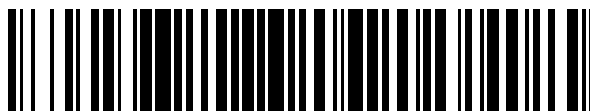


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 182**

51 Int. Cl.:

A61K 31/403	(2006.01)	A61P 11/06	(2006.01)
A61K 31/407	(2006.01)	A61P 17/02	(2006.01)
A61K 31/437	(2006.01)	A61P 25/02	(2006.01)
A61K 31/57	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
A61K 31/566	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/568	(2006.01)		
A61K 31/5685	(2006.01)		
A61P 1/00	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07870407 .9**
- 96 Fecha de presentación: **29.11.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2097079**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **Modulación de las rutas metabólicas de prostaglandina/ciclooxigenasa**

30 Prioridad:
30.11.2006 GB 0623971
30.11.2006 US 867873 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2012

73 Titular/es:
HUNTER-FLEMING LIMITED (100.0%)
REGUS HOUSE, 1 FRIARY, TEMPLE QUAY
BRISTOL BS1 6EA, GB

72 Inventor/es:
WÜLFERT, ERNST

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 182 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

Modulación de las rutas metabólicas de prostaglandina/ciclooxigenasa.

La presente invención se refiere a una serie de compuestos que se ha descubierto que modulan las rutas metabólicas implicadas en las actividades de ciclooxigenasa y prostaglandina sintasas y en la síntesis de prostaglandinas y que, como resultado, pueden usarse en el tratamiento y la profilaxis de una variedad de enfermedades y trastornos como se especifican en las reivindicaciones, algunos de los cuales se han probado muy refractarios a los regímenes de tratamiento anteriores.

Las prostaglandinas (PG), también designadas como prostanoides, son un grupo ampliamente distribuido de lípidos oxigenados que modulan funciones celulares en un contexto tanto fisiológico como patológico. La biosíntesis de PG se inicia mediante la liberación de ácido araquidónico (AA), un ácido graso importante, de las membranas celulares, una reacción catalizada por la fosfolipasa A2 (PLA2). El AA liberado se convierte en un intermedio oxigenado inestable (PGH2) mediante la ciclooxigenasa (COX). Una vez formado, el intermedio PGH2 puede convertirse en diversas prostaglandinas, tales como prostaglandina E2 (PGE2), prostaciclina (PGI2), prostaciclina F2 α (PGF2 α) o prostaglandina D2 (PGD2), mediante una serie de enzimas específicas denominadas prostaglandina sintasas (por ejemplo, PGE sintasa o PGE-S, PGD sintasa o PGD-S, etc.).

La COX está presente en tres isoformas: COX-1, COX-2 y la variante COX-3 de corte y empalme de COX-1. La COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de tejidos, mientras que la COX-2 se induce generalmente en respuesta a citocinas proinflamatorias y estrés. Estos descubrimientos condujeron a la clara opinión de que la COX-2 es responsable de los efectos proinflamatorios adversos de los prostanoides. Por lo tanto, la inhibición de COX-2 se ha considerado una diana primaria en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Sin embargo, los investigadores han mostrado que la COX-2 desempeña también un papel importante en la homeostasis basal de órganos y tejidos.

Ensayos clínicos recientes han revelado que el tratamiento a largo plazo con inhibidores de COX-2 aumenta la incidencia de apoplejía e infarto de miocardio, complicaciones atribuidas al bloqueo de los efectos vasoprotectores de la PGI2 derivada de COX-2. Sin embargo, el bloqueo de las enzimas COX reduce también la producción de PGD2. En tejidos periféricos, la PGD2 promueve la vasodilatación e inhibe la agregación de plaquetas. En el cerebro, es la prostaglandina más abundante y un estudio reciente muestra que la PGD2 media efectos neuroprotectores en neuronas hipocámpicas. El bloqueo de la PGD-2 derivada de COX-2 puede contribuir por lo tanto al aumento de la incidencia de apoplejía e infarto de miocardio observado en ensayos clínicos con inhibidores de COX-2.

La PGD2 es de vida muy corta, y experimenta deshidratación *in vivo* e *in vitro*, proporcionando prostaglandinas biológicamente activas de la serie J2, incluyendo la prostaglandina 15-desoxi-prostaglandina J2 (15d-PGJ2). Esta prostaglandina es un derivado antiinflamatorio natural químicamente estable de PGD2. La 15d-PGJ2 es un ligando de alta afinidad del receptor activado por el inductor de la proliferación de peroxisomas (PPAR) de subtipo PPAR γ , que es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que se ha implicado en un amplio intervalo de funciones celulares, incluyendo acciones antiinflamatorias. La 15d-PGJ2 reprime varios genes inflamatorios tales como los genes de óxido nítrico sintasa, prostaglandina E sintasa (PGES) y factor de necrosis tumoral α (TNF α) mediante mecanismos dependientes de PPAR γ así como independientes de PPAR γ . En condrocitos de rata, la 15d-PGJ2 redujo casi completamente la síntesis de PGE2 estimulada por citocina y la expresión de PGES, indicando que la 15d-PGJ2 es un mensajero antiinflamatorio que desactiva la producción de la prostaglandina proinflamatoria PGE2 en estas células. Independientemente del mecanismo, la 15d-PGJ2 está presente *in vivo* durante la fase de resolución de la inflamación, sugiriendo de nuevo que puede funcionar como regulador por realimentación de la respuesta inflamatoria. Se ha mostrado también que la administración de 15d-PGJ2 reduce el desarrollo de colitis experimental en rata, un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria. Se esperaría por lo tanto que los agentes y condiciones que inclinan la balanza de la producción de prostaglandina a favor de PGD2 y 15d-PGJ2 tuvieran efectos antiinflamatorios.

En el sistema nervioso central, las acciones antiinflamatorias de 15d-PGJ2 podrían ser beneficiosas en trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple, pero también en apoplejía, lesión de médula espinal y traumatismo cerebral, en que la inflamación contribuye al daño cerebral y la muerte celular. En todas estas afecciones, el daño cerebral está asociado a una activación microglial excesiva. En el sistema nervioso central, las microglía, células inmunitarias innatas residentes, desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio. La activación incontrolada de las microglía puede ser directamente tóxica para las células cerebrales al liberar diversas sustancias tales como citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF α , IL-6), NO, PGE2 y superóxido. Varios estudios muestran que la 15d-PGJ2 puede reprimir la producción de citocinas inflamatorias y NO por microglíocitos y astrocitos activados, sugiriendo que las prostaglandinas podrían desempeñar un papel importante en la prevención del daño cerebral asociado a una activación excesiva de gliocitos. El descubrimiento de que la administración de 15d-PGJ2 antes y al inicio de la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple, reducía significativamente la gravedad de la EAE sugiere adicionalmente que la 15d-PGJ2 puede ser eficaz para prevenir el daño cerebral en enfermedades neurodegenerativas inflamatorias.

