieron enderezarse después de 30 segundos. Cuando los animales alcanzaron una puntuación de "4", se facilitó el acceso al alimento y al agua colocando bolitas de comida en el suelo de la jaula a todos los ratones transgénicos. Al alcanzar una puntuación de "5", los animales fueron sacrificados por razones éticas. El inicio se definió como el momento más temprano 25 en que los ratones mostraron síntomas (puntuación <4). Los cambios a lo largo del tiempo en los diferentes grupos se monitorearon semanalmente desde la semana 8 (P50) hasta la semana 20 (P140). El número de animales analizados por semana fue idéntico al que se muestra en la FIG. 1 para cada grupo. Las puntuaciones neurológicas de los diferentes grupos se muestran en la FIG. 3.

#### Puntuación de elevación de la cola

30 Esta puntuación se basó en la escala de cola SHIRPA, procedimiento desarrollado por Rogers y otros. (Madre. Genoma 8: 711-713, 1997) en el MRC, Reino Unido. Las puntuaciones "0" a "3" se definieron de la siguiente manera: "0" indicaba la posición vertical de la cola (elevación máxima); "1" indicaba la cola extendida horizontalmente; "2" indicaba arrastrar la cola durante más de 20 segundos; "3" se daba cuando la cola mostraba contractura proximal y laxitud distal (los ratones con esta puntuación estaban en la fase terminal de 35 la enfermedad). Los cambios a lo largo del tiempo en los diferentes grupos se monitorearon semanalmente. El número de animales analizados por semana fue idéntico al que se muestra en la FIG. 1 para cada grupo. Las puntuaciones de elevación de la cola de los diferentes grupos se muestran en la FIG. 4.

#### Prueba de varilla giratoria

40 Las funciones de la prueba incluían evaluar el equilibrio, la fuerza de agarre y la coordinación motora de los sujetos; especialmente para probar el efecto de fármacos experimentales. Para esta prueba (Rota Rod, Harvard Apparatus, Holliston, MA), a cada animal se le dieron tres pruebas y el período máximo (segundos) que podía permanecer en un eje giratorio (3.5 cm de diámetro; velocidad de rotación: Se midió 15 rpm) sin caída. A cada ratón se le dieron hasta tres intentos durante un límite arbitrario de 1200 segundos y se registró el período más largo. Los cambios a lo largo del tiempo en los diferentes grupos se monitorearon semanalmente. El número 45 de animales analizados por semana fue idéntico al que se muestra en la FIG. 1 para cada grupo. Los resultados de la prueba rotarod para diferentes grupos se muestran en la FIG. 5.

#### Prueba de alambre colgante

50 Se evaluaron la función motora y el déficit en modelos de roedores con trastornos del sistema nervioso central. Para esta prueba, los animales fueron colocados en la tapa de alambre de una jaula de alojamiento convencional. La tapa fue girada suavemente hacia abajo, a 50 cm sobre una superficie blanda para evitar lesiones. La latencia para caer fue cronometrada. A cada ratón se le dieron hasta tres intentos durante un máximo de 180 segundos y se registró el período más largo. Los cambios a lo largo del tiempo en los diferentes grupos se monitorearon semanalmente. El número de animales analizados por semana fue idéntico al que se

muestra en la FIG. 1 para cada grupo. Los resultados de la prueba del alambre colgante para diferentes grupos se muestran en la FIG. 6.

#### Prueba del plano inclinado

Para esta prueba de calificación locomotora, se utilizó una banda rodante plana (cinta de correr, aparato Harvard) y se ajustó a un ángulo de 5°. Los animales se colocaron con la cabeza hacia arriba sobre el tablero a una velocidad constante (15 cm/s). El sistema incorporaba una rejilla de descarga en la parte posterior de la cinta de correr para aplicar una descarga eléctrica leve (0.2 mA durante un máximo de 3 segundos) si el ratón se caía de la cinta. A cada ratón se le dieron dos pruebas y se registraron la distancia máxima recorrida y el número de estímulos eléctricos recibidos durante la prueba (sin exceder los 3 segundos). La prueba se detuvo 5 después de un límite arbitrario de 600 segundos o si el animal recibió un estímulo eléctrico >3 segundos. Los cambios a lo largo del tiempo en el rendimiento de los diferentes grupos se monitorearon semanalmente. El rendimiento se expresó como una relación entre la distancia recorrida (m) y el número de estímulos eléctricos recibidos (sin exceder los 3 segundos). Los cambios a lo largo del tiempo en los diferentes grupos se monitorearon semanalmente. El número de animales analizados por semana fue idéntico al que se muestra en 10 la FIG. 1 para cada grupo. Los resultados de la prueba del plano inclinado para diferentes grupos se muestran en la FIG. 7.