Estudios experimentales recientes muestran que la 15d-PGJ2 reduce la inflamación de tejido cerebral, la disfunción del comportamiento y la pérdida neuronal después de hemorragia intracerebral en ratas, y protege al cerebro de la lesión por isquemia-reperfusión en un modelo experimental de apoplejía. La infusión intraventricular de 15d-PGJ2 reducía el volumen de infarto cerebral, inhibía la apoptosis cerebral y neuronal, suprimía la activación de NF- κ B y regulaba positivamente la hemooxigenasa 1 (HO-1), un potente antioxidante endógeno, de manera dependiente de PPAR γ . Estos resultados, que sugieren un efecto neuroprotector de 15d-PGJ2 en la apoplejía isquémica, se corroboran adicionalmente por un estudio reciente que muestra que los pacientes con apoplejía isquémica aguda tienen mayores niveles plasmáticos de 15d-PGJ2 que los sujetos normales y que una 15d-PGJ2 plasmática aumentada está asociada a un mejor resultado neurológico temprano y tardío. La 15d-PGJ2 plasmática aumentada está también asociada a un volumen de infarto reducido, y este efecto era independiente del efecto de otras variables de pronóstico importantes. Se esperaría por lo tanto que los agentes y condiciones que inclinan la balanza de la producción de prostaglandina a favor de 15d-PGJ2 tuvieran efectos beneficiosos tanto en trastornos neurodegenerativos inflamatorios crónicos, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP) y esclerosis múltiple, como en afecciones agudas tales como apoplejía, lesión de médula espinal y lesión cerebral traumática.

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo y mortal caracterizado por la deposición de placas de A β extracelular (amiloide β) y la formación de ovillos intracelulares en el cerebro. Las placas de A β están compuestas principalmente por amiloide β y péptidos de A β . La acumulación de A β causa una respuesta inflamatoria que se ha propuesto que contribuye a la patogénesis de la EA y aumenta el daño neuronal. Se cree también que los niveles cerebrales aumentados de péptidos de A β solubles causan disfunción neuronal y discapacidad cognitiva mucho antes de que tenga lugar la deposición de placas. La formación de péptidos de A β en el cerebro es por lo tanto un desencadenante primario de la patogénesis de la EA.

La generación de A β se inicia mediante una proteasa que escinde una proteína precursora mayor, la proteína precursora de amiloide β (β APP) en el lado del extremo N del péptido de A β . Esta proteasa, también denominada β -secretasa o enzima de escisión de APP en el sitio β (BACE1), es una aspartilproteasa transmembrana. Los niveles de proteína BACE1 y el producto β -secretasa (fragmento C-terminal de β) aumentan en el cerebro de pacientes de EA esporádica. Por lo tanto, reducir la producción de A β en el cerebro con EA es un objetivo terapéutico principal.

Se ha reseñado que los niveles de ARNm y proteína de BACE1 aumentan por mediadores proinflamatorios y se regulan negativamente por fármacos que son agonistas del receptor activado por el inductor de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ). Más recientemente, se ha mostrado también que el agotamiento de PPAR γ potencia los niveles de ARNm de β -secretasa al aumentar la actividad promotora del gen BACE1, mientras que la sobreexpresión de PPAR γ , así como de activadores de PPAR γ , modula específicamente la transcripción de BACE1 al reprimir la actividad promotora del gen BACE1, sugiriendo que PPAR γ podría ser un represor de BACE1. Además, el tratamiento de ratones transgénicos de hAPP con agonistas de PPAR γ reducía tanto los niveles de ARNm de BACE1 como de amiloide β intracelular en neuronas corticales.

Se ha mostrado también que la sobreexpresión de PPAR γ reduce la secreción de A β en células de cultivo mediante la activación de la ubiquinación y la degradación mediada por proteosoma de la proteína precursora β -APP, y se ha reseñado que la activación de PPAR γ afectaba directamente a la estabilidad de A β añadido externamente a células en cultivo. Esta reducción de la estabilidad sugiere que la activación de PPAR γ puede inducir un mecanismo de aclaramiento celular rápido para el péptido amiloide.

En conjunto, estos datos apoyan un papel importante de PPAR γ en la modulación de la generación de amiloide β , y sugieren un mecanismo protector mediante el que la activación de PPAR γ reduce la producción de péptidos de amiloide β en el cerebro.

La 15d-PGJ2, un ligando de alta afinidad del receptor activado por el inductor de la proliferación de peroxisomas (PPAR) de subtipo PPAR γ , reprime varios genes inflamatorios mediante mecanismos dependientes de PPAR γ así como independientes de PPAR γ . Se esperaría por lo tanto que las condiciones que aumentan la producción endógena de 15d-PGJ2 suprimieran los procesos inflamatorios cerebrales así como que redujeran la formación de péptido amiloide en el cerebro con EA. Por consiguiente, se esperaría que los agentes y condiciones que aumentan la producción endógena de 15d-PGJ2 tuvieran efectos beneficiosos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Las prostaglandinas de la serie J2 son potentes inductores de la producción de factor de crecimiento nervioso (NGF) y de factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF), y promueven el crecimiento neurítico por NGF en cultivo celular. La capacidad promotora de neuritas de 15d-PGJ2 no aparece por PPAR γ , porque el agonista y antagonista sintéticos de PPAR γ no cambiaron el efecto promotor de neuritas de la 15-desoxi-PGJ2. En estudios animales, se ha mostrado que la administración intracerebroventricular de NGF recupera neuronas colinérgicas, estimula el crecimiento axónico y mejora la función colinérgica. De forma similar, la inyección intracerebroventricular de NGF atenuaba la muerte neuronal en los hipocampos de jerbos sujetos a isquemia cerebral. Se ha mostrado que el BDNF promueve la supervivencia y el crecimiento de neuronas *in vitro*, y que mejora las funciones motoneuronales en modelos animales. En animales sometidos a isquemia prosencefálica transitoria, el BDNF atenuaba la lesión neuronal isquémica. Desgraciadamente, debido a la mala penetración de estas neurotrofinas a

través de la barrera hematoencefálica, los ensayos clínicos no han conseguido mostrar efectos significativos. Sin embargo, se esperaría que las condiciones o tratamientos que aumentan los niveles endógenos de 15d-PGJ2 tanto facilitarían la producción local de estos factores de crecimiento como promoverían el crecimiento neuronal y por tanto facilitarían la reparación neuronal en médula espinal y cerebro.

5 Los niveles aumentados de marcadores inflamatorios están asociados a enfermedad vascular isquémica, y se considera cada vez más que la inflamación está implicada en la patogénesis de síndromes coronarios agudos. La inflamación tiene un papel relevante en la iniciación y progresión de la aterosclerosis, pero puede desempeñar también un papel principal en el desarrollo de trombosis al activar el proceso de coagulación. Se esperaría por lo tanto que las condiciones y agentes que reducen la inflamación vascular pudieran ser beneficiosos en trastornos cardiovasculares en que la inflamación contribuye a la muerte o daño celular, tales como enfermedad cardíaca coronaria.

10 El ARNm de prostaglandina D sintasa (PGDS) se expresa en el corazón. Por tanto, la PGD2 producida localmente puede dar como resultado 15d-PGJ2 en miocitos o células circundantes. El PPAR γ está también presente y es funcional en miocitos cardíacos. Un estudio reciente ha mostrado que 15d-PGJ2, el metabolito natural de PGD2, ejerce efectos antiinflamatorios en miocitos cardíacos al modular COX-2 estimulada por IL-1 β , PGE-S e iNOS de manera dependiente de PPAR. La 15d-PGJ2 bloqueaba la estimulación por IL-1 β de la producción de PGE2, pero no modificaba la señalización por IL-1 β de PGI2 o PG2F2 α , indicando que los efectos del ligando PPAR γ son específicos de PGE-S. Se esperaría que el bloqueo por 15d-PGJ2 de PGE-S inducido por IL-1 β redujera la producción de la prostaglandina proinflamatoria PGE2 en tejido cardíaco. Se ha mostrado también que la 15d-PGJ2 regula positivamente la expresión de hemo oxigenasa 1 (HO-1) en miocitos cardíacos y reduce el tamaño de infarto miocárdico en un modelo de rata de infarto de miocardio inducido por isquemia-reperfusión regional. Entre los diferentes ligandos de PPAR γ estudiados, la 15d-PGJ2 causaba de lejos la reducción más pronunciada del tamaño de infarto. Aunque que este efecto está mediado por PPAR γ , la expresión aumentada de la proteína HO-1 antioxidante y citoprotectora era independiente de PPAR γ . En conjunto estos resultados sugieren que las condiciones y agentes que aumentan los niveles endógenos de 15d-PGJ2 podrían reducir la inflamación vascular y ser por lo tanto beneficiosos en trastornos cardiovasculares.

15 Cada vez más evidencias identifican al tejido adiposo como una fuente importante de factores inflamatorios en circulación, particularmente en presencia de obesidad. La grasa produce adipocitocinas proinflamatorias que incluyen TNF α , leptina PAI-1, IL-6, y angiotensinógeno. El TNF α es un activador importante de NF κ B. El TNF α inhibe también la señalización de insulina, causando así resistencia a insulina. Los niveles de PAI-1 predicen CAD y diabetes, y son un contribuyente importante al estado protrombótico en obesidad. La IL-6 estimula la producción hepática de proteína C reactiva (CRP) y contribuye a los niveles elevados de (hs)CRP altamente sensible en el suero de sujetos obesos. La hsCRP predice infarto de miocardio, apoplejía, enfermedad arterial periférica y muerte súbita. El angiotensinógeno es el precursor de Ang II, que es bien conocido por activar múltiples mecanismos de lesión vascular. En general, todas estas adipocinas están elevadas en sujetos insulinoresistentes con adiposidad visceral aumentada, creando un medio proinflamatorio. La diabetes sacarina de tipo 2 (T2D) y la obesidad son por lo tanto afecciones inflamatorias.

20 El tejido adiposo expresa los mayores niveles de PPAR γ en comparación con otros tejidos. Los ligandos de PPAR γ promueven la diferenciación de células grasas y la captación de ácidos grasos libres en el tejido adiposo. Tienen también un efecto importante para atenuar el medio proinflamatorio al reducir la expresión de TNF α , PAI-1 e IL-6 y aumentar la expresión de adiponectina en grasa. Por tanto, la activación de PPAR γ suprime la inflamación directamente en células vasculares e indirectamente mediante la regulación de la expresión génica en tejido adiposo.

25 La T2D y el síndrome metabólico se caracterizan por resistencia a la acción de la insulina en tejidos periféricos, incluyendo músculo esquelético, tejido hepático y adiposo. La activación de PPAR γ por algunos de los ligandos sintéticos, tales como tiazolidindionas, mejora la sensibilidad a insulina y reduce los niveles en circulación de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres sin estimular la secreción de insulina en modelos de roedor de T2D. Los agonistas de PPAR γ alivian también la resistencia a insulina periférica en seres humanos y se han usado eficazmente en el tratamiento de pacientes de T2D.

30 La 15-desoxi-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) es una prostaglandina antiinflamatoria natural químicamente estable que parece ser el presunto ligando endógeno de alta afinidad del receptor activado por el inductor de la proliferación de peroxisomas de subtipo PPAR γ . Se esperaría por lo tanto que los agentes y condiciones que aumentan la producción endógena de 15d-PGJ2 tanto suprimieran la inflamación vascular como mejoraran la sensibilidad a insulina en diabetes de tipo 2.

35 Las citocinas proinflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral (TNF) α , se sobreexpresan en psoriasis y dermatitis atópica. El TNF α desempeña un papel importante tanto en la iniciación como en la persistencia de la inflamación, y datos experimentales recientes muestran que el desarrollo de lesiones en un modelo experimental de psoriasis está mediado por TNF α . Estos descubrimientos, que sugieren un papel para TNF α en la patogénesis de la psoriasis, están apoyados por los resultados de ensayos clínicos recientes, que muestran que la administración de

un anticuerpo monoclonal (mAb) contra TNF α (infliximab) o una proteína de fusión receptora de TNF (etanercept) daba como resultado una mejora de la enfermedad en pacientes de psoriasis.

La 15d-PGJ2, un metabolito químicamente estable de la prostaglandina PGD2, es un ligando de alta afinidad del receptor activado por el inductor de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ).

5 La 15d-PGJ2 reprime varios genes proinflamatorios en macrófagos activados, en microglíocitos y en astrocitos humanos, incluyendo los genes de sintasa inducible por NO (iNOS) y factor de necrosis tumoral α (TNF α), y esta represión es al menos parcialmente dependiente de la expresión de PPAR γ . Además, se ha mostrado que los ligandos sintéticos de PPAR γ , tales como las tiazolidindionas sensibilizantes de insulina, mejoran la psoriasis en sujetos humanos. En conjunto, estos descubrimientos sugieren que los agentes y condiciones que aumentan la producción endógena de 15d-PGJ2 podrían ser eficaces en el tratamiento de la psoriasis.