15

#### Actividad motora por evaluación automática

Los cambios a lo largo del tiempo en la actividad espontánea (locomoción) se midieron mediante un monitor de actividad con sensor de movimiento infrarrojo (IR Actimeter, Harvard Apparatus) en los diferentes grupos indicados en la FIG. 1. El actímetro IR estaba compuesto por un marco cuadrado bidimensional (ejes X e Y), 20 un soporte de marco y una unidad de control. Cada cuadro estaba compuesto por 16 × 16 haces infrarrojos para una detección óptima del sujeto. La actividad se expresó como el tiempo (en segundos) moviéndose lento (MS, tiempo durante el cual la velocidad del sujeto está entre los umbrales de reposo y rápido, 2-5 cm/s) o moviéndose rápido (MF, tiempo durante el cual la velocidad del sujeto está por encima del umbral rápido, >5 cm/s). Se consideró periodo de reposo el periodo de tiempo durante el cual la velocidad del sujeto estuvo 25 por debajo del umbral de reposo (<2 cm/s). El registro se realizó en bloques de 2 min durante el periodo de tiempo de observación (30 min). Los cambios a lo largo del tiempo en los diferentes grupos se monitorearon semanalmente. Los datos se agruparon en 4 períodos diferentes (semanas 8-11, 12-15, 16-18, 19-20) y se muestran en la FIG. 8. Los valores medios se calcularon utilizando el mayor número de movimientos lento y 30 rápidos realizados por cada ratón durante el periodo indicado. El número de animales analizados por semana fue idéntico al que se muestra en la FIG. 1 para cada grupo.

#### Mediciones electrofisiológicas

Los cambios a lo largo del tiempo en el Potencial de Acción Motora Compuesta (CMAP) evocado en el músculo gastrocnemio después de la estimulación del nervio ciático se monitorearon en P50 (semana 8) y P126 (semana 35 18). Los registros se realizaron en un sistema de electromiografía de 2 canales (Keypoint portátil; Medtronic, Skovlunde, Dinamarca), con el filtro de alta frecuencia establecido a 5 kHz y el filtro de baja frecuencia establecido a 2 Hz. La estimulación eléctrica produce artefactos, para reducirlos se utilizaron pulsos eléctricos 40 monofásicos rectangulares con un ancho de pulso de 0.04 ms. Para las mediciones de CMAP, el electrodo de estimulación se colocó sobre el nervio a una distancia de 1 cm del electrodo de registro colocado en el músculo gastrocnemio mediante punción percutánea en el tercio distal de la pata, ipsilateral al procedimiento quirúrgico, con una aguja coaxial. Las mediciones electrofisiológicas se muestran en la FIG. 9. Los datos de amplitud de CMAP se expresaron en milivoltios, los datos de latencia se expresaron en milisegundos y los datos de velocidad de conducción nerviosa se expresaron en metros por segundo (m/s). El número de animales evaluados por punto de tiempo y grupo fue de n= 4.

#### 45 Patología

La metodología para el aislamiento, preparación y análisis del SNC siguió los procedimientos descritos detalladamente por Jordania WH, Young JK, Hyten MJ, Hall DG. Preparación y análisis del sistema nervioso central. Toxicología Patológica. (2011) Enero;39(1):58-65, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

#### 50 Estadística

Los datos se presentaron como valores medios ± DE para el número de experimentos diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student.

\*P < 0.05 y \*\*P < 0.01 comparando todos los grupos SOD1 versus WT.

+P < 0.05 y P ++< 0.01 comparando todos los grupos SOD1 tratados con NR, PT, R o sus combinaciones 55 versus controles no tratados con SOD1.

<sup>a</sup>P < 0.05 y <sup>aa</sup>P <0.01 comparando los grupos PT de SOD1+NR versus SOD1+NR.

Las comparaciones entre los grupos SOD1 y SOD1+R, o entre los grupos SOD1+NR y SOD1+NR+R, no mostraron diferencias significativas.