10 Evidencias recientes indican que ciertos agonistas sintéticos de PPAR γ exhiben actividades antiproliferativas moderadas contra muchas estirpes celulares de cáncer humano derivadas de epitelio. Además, datos recientes indican que las células epiteliales prostáticas y linfocitos T humanos normales son más resistentes a la inducción apoptótica por estos ligandos de PPAR γ . A la vista de este efecto específico de cáncer, el uso potencial de agonistas de PPAR γ como agentes quimiopreventivos ha recibido mucha atención.

15 Se ha mostrado también que la 15d-PGJ2, un ligando natural de PPAR γ , posee actividad antitumoral. Por ejemplo, la 15d-PGJ2 inhibe significativamente el crecimiento celular e induce la apoptosis en varios tipos de células cancerosas, incluyendo células de cáncer colorrectal, gástrico, de mama y hepático. Los estudios mecanísticos sugieren que estos efectos inhibidores del crecimiento están mediados por mecanismos independientes de PPAR γ . Sin embargo, independientemente del mecanismo implicado, se esperaría que los agentes o condiciones que aumentan los niveles endógenos de 15d-PGJ2 inhibieran el crecimiento y progresión tumorales.

20 Se han detectado niveles aumentados de prostaglandina E2 (PGE2) en una variedad de malignidades. Varias series de evidencias, más allá del descubrimiento de niveles elevados de PGE2 en tumores, sugieren que la PGE2 desempeña un papel en el desarrollo y la progresión del cáncer. Por ejemplo, la PGE2 puede estimular la proliferación y motilidad celulares inhibiendo la apoptosis y la inmunovigilancia. De forma importante, la PGE2 puede inducir también la angiogénesis, al menos en parte, potenciando la producción de factores proangiogénicos, incluyendo factor de crecimiento endotelial vascular. Consistentemente con estos descubrimientos, se ha mostrado que los niveles elevados de PGE2 en especímenes de tejido canceroso se correlacionan significativamente con la aparición de enfermedad metastásica y vascularización tumoral aumentada.

25 Recientes trabajos en animales experimentales sugieren también que la PGE2 puede promover la carcinogénesis. Se ha encontrado que la desestabilización genética del receptor EP2 de PGE2 reduce el número y tamaño de los tumores experimentales, y otros estudios han mostrado que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-PGE2 inhibía el crecimiento de tumores transplantables. Dados estos antecedentes, podría esperarse que los agentes y condiciones que inhiben las rutas enzimáticas que conducen a cantidades aumentadas de PGE2 en cáncer inhibieran también la progresión del crecimiento tumoral.

30 La síntesis de PGE2 a partir de ácido araquidónico requiere dos enzimas que actúan secuencialmente, la ciclooxigenasa (COX) y la prostaglandina E sintasa (PGES). Se ha detectado la expresión aumentada de PGES en varias malignidades humanas, planteando la posibilidad de que la expresión aberrante de PGES active la producción aumentada de PGE2 que contribuye a la proliferación celular y crecimiento tumoral. Se ha reseñado que la 15d-PGJ2 inhibe casi completamente la síntesis de PGE2 inducida por citocina y la expresión de PGE sintasa de membrana. Por consiguiente, se esperaría que los agentes y condiciones que aumentan los niveles endógenos de 15d-PGJ2 redujeran la síntesis de PGE2 y por tanto la proliferación celular y crecimiento tumoral, y por lo tanto tuvieran efectos beneficiosos en el tratamiento del cáncer.

35 El documento FR 2829697 da a conocer el uso de derivados 7-hidroxilados y 7-cetílicos de hormonas esteroideas 3 β -hidroxiladas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias y/o funcionales, en particular enfermedad de Crohn, rectocolitis hemorrágica y síndrome del colon irritable.

40 El documento WO 2005/079810 se refiere al uso de esteroides 7-hidroxilados capaces de modular el receptor β de estrógenos para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas, tales como cánceres de mama y próstata, y otros trastornos proliferativos tales como trastornos de próstata, incluyendo trastornos del desarrollo y envejecimiento de la próstata.

45 El documento NL 7100213 da a conocer un proceso para preparar una formulación antiinflamatoria que comprende derivados de tetrahydrocarbazol desprovista de efectos secundarios ulcerogénicos en una forma adecuada para administración terapéutica.

50 El documento WO 01/60375 se refiere al uso de un esteroide 7 α -hidroxisustituido tal como 7 α -hidroxiestradioles, 7 α -hidroxideshidroepiandrosteronas y 7 α -hidroxipregnenolonas para la fabricación de un medicamento para el

tratamiento de degeneración celular aguda debida a la afectación metabólica causada, por ejemplo, por apoplejía, coma y traumatismo cerebral o espinal.

5 El documento WO 02/00224 da a conocer el uso, para la fabricación de un medicamento para la protección frente a daño neuronal, de un 3-hidroxi-7 β -hidroxiesteroide o un 4-oxo-7 β -hidroxiesteroide y los ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; el daño neuronal está causado, por ejemplo, por un trastorno crónico tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o deterioro cognitivo sin demencia (DCSD) o por un trastorno agudo causado, por ejemplo, por apoplejía, traumatismo cerebral, lesión de médula espinal o lesión de nervio periférico.

10 El documento GB 2.378.898 da a conocer el uso de 3-hidroxi-7 β -hidroxiesteroides, especialmente los isómeros 7 β de los mismos y los ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos para proteger contra el daño inducido por isquemia de órganos periféricos, tales como corazón o riñones, así como el tratamiento de lesión de médula espinal.

15 Se ha mostrado anteriormente que la 7 β -hidroxiepiandrosterona (7 β -OH-EPIA), un 7-hidroxiesteroide endógeno, tiene efectos tanto neuroprotectores como cardioprotectores (documentos WO 02/00224, WO 02/00225 y WO 03/015791). El esteroide protege contra la muerte celular neuronal *in vitro* (cultivos de corte hipocámpico organotípico (OTHSC) y células PC12) y contra el daño cerebral en numerosos modelos experimentales *in vivo*, y es eficaz para proteger frente a infarto de miocardio inducido por isquemia regional en corazones de rata perfundidos. En conjunto, estos descubrimientos sugieren que la 7 β -OH-EPIA podría tener efectos beneficiosos en la prevención y el tratamiento de afecciones neurodegenerativas tales como apoplejía, lesión de médula espinal, lesión cerebral traumática y EA, y en afecciones cardiovasculares tales como infarto de miocardio (IM).

20 Más recientemente, se ha mostrado que la incubación de células PC12 con indometacina, un inhibidor de ciclooxigenasa (COX), anulaba completamente la protección inducida por 7 β -OH-EPIA contra la isquemia. Estos resultados sugieren que la actividad de COX es necesaria para los efectos neuroprotectores de 7 β -OH-EPIA.

25 Se muestra ahora que la incubación de células sanguíneas monocíticas humanas (HMBC) con concentraciones nanomolares de 7 β -OH-EPIA causa un aumento de casi 10 veces en la producción de la prostaglandina 15-desoxi- Δ 12,14-J2 (15d-PGJ2). Este efecto del 7-hidroxiesteroide parece ser específico de 15d-PGJ2, puesto que el esteroide no alteraba significativamente la producción de la prostaglandina E2 (PGE2) en estas células. En contraposición, la incubación de HMBC con la citocina proinflamatoria factor de necrosis tumoral α (TNF α) aumentaba la producción de ambas prostaglandinas aprox. 3 veces. Además, la coincubación con TNF α y 7 β -OH-EPIA causaba un aumento de 15d-PGJ2 similar al aumento observado con 7 β -OH-EPIA sola, mientras que la adición de concentraciones nanomolares de 7 β -OH-EPIA anulaba completamente los aumentos de PGE2 por TNF α .

30 Se ha reseñado que la 15d-PGJ2 inhibe casi completamente la síntesis de PGE2 inducida por citocina y la expresión de PGE sintasa de membrana (mPGES) en condrocitos de rata, indicando que la 15d-PGJ2 es un mensajero antiinflamatorio que desactiva la producción de la prostaglandina proinflamatoria PGE2 en estas células. Por lo tanto, los descubrimientos pueden indicar que la inhibición de la producción inducida por TNF α de la prostaglandina proinflamatoria PGE2 por 7 β -OH-EPIA está mediada por la liberación aumentada de 15d-PGJ2.

35 La 15d-PGJ2 es un ligando de alta afinidad del receptor activado por el inductor de la proliferación de peroxisomas (PPAR) de subtipo PPAR γ , un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que se ha implicado en un amplio intervalo de funciones celulares, incluyendo acciones antiinflamatorias, neuroprotectoras, cardioprotectoras, metabólicas y antitumorales. Se ha descubierto ahora que los agentes tales como 7 β -OH-EPIA, que pueden facilitar selectivamente la producción de 15d-PGJ2, podrían así ser beneficiosos en trastornos de inflamación y cutáneos tales como enfermedad intestinal inflamatoria y psoriasis y en trastornos neurológicos, cardiovasculares y metabólicos tales como apoplejía, lesión de médula espinal, lesión cerebral traumática, EA, EP, enfermedad cardiaca coronaria y diabetes de tipo 2, en que la inflamación contribuye a la disfunción y la muerte celulares, y en diversos tipos de cáncer en que la producción aumentada de PGE2 contribuye a la proliferación celular y el crecimiento tumoral.

40 Por tanto, en un aspecto, la presente invención consiste en el uso de un agente que potencia la producción de la 15-desoxiprostaglandina J2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de afecciones mediadas por niveles potenciados de la prostaglandina E2 u otros metabolitos de la actividad ciclooxigenasa y prostaglandina sintasa o para el tratamiento o la profilaxis de afecciones empeoradas debido a un nivel reducido o una disponibilidad reducida de 15-desoxiprostaglandina J2 como se especifica en las reivindicaciones.

45 En un aspecto adicional, la presente invención consiste en el uso de un agente que facilita la producción de 15-desoxiprostaglandina J2 e inhibe selectivamente la producción de prostaglandina E2 en presencia de un agente causante de inflamación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de afecciones mediadas por niveles potenciados de prostaglandina E2 u otros metabolitos de ciclooxigenasa 2, o para el tratamiento o la profilaxis de afecciones empeoradas debido a un nivel reducido o disponibilidad reducida de 15-desoxiprostaglandina J2 como se especifica en las reivindicaciones.

En un aspecto adicional más, la presente invención consiste en el uso de un agente que potencia la producción de 15-desoxiprostaglandina J2 y a su vez activa la PPAR γ para la fabricación de un medicamento para tratar una afección que requiera la activación de PPAR γ como se especifica en las reivindicaciones.

5 Los compuestos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento y la profilaxis de: enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), por ejemplo bronquitis crónica.

Otras afecciones inflamatorias que pueden tratarse mediante estos agentes incluyen enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias tales como asma, rinitis, bronquitis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

10 La invención se ilustra por los dibujos adjuntos en que, y de aquí en adelante, 7 β -hidroxiepiandrosterona se designa de aquí en adelante como 7 β -OH EPIA. En los dibujos:

la Figura 1 muestra los datos combinados de porcentaje medio de muerte celular a partir de 4 experimentos separados en el ejemplo 1, con los datos expresados como media \pm EEM;

la Figura 2 muestra el porcentaje medio de muerte celular en experimentos separados reseñados en el ejemplo 1;

la Figura 3 muestra el porcentaje medio de muerte celular en experimentos separados reseñados en el ejemplo 1;

15 la Figure 4 muestra el porcentaje medio de muerte celular en experimentos separados reseñados en el ejemplo 1;

las Figuras 5(a) y 5(b) muestran el efecto de concentraciones crecientes de 7 β -OH-EPIA sobre los niveles de PGD2 detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares de sangre periférica incubadas con 7 β -OH-EPIA, en presencia y ausencia de TNF α , como se reseña en el ejemplo 2;

20 las Figuras 6(a) y 6(b) muestran el efecto de concentraciones crecientes de 7 β -OH-EPIA sobre los niveles de PGE2 detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares de sangre periférica incubadas con 7 β -OH-EPIA, en presencia y ausencia de TNF α , como se reseña en el ejemplo 2;

las Figuras 7(a) y 7(b) muestran el efecto de concentraciones crecientes de 7 β -OH-EPIA sobre los niveles de 15d-PGJ2 detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares de sangre periférica incubadas con 7 β -OH-EPIA, en presencia y ausencia de TNF α , como se reseña en el ejemplo 1;

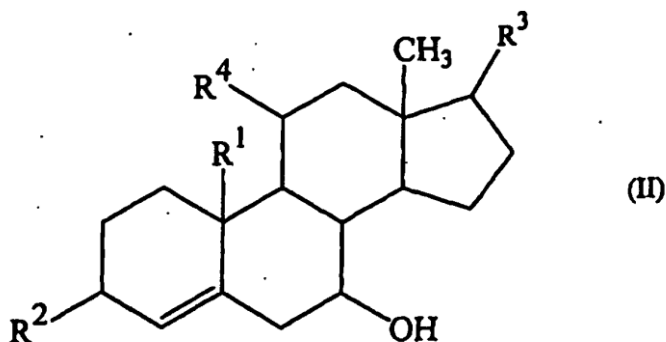
25 la Figura 8 muestra los efectos del tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA sobre (A) mieloperoxidasa (MPO) y marcadores de estrés oxidativo, a saber, (B) Prot CO, (C) Tbars y (D) el marcador antioxidante GSH en tejido colónico, como se describe con más detalle en el ejemplo 4;

la Figura 9 muestra el nivel de 15d-PGJ2 (A) colónico y la cuantificación de la expresión relativa de ARNm de COX-2, mPGES-1 y H-PGDS (B) en diversos momentos durante el tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA en el ejemplo 4;

30 la Figura 10 muestra el efecto de 7 β -hidroxi-EPIA sobre la síntesis colónica de prostaglandina E2, D2 y 15d-PGJ2 durante la administración de DSS en el ejemplo 4;

la Figura 11 muestra la expresión colónica de ARNm de COX-2, mPGES-1 y H-PGDS durante la inducción de colitis en el ejemplo 4.