#### Conclusiones

- 5 1. EH301 (NR+PT) aumentó la supervivencia de los ratones SOD1 (FIG. 1, y FIG. 2). El efecto de la combinación fue mejor que el NR (FIG. 1, y FIG. 2). La PT por sí sola no mejoró la supervivencia (FIG. 1, y FIG. 2).
- 10 2. A pesar de las evidencias celulares y bioquímicas de una disfunción temprana del sistema motor, las pruebas de comportamiento convencionales no detectaron deterioros motores tempranos en el modelo de ratón SOD1.
- 15 Los cambios en el comportamiento motor y el rendimiento de los ratones con ELA se evaluaron utilizando las siguientes pruebas estándar: puntuación neurológica (FIG. 3), elevación de la cola (FIG. 4), rotarod (Fig. 5), alambre para colgar (FIG. 6), plano inclinado/cinta de correr (FIG. 7), registro automático de actividades motoras mediante un sistema de actividad con sensor de movimiento infrarrojo (FIG. 8), y mediciones electrofisiológicas (amplitud, latencia y velocidad de conducción nerviosa asociada al potencial de acción motora en el músculo gastrocnemio después de la estimulación del nervio ciático; FIG. 9). La conclusión fue que tanto NR como EH301 (NR+PT), pero no PT solo, mejoraron las funciones motoras (FIG. 3 - FIGURA. 9). En este sentido, EH301 (NR+PT) fue superior a NR solo (véase FIG. 3, FIG. 5, FIG. 6, FIG. 7, y FIG. 8). Pero los beneficios sólo se observaron en las últimas semanas del experimento. Por lo tanto, a pesar de las posibles evidencias bioquímicas y moleculares de una disfunción temprana del sistema motor, las alteraciones en el rendimiento motor y la coordinación se desarrollaron más tarde en el tiempo. Este hecho indicó que la activación de adaptaciones fisiológicas preservó la función dependiente de la neurona motora. En la práctica, lo que se evidenció fue un declive progresivo de esa función (no una pérdida repentina).
- 20 3. Se observó el efecto de NR en la preservación del potencial de acción motora (FIG. 9).
- 25 4. El resveratrol no mostró ningún beneficio (FIG. 1, y FIG. 2 - FIGURA. 9).
- 30 5. La combinación de NR y PT mostró un efecto mejorado en comparación con la combinación de NR y R. Por ejemplo, como se ve en la FIG. 2, la supervivencia en el grupo NR+PT es significativamente mayor que en el grupo NR+R. Como se ve en la FIG. 4, la puntuación neurológica en el grupo NR+PT es significativamente mejor que el grupo de control (SOD1) y el grupo NR+R (que es esencialmente el mismo que el grupo NR). Como se ve en la FIG. 5. En el experimento rotarod, el grupo NR+PT es significativamente mejor que el grupo de control (SOD1) y el grupo NR+R. Cabe destacar que en este experimento los resultados en el grupo NR+R son incluso peores que los mostrados para el grupo NR. Se pueden extraer conclusiones similares de la FIG. 6, 7 y 8.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende pterostilbeno y ribósido de nicotinamida para su uso en un método para tratar o prevenir la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto.
2. Una composición que comprende pterostilbeno y ribósido de nicotinamida para su uso en un método para retardar o revertir la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el método comprende además administrar un suplemento de ácido graso al sujeto, tal como aceite de coco.
4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es para administración en una o más dosis de la composición.
5. La composición para uso de la reivindicación 4, en la que cada dosis de la composición comprende al menos 40 mg de pterostilbeno, al menos 50 mg de pterostilbeno, al menos 60 mg de pterostilbeno, al menos 100 mg de pterostilbeno, al menos 200 mg de pterostilbeno, al menos 300 mg de pterostilbeno, al menos 400 mg de pterostilbeno, al menos 500 mg de pterostilbeno o al menos 600 mg de pterostilbeno.
6. La composición para uso de la reivindicación 4 ó 5, en la que cada dosis de la composición comprende al menos 200 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 400 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 600 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 800 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 1000 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 1200 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 1400 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 1600 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 1800 mg de ribósido de nicotinamida, al menos 2000 mg de ribósido de nicotinamida o al menos 2200 mg de ribósido de nicotinamida.
7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la composición es para administración en diez o más dosis, treinta o más dosis, cincuenta o más dosis, o cien o más dosis de la composición.
8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que la dosis de la composición es para administración al menos una vez a la semana, al menos dos veces a la semana, al menos tres veces a la semana, al menos una vez al día o al menos dos veces al día.
9. La composición para uso de la reivindicación 7 u 8, en la que las dosis son para administración durante al menos 7 días, durante al menos 30 días, durante al menos 60 días, durante al menos 90 días o durante al menos 6 meses.
10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición es para administración por vía oral.
11. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el método comprende además administrar una prueba de función motora, tal como la Escala de Calificación Funcional de Esclerosis Lateral Amiotrófica Revisada (ALSFRS-R).
12. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el método comprende además administrar una prueba de función de cognición y conducta, tal como la Prueba de Aprendizaje Verbal Complutense (TAVEC), la Prueba de Modalidades de Dígitos y Símbolos (SDMT), la Prueba de Fluidez Verbal, la Prueba de Amplitud de Dígitos (Escala de Memoria Wechsler III), la Prueba de Atención D2, la Escala de Memoria Wechsler III para Letras y Números, la Prueba de la Torre de Londres, la Prueba de Stroop, la Escala de Comportamiento del Sistema Frontal (FrSBe) o la Prueba Breve (conducta subjetiva).
13. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el método comprende además medir una característica en el sujeto, tal como una característica asociada con la inflamación, por ejemplo, el nivel de una citocina, el nivel de proteína amiloide A, el nivel del marcador de activación de macrófagos neopterina, el nivel de creatina fosfoquinasa (CPK), el nivel de velocidad de sedimentación globular, el nivel de proteína C reactiva, la viscosidad plasmática o el recuento celular.

45

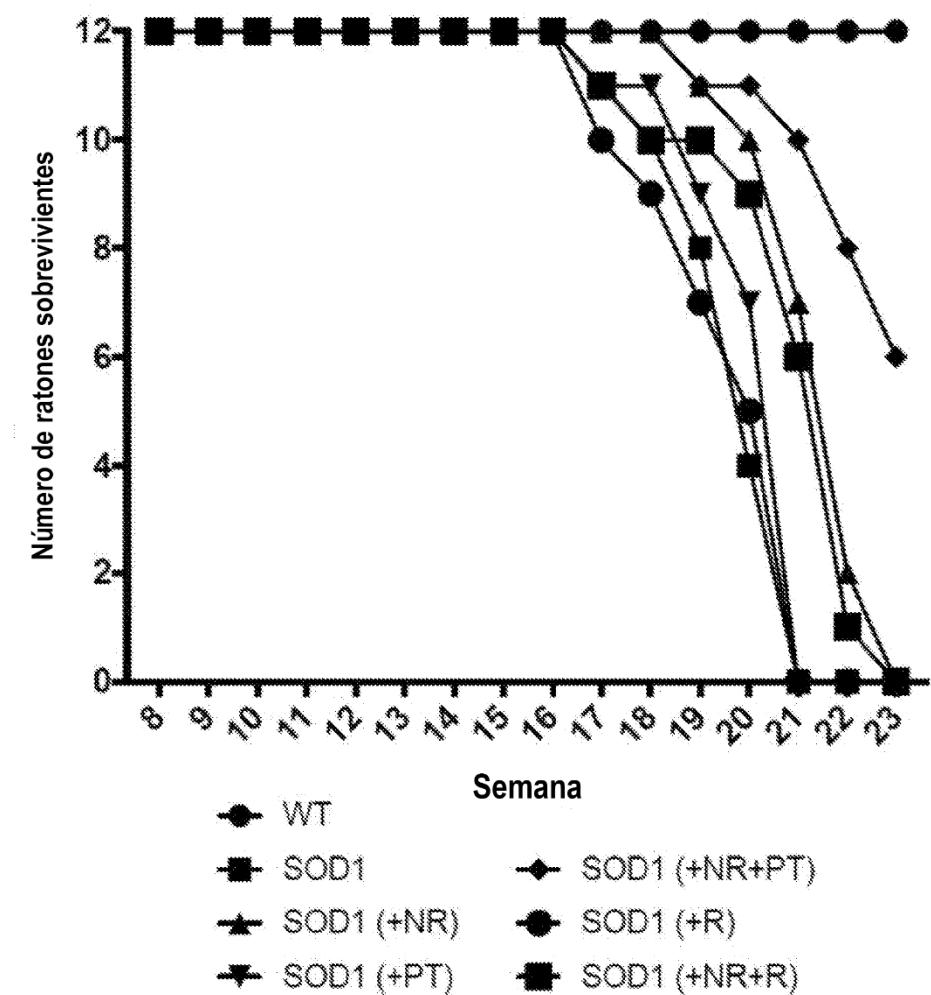


FIG. 1

Número de ratones sobrevivientes/semana

Semana	WT	SOD1	SOD1 (+NR)	SOD1 (+PT)	SOD1 (+NR+PT)	SOD1 (+R)	SOD1 (+NR+R)
8	12	12	12	12	12	12	12
9	12	12	12	12	12	12	12
10	12	12	12	12	12	12	12
11	12	12	12	12	12	12	12
12	12	12	12	12	12	12	12
13	12	12	12	12	12	12	12
14	12	12	12	12	12	12	12
15	12	12	12	12	12	12	12
16	12	12	12	12	12	12	12
17	12	11	12	11	12	10	11
18	12	10	12	11	12	9	10
19	12	8	11	9	11	7	10
20	12	4	10	7	11	5	9
21	12	0	7	0	10	0	6
22	12	0	2	0	8	0	1
23	12	0	0	0	6	0	0

FIG. 2

## PUNTAJE NEUROLÓGICO

Semana	WT	SOD1			SOD1+NR			SOD1+PT			SOD1+NR+PT			SOD1+R			SOD1+NR+R		
		WT	SOD1	SOD1+NR	WT	SOD1+NR	WT	SOD1+PT	WT	SOD1+NR+PT	WT	SOD1+NR+PT	WT	SOD1+R	WT	SOD1+NR+R	WT	SOD1+NR+R	
8	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	
9	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	
10	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	
11	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	
12	0±0	0.75±0.45**	0±0++	0.50±0.52	0±0++	0.75±0.45**	0±0++	0.75±0.45**	0±0++	0.75±0.45**	0±0++	0.75±0.45**	0±0++	0±0++	0±0++	0±0++	0±0++	0±0++	
13	0±0	1±0**	0±0++	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	1±0**	
14	0±0	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	0.33±0.49++	1±0**	0.33±0.49++	
15	0±0	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	0.75±0.45**	1±0**	