Los compuestos que pueden usarse en la presente invención incluyen aquellos compuestos de fórmula (II):



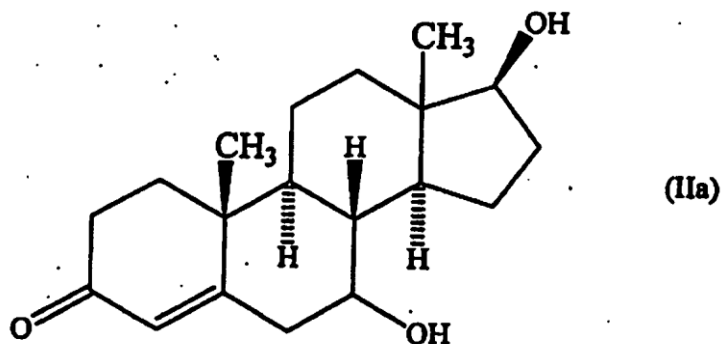
35

en la que:

R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo; y

R^2 , R^3 y R^4 son iguales o diferentes entre sí y cada uno representa un grupo oxo, un grupo hidroxilo, un grupo mercapto, un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo o un grupo acilo; y una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los ejemplos de compuestos de fórmula (II) incluyen 7-hidroxitestosterona, que tiene la fórmula (IIa):



5

y ésteres del mismo. El grupo 7-hidroxilo de este compuesto puede estar en configuración α o β , o puede usarse una mezcla de los dos isómeros.

En los compuestos de la presente invención, cuando R^2 representa un átomo de halógeno, este puede ser un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente un átomo de cloro.

10 Cuando R^2 representa un grupo alcoxilo, este puede ser un grupo de cadena lineal o ramificada, preferiblemente que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de dichos grupos incluyen los grupos metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, *sec*-butoxilo, isobutoxilo, *terc*-butoxilo, pentiloxilo y hexiloxilo.

Cuando R^2 representa un grupo ariloxilo, este es preferiblemente un grupo fenoxilo o naftiloxilo.

15 Cuando R^2 representa un grupo acilo, este puede ser, por ejemplo, un grupo acilo alifático o un grupo acilo aromático. Los ejemplos de grupos acilo alifáticos incluyen grupos que tienen de 1 a 6 átomos de carbono tales como los grupos formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, isovalerilo, pivaloilo y hexanoilo. Los ejemplos de grupos acilo aromáticos incluyen los grupos benzoilo, naftoilo y toluoilo.

20 Se apreciará que, cuando el compuesto contiene un grupo de fórmula $-OR$, en que R es cualquiera de los grupos y átomos definidos anteriormente con relación a R^2 , etc., es probable que la especie activa sea el compuesto que contiene el grupo hidroxilo libre. En consecuencia, puede usarse cualquier grupo que pueda convertirse *in vivo* en un grupo hidroxilo en lugar del grupo hidroxilo.

Estos compuestos pueden prepararse mediante una variedad de procesos, bien conocidos por sí mismos, partiendo de los esteroides originales. Por ejemplo, pueden prepararse mediante los métodos descritos en el documento EP 1294382.

25 Los compuestos de fórmula (I) se dan a conocer en los documentos EP 1294382, W02002/000224 y W02002/000225 para uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o afecciones neurodegenerativas crónicas y agudas y en el documento W02002/015791 para uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o afecciones cardiodegenerativas crónicas y agudas y, por supuesto, dicho tratamiento o profilaxis está excluido de las presentes reivindicaciones.

30 Cuando los compuestos de la presente invención contienen un grupo carboxilo, los compuestos de la invención pueden formar ésteres, que pueden prepararse mediante técnicas de esterificación convencionales. No hay restricciones particulares sobre la naturaleza del éster, a condición de que cuando el compuesto resultante se vaya a usar médicamente, el compuesto sea farmacéuticamente aceptable, es decir, que no sea menos activo o inaceptablemente menos activo, ni más tóxico o inaceptablemente más tóxico, que el compuesto original. Sin embargo, cuando el compuesto se va a usar para usos no médicos, por ejemplo, como intermedio en la preparación de otros compuestos, incluso esta restricción no se aplica, y no hay por tanto restricciones sobre la naturaleza de los ésteres que pueden formarse.

Los ejemplos de grupos éster incluyen:

40 grupos alquilo que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 10 átomos de carbono, tales como los ejemplificados con relación a R^7 , R^9 , R^{11} o R^{12} y grupos alquilo superiores como son bien conocidos en la materia, tales como los grupos dodecilo, tridecilo, pentadecilo, octadecilo, nonadecilo e eicosilo;

grupos cicloalquilo que tienen de 3 a 7 átomos de carbono, por ejemplo, los grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo;

5 grupos aralquilo en que la parte alquilo tiene de 1 a 3 átomos de carbono y la parte arilo es un grupo carbocíclico aromático que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, que pueden estar sustituidos o no sustituidos; los ejemplos de dichos grupos aralquilo incluyen los grupos bencilo, fenetilo, 1-feniletilo, 3-fenilpropilo, 2-fenilpropilo, 1-naftilmetilo, 2-naftilmetilo, 2-(1-naftil)etilo, 2-(2-naftil)etilo, benzhidrido (concretamente, difenilmetilo), trifenilmetilo, bis(o-nitrofenil)metilo, 9-antrilmetilo, 2,4,6-trimetilbencilo, 4-bromobencilo, 2-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, 3-nitrobencilo, 4-metoxibencilo y piperonilo;

10 grupos alquenoilo que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, tales como los grupos vinilo, alilo, 2-metilalilo y 1-propenilo;

grupos alquilo halogenados que tienen de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono, tales como 2,2,2-tricloroetilo, 2-haloetilo (por ejemplo, 2-cloroetilo, 2-fluoroetilo, 2-bromoetilo o 2-yodoetilo), 2,2-dibromoetilo y 2,2,2-tribromoetilo;