16	0±0	1.42±0.51**	0.92±0.29**	1.75±0.45**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	1.75±0.45**	1.42±0.51**	
17	0±0	1.64±0.50**	1.42±0.51**	1.91±0.30**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	1.91±0.30**	1.64±0.50**	
18	0±0	2.30±0.48**	2±0**	2±0**	2±0**	2.30±0.48**	2±0**	2.30±0.48**	2±0**	2.30±0.48**	2±0**	2.30±0.48**	2±0**	2.30±0.48**	2±0**	2.30±0.48**	2±0**	2.30±0.48**	
19	0±0	3±0**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	2.89±0.33**	2.55±0.52**	
20	0±0	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	3.40±0.52**	4±0**	3.40±0.52**	

FIG. 3

ELEVACIÓN DE COLA						
Semana	WT	SOD1	SOD1+NR	SOD1+PT	SOD1+NR+PT	SOD1+R
8	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
9	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
10	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
11	0±0	0.2±0.4	0±0	0±0	0±0	0±0
12	0±0	0.8±0.5**	0±0 <sup>+</sup>	0.5±0.5	0±0 <sup>+</sup>	0.6±0.5*
13	0±0	0.9±0.3**	0±0 <sup>++</sup>	0.9±0.3**	0±0 <sup>++</sup>	1±0**
14	0±0	1±0**	0.3±0.5 <sup>+</sup>	1±0**	0±0 <sup>++</sup>	1±0**
15	0±0	1.2±0.4**	0.7±0.5**	1.1±0.3**	0.2±0.4 <sup>++</sup>	1.3±0.5**
16	0±0	1.3±0.5**	1±0**	1.8±0.6**	0.8±0.4**	1.8±0.4**
17	0±0	1.8±0.6**	1.3±0.5**	2±0**	1±0***	2±0***
18	0±0	2.1±0.3**	1.8±0.5**	2.1±0.3**	1.2±0.4***	2.3±0.5**
19	0±0	2.3±0.5**	2±0**	2.1±0.3**	1.8±0.4**	2.3±0.5**
20	0±0	3±0**	2.8±0.4**	3±0**	2.7±0.5**	3±0**
						2.8±0.4***

FIG. 4

ROTAROD						
Semana	WT	SOD1	SOD1+NR	SOD1+PT	SOD1+NR+PT	SOD1+NR+R
8	1200 ± 0	1136 ± 124	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0
9	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0
10	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0	1200 ± 0
11	1200 ± 0	1087 ± 170	1200 ± 0	1091 ± 136	1200 ± 0	1200 ± 0
12	1200 ± 0	966 ± 139**	1200 ± 0 <sup>++</sup>	968 ± 113**	1200 ± 0 <sup>++</sup>	1012 ± 136*
13	1200 ± 0	885 ± 129**	1088 ± 133	885 ± 45**	1200 ± 0 <sup>++</sup>	857 ± 98**
14	1200 ± 0	774 ± 87**	1105 ± 121 <sup>++</sup>	794 ± 95**	1200 ± 0 <sup>++</sup>	736 ± 135**
15	1200 ± 0	670 ± 92**	1051 ± 138 <sup>++</sup>	731 ± 78**	1200 ± 0 <sup>++a</sup>	640 ± 127**
16	1200 ± 0	447 ± 119*	809 ± 148*** <sup>++</sup>	392 ± 115**	1106 ± 135 <sup>++a</sup>	384 ± 201**
17	1200 ± 0	268 ± 118**	446 ± 158**	228 ± 99**	1021 ± 106*** <sup>++aa</sup>	210 ± 69**
18	1200 ± 0	134 ± 81**	234 ± 49**	157 ± 53**	934 ± 100*** <sup>++aa</sup>	66 ± 121**
19	1200 ± 0	23 ± 20**	97 ± 83**	28 ± 30**	438 ± 257*** <sup>++aa</sup>	19 ± 7**
20	1200 ± 0	0 ± 0**	13 ± 12**	0 ± 0**	189 ± 162*** <sup>aa</sup>	0 ± 0**
						7 ± 9**

CABLE COLGANTE						
Semana	WT	SOD1	SOD1+NR	SOD1+PT	SOD1+NR+PT	SOD1+R
8	171 ± 13	175 ± 9	180 ± 0	180 ± 0	180 ± 0	180 ± 0
9	178 ± 5	177 ± 6	180 ± 0	180 ± 0	180 ± 0	180 ± 0
10	175 ± 11	177 ± 5	180 ± 0	180 ± 0	180 ± 0	180 ± 0
11	177 ± 11	177 ± 7	180 ± 0	173 ± 10	180 ± 0	175 ± 6
12	178 ± 5	153 ± 24	180 ± 0*	166 ± 10	180 ± 0*	168 ± 10
13	179 ± 3	128 ± 27**	175 ± 8**	159 ± 9**	180 ± 0**	148 ± 12**
14	180 ± 0	99 ± 25**	172 ± 11**	127 ± 14**	180 ± 0**	124 ± 12**
15	178 ± 6	75 ± 17**	159 ± 12***	113 ± 17***	171 ± 11**	78 ± 24**
16	176 ± 7	45 ± 12**	145 ± 16***	103 ± 16***	161 ± 12***	38 ± 19**
17	173 ± 9	29 ± 11**	60 ± 17***	28 ± 13**	146 ± 13***aa	19 ± 7**
18	170 ± 13	18 ± 11**	27 ± 8**	17 ± 8**	63 ± 9***aa	7 ± 7**
19	176 ± 7	2 ± 4**	12 ± 7**	3 ± 4**	39 ± 11***aa	2 ± 4**
20	175 ± 8	0 ± 0**	1 ± 3**	0 ± 0**	18 ± 16***	0 ± 0**
						0.6 ± 1**