15 grupos sililalquilo sustituidos, por ejemplo, grupos 2-trialquil C₁-C₄-sililetilo, especialmente un grupo 2-trimetilsililetilo;

grupos fenilo sustituidos y no sustituidos, por ejemplo los grupos fenilo, toliilo y benzamidofenilo;

grupos fenacilo sustituidos y no sustituidos, por ejemplo, el grupo fenacilo mismo o el grupo p-bromofenacilo;

grupos terpenilo cíclicos y acíclicos, por ejemplo, los grupos geranilo, nerilo, linalilo, fitilo, metilo (especialmente m y p-mentilo), tujilo, carilo, pinanilo, bornilo, norcarilo, norpinanilo, norbornilo, mentenilo, canfenilo y norbornenilo;

20 grupos alcoximetilo en que la parte alcoxilo tiene de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono y puede estar sustituida a su vez por un solo grupo alcoxilo no sustituido, tales como los grupos metoximetilo, etoximetilo, propoximetilo, isopropoximetilo, butoximetilo y metoxietoximetilo;

25 grupos aciloxialquilo alifáticos en que el grupo acilo es preferiblemente un grupo alcanóilo y es más preferiblemente un grupo alcanóilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, y la parte alquilo tiene de 1 a 6, y preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono tales como los grupos acetoximetilo, propioniloximetilo, butiriloximetilo, isobutiriloximetilo, pivaloiloximetilo, 1-pivaloiloxietilo, 1-acetoxietilo, 1-isobutiriloxietilo, 1-pivaloiloxipropilo, 2-metil-1-pivaloiloxipropilo, 2-pivaloiloxipropilo, 1-isobutiriloxietilo, 1-isobutiriloxipropilo, 1-acetoxipropilo, 1-acetoxi-2-metilpropilo, 1-propioniloxietilo, 1-propioniloxipropilo, 2-acetoxipropilo y 1-butililoxietilo;

30 grupos aciloxialquilo alifáticos sustituidos con cicloalquilo en que el grupo acilo es preferiblemente un grupo alcanóilo y es más preferiblemente un grupo alcanóilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, el sustituyente cicloalquilo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y la parte alquilo tiene de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono, tales como los grupos ciclohexilacetoximetilo, 1-(ciclohexilacetoxi)etilo, 1-(ciclohexilacetoxi)propilo, 2-metil-1-(ciclohexilacetoxi)propilo, ciclopentilacetoximetilo, 1-(ciclopentilacetoxi)etilo, 1-(ciclopentilacetoxi)propilo y 2-metil-1-(ciclopentilacetoxi)propilo;

35 grupos alcoxicarboniloxialquilo, especialmente grupos 1-(alcoxicarboniloxi)etilo tales como los grupos 1-metoxicarboniloxietilo, 1-etoxicarboniloxietilo, 1-propoxicarboniloxietilo, 1-isopropoxicarboniloxietilo, 1-butoxicarboniloxietilo, 1-isobutoxicarboniloxietilo, 1-sec-butoxicarboniloxietilo, 1-terc-butoxicarboniloxietilo, 1-(1-etilpropoxicarboniloxi)etilo y 1-(1,1-dipropilbutoxicarboniloxi)etilo, y otros grupos alcoxicarbonilalquilo en que ambos grupos alcoxilo y alquilo tienen de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono, tales como los grupos 2-metil-1-(isopropoxicarboniloxi)propilo, 2-(isopropoxicarboniloxi)propilo, isopropoxicarboniloximetilo, terc-butoxicarboniloximetilo, metoxicarboniloximetilo y etoxicarboniloximetilo;

45 grupos cicloalquilcarboniloxialquilo y cicloalquilocarboniloxialquilo, por ejemplo, los grupos 1-metilciclohexilcarboniloximetilo, 1-metilciclohexiloxicarboniloximetilo, ciclopentiloxicarboniloximetilo, ciclopentilcarboniloximetilo, 1-(ciclohexiloxicarboniloxi)etilo, 1-(ciclohexilcarboniloxi)etilo, 1-(ciclopentiloxicarboniloxi)etilo, 1-(ciclopentilcarboniloxi)etilo, 1-(cicloheptiloxicarboniloxi)etilo, 1-(cicloheptilcarboniloxi)etilo, 1-metilciclopentilcarboniloximetilo, 1-metilciclopentiloxicarboniloximetilo, 2-metil-1-(1-metilciclohexilcarboniloxi)propilo, 1-(1-metilciclohexilcarboniloxi)propilo, 2-(1-metilciclohexilcarboniloxi)propilo, 1-(ciclohexilcarboniloxi)propilo, 2-(ciclohexilcarboniloxi)propilo, 2-metil-1-(1-metilciclopentilcarboniloxi)propilo, 1-(1-metilciclopentilcarboniloxi)propilo, 2-(1-metilciclopentilcarboniloxi)propilo, 1-(ciclopentilcarboniloxi)propilo, 2-(ciclopentilcarboniloxi)propilo, 1-(1-metilciclopentilcarboniloxi)etilo, 1-(1-metilciclopentilcarboniloxi)propilo, adamantiloxicarboniloximetilo, adamantilcarboniloximetilo, 1-adamantiloxicarboniloxietilo y 1-adamantilcarboniloxietilo;

grupos cicloalquilalcoxicarboniloxialquilo, por ejemplo, los grupos ciclopropilmetoxicarboniloximetilo, ciclobutilmetoxicarboniloximetilo, ciclopentilmetoxicarboniloximetilo, ciclohexilmetoxicarboniloximetilo, 1-

(ciclopropilmetoxicarbonilo)etilo, 1-(ciclobutilmetoxicarbonilo)etilo, 1-(ciclopentilmetoxicarbonilo)etilo y 1-(ciclohexilmetoxicarbonilo)etilo;

grupos terpenilcarboniloxialquilo y terpeniloxicarboniloxialquilo, por ejemplo, los grupos 1-(mentiloxicarbonilo)etilo, 1-(mentilcarbonilo)etilo, mentiloxicarboniloximetilo, mentilcarboniloximetilo, 1-(3-pinaniloxicarbonilo)etilo, 1-(3-pinanilcarbonilo)etilo, 3-pinaniloxicarboniloximetilo y 3-pinanilcarboniloximetilo;

grupos 5-alkuil- o 5-fenil-(2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)alquilo, por ejemplo, los grupos (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, (5-isopropil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, (5-*terc*-butil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo y 1-(5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)etilo; y

otros grupos, especialmente grupos que se retiran fácilmente *in vivo* tales como los grupos ftalidilo, indanilo y 2-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzodioxolen-4-ilo.