FIG. 6

CINTA DE CORRER						
Semana	WT	SOD1	SOD1+NR	SOD1+PT	SOD1+NR+PT	SOD1+R
8	81.1 ± 20.9	82.3 ± 17.6	62.8 ± 29.0	67.1 ± 27.0	64.5 ± 31.1	81.8 ± 18.3
9	86.2 ± 13.1	86.2 ± 13.3	60.2 ± 31.2	57.4 ± 29.0	81.1 ± 20.8	85.9 ± 13.7
10	81.0 ± 21.2	85.9 ± 13.0	90.0 ± 0.0	90.0 ± 0.0	86.2 ± 13.0	90.0 ± 0.0
11	76.4 ± 24.8	79.8 ± 23.9	90.0 ± 0.0	86.3 ± 13.0	78.8 ± 20.6	90.0 ± 0.0
12	68.4 ± 26.9	80.4 ± 22.6	86.2 ± 13.1	81.8 ± 18.2	76.8 ± 23.5	76.8 ± 20.8
13	72.1 ± 26.6	61.5 ± 26.0	82.4 ± 17.7	64.2 ± 27.5	85.8 ± 13.2	80.2 ± 21.2
14	61.1 ± 31.0	60.7 ± 25.9	70.2 ± 29.7	82.4 ± 17.7	81.9 ± 18.5	70.0 ± 27.2
15	78.3 ± 27.4	52.5 ± 33.9	74.0 ± 28.8	75.5 ± 24.5	82.0 ± 18.2	74.5 ± 26.3
16	82.1 ± 17.8	21.2 ± 22.2**	63.2 ± 28.6	21.0 ± 24.5**	63.7 ± 27.6	11.6 ± 5.4**
17	90.0 ± 0.0	11.2 ± 3.3**	40.3 ± 31.3**	8.5 ± 3.3**	57.1 ± 27.6***	6.9 ± 1.8**
18	77.2 ± 23.1	5.4 ± 3.2**	8.4 ± 2.5**	5.2 ± 2.2**	26.8 ± 12.1***aa	0.9 ± 1.5***
19	89.8 ± 0.6	0.1 ± 0.2**	2.4 ± 2.6**	0.6 ± 0.9**	8.0 ± 4.4***a	0.3 ± 0.2**
20	81.0 ± 21.0	0.0 ± 0.0**	0.1 ± 0.2**	0.0 ± 0.0**	2.4 ± 2.2**	0.0 ± 0.0**
						0.1 ± 0.2**

FIG. 7

## ACTÍMETRO

PERÍODO	WT	SOD1	SOD1+NR	SOD1+PT	SOD1+NR+PT	SOD1+R	SOD1+NR+R
I (semanas 8-11)	MS	1328 ± 162	1263 ± 126	1341 ± 143	1285 ± 112	1378 ± 148	1175 ± 177
	MF	63 ± 21	52 ± 25	66 ± 23	62 ± 30	74 ± 26	69 ± 19
II (semanas 12-15)	MS	1436 ± 104	1217 ± 144	1417 ± 94	1305 ± 126	1415 ± 92	1246 ± 83*
	MF	93 ± 20	59 ± 20	88 ± 32	72 ± 21	83 ± 31	59 ± 18
III (semanas 16-18)	MS	1460 ± 176	345 ± 90**	656 ± 99***	397 ± 75**	881 ± 101***+aa	288 ± 72**
	MF	97 ± 28	21 ± 5**	50 ± 27*	30 ± 16**	53 ± 20**	24 ± 10**
IV (semanas 19-20)	MS	1216 ± 159	123 ± 59**	73 ± 30**	51 ± 20***	164 ± 72***a	58 ± 25**
	MF	62 ± 21	1 ± 2**	3 ± 4**	1 ± 2**	9 ± 5***	0 ± 0**

FIG. 8

## PARÁMETROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Grupo	Amplitud (mV)		Latencia (ms)		Velocidad de conducción de nervios (m/s)	
	W8	W18	W8	W18	W8	W18
WT	2.45 ± 0.37	2.55 ± 0.38	0.32 ± 0.09	0.15 ± 0.10*	6.80 ± 0.42	6.30 ± 0.26
SOD1	1.45 ± 0.48*	0.65 ± 0.24**	0.72 ± 0.12**	1.47 ± 0.22**	3.42 ± 0.43**	1.85 ± 0.31**
SOD1+NR	2.37 ± 0.30++	1.66 ± 0.25***	0.27 ± 0.05++	0.15 ± 0.06++	5.65 ± 0.55***	3.92 ± 0.97***++
SOD1+PT	1.47 ± 0.25**	0.60 ± 0.18***++	0.65 ± 0.19***++	1.20 ± 0.22***++	3.20 ± 0.18***++	1.85 ± 0.31**
SOD1+NR+PT	2.75 ± 0.13++	1.85 ± 0.13***++	0.25 ± 0.06++	0.12 ± 0.05***	6.17 ± 0.74++	4.87 ± 0.38***++
SOD1+R	1.37 ± 0.26**	0.57 ± 0.22***++	0.60 ± 0.08***++	1.10 ± 0.14***++	3.10 ± 0.18***++	1.75 ± 0.13**
SOD1+NR+R	2.30 ± 0.27+	1.67 ± 0.09***++	0.20 ± 0.08++	0.22 ± 0.12++	5.10 ± 0.63***++	3.77 ± 1.29***++