También, si los compuestos de la presente invención contienen un grupo carboxilo, pueden convertirse en sales con una base mediante métodos convencionales. No hay restricciones particulares sobre la naturaleza de dichas sales, a condición de que cuando los compuestos se vayan a usar médicamente, los compuestos sean farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, cuando el compuesto se vaya a usar para usos no médicos, por ejemplo como intermedio en la preparación de otros compuestos, incluso esta restricción no se aplica, y no hay entonces restricciones sobre la naturaleza de las sales que pueden formarse. Los ejemplos de dichas sales incluyen: sales con un metal alcalino tal como sodio, potasio o litio; sales con un metal alcalinotérreo tal como bario o calcio; sales con otro metal tal como magnesio o aluminio; sales de amonio; sales de bases orgánicas tales como una sal con metilamina, dimetilamina, trietilamina, diisopropilamina, ciclohexilamina o dicitlohexilamina; y sales con un aminoácido básico tal como lisina o arginina. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la presente invención pueden convertirse también en sales con ácidos mediante métodos convencionales. No hay restricciones particulares sobre la naturaleza de dichas sales, a condición de que cuando los compuestos se vayan a usar médicamente, los compuestos sean farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, cuando el compuesto se vaya a usar para usos no médicos, por ejemplo como intermedio en la preparación de otros compuestos, incluso esta restricción no se aplica, y no hay entonces restricciones sobre la naturaleza de las sales que pueden formarse. Los ejemplos de dichas sales incluyen: sales con ácidos minerales, especialmente ácidos hidrohálidos (tales como ácido fluorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico o ácido clorhídrico), ácido nítrico, ácido perclórico, ácido carbónico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; sales con ácidos alquilsulfónicos inferiores tales como ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico o ácido etanosulfónico; sales con ácidos arilsulfónicos tales como ácido bencenosulfónico o ácido p-toluenosulfónico; sales con ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido málico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido glucónico o ácido cítrico; y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o la profilaxis de una variedad de enfermedades o afecciones crónicas y agudas como se especifica en las reivindicaciones y, con estos fines, pueden formularse como preparaciones farmacéuticas convencionales, como es bien conocido en la materia. Por tanto, los compuestos pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes, pulverizadores u otras de dichas formas bien conocidas, o por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyecciones, pulverizadores, gotas oculares, emplastos adhesivos o supositorios, etc.

Estas preparaciones farmacéuticas pueden prepararse mediante medios convencionales y pueden contener coadyuvantes conocidos de un tipo usado habitualmente en este campo, por ejemplo, vehículos, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, estabilizantes, correctores, etc., dependiendo del uso pretendido y de la forma de preparación. La dosis dependerá de la condición, edad y peso corporal del paciente, así como de la naturaleza y gravedad del trastorno a tratar, pero en el caso de administración oral a un paciente humano adulto, se sugeriría normalmente una dosis diaria total de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal (más preferiblemente de 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal), que puede administrarse en una sola dosis o en dosis divididas, por ejemplo, de una a tres veces al día.

En general, los compuestos de la presente invención pueden usarse para el tratamiento o la profilaxis de una variedad de afecciones inflamatorias, o afecciones que surgen de rutas metabólicas, que conducen a la inflamación, como se especifica en las reivindicaciones.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 (referencia)

Efectos protectores de 7 β -hidroxiepandrosterona contra la isquemia en células PC-12: inhibición por el inhibidor de ciclooxigenasa (COX) indometacina

El fin de este ejemplo era investigar si la 7 β -OH-EPIA mantiene su eficacia neuroprotectora en un modelo de hipoxia cuando la síntesis de prostaglandina se atenúa con indometacina. El sistema experimental principal usado fue la

citotoxicidad inducida por isquemia en células PC-12. El criterio de valoración experimental medido fue la muerte celular.

La muerte celular de PC-12 inducida por isquemia se redujo consistentemente por 7 β -OH-EPIA. La indometacina (10 μ M), que bloquea la síntesis de prostaglandina, no tenía un efecto directo sobre la muerte celular inducida por isquemia, pero antagonizaba totalmente los efectos neuroprotectores de 7 β -OH-EPIA 1 μ M y 10 μ M, apoyando la hipótesis de que la síntesis de prostaglandina es necesaria para el efecto neuroprotector de 7 β -hidroxi-EPIA.

Metodología

Cultivo de células PC-12

Se mantuvieron las células PC-12 en matraces recubiertos con colágeno de tipo 1 en medios PC-12 con la siguiente composición: RPMI 1640 sin L-glutamina con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM y glucosa adicional para dar una concentración final de 4,5 g/l (RPMI tiene normalmente 2 g/l), suero equino termoinactivado al 10%, suero fetal bovino al 5% y 50 unidades de penicilina/estreptomina. Se cambiaron los medios cada 2 días.

Ensayos de células PC-12

Se diferenciaron cultivos confluentes de células PC-12 cultivando durante 7 días en medio PC-12 sin suero pero con NGF 50 ng/ml (medio PC-12 NGF). Se recogieron las células, se lavaron, se contaron y se sembraron 1 x 10⁵ células PC-12/pocillo durante una noche en una placa de microvaloración en medio PC-12 NGF exento de glucosa. Se cambió entonces el medio a medio PC-12 NGF exento de glucosa que contenía los compuestos a ensayar y se dejaron las placas en condiciones normóxicas durante 30 minutos.

Durante esta etapa, se dispusieron los medios y sustancias de ensayo en una cámara para exposición anóxica y se desoxigenaron con 95% de N₂/5% de CO₂. Se cambiaron los medios en las placas por medios desoxigenados y se dispusieron entonces las placas en una cámara anaeróbica gasificada con 95% de N₂/5% de CO₂ durante 10 minutos, antes de sellar e incubar a 37°C durante una noche (18 horas). Para los controles normóxicos, se trataron las células idénticamente a los tratamientos isquémicos, excepto porque todas las incubaciones fueron en 5% de CO₂/95% de aire.

Se determinó la viabilidad usando exclusión con azul de tripano.

Resultados

Las células PC-12 eran relativamente resistentes a la hipoxia. Debido a esto, se usó un protocolo de privación combinada de oxígeno y glucosa más riguroso (isquemia) para iniciar la toxicidad (Figura 1). La 7 β -OH-EPIA era citoprotectora dependientemente de la dosis en este ensayo, observándose una neuroprotección significativa a 1 μ M (26% de reducción de la muerte celular) y 10 μ M (53% de reducción de la muerte celular). La Figura 1 presenta los datos combinados de 4 experimentos que muestran este efecto. La Figura 1 muestra el porcentaje medio de muerte celular a partir de los datos combinados de 4 experimentos separados. Los datos se expresan como media \pm EEM. Se observó 76 \pm 2,2% de muerte celular solo con isquemia. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la muerte celular con 7 β -OH-EPIA 1 μ M (26% de reducción de la muerte celular, p<0,001), 7 β -OH-EPIA 10 μ M (53% de reducción de la muerte celular, p<0,001), ***=p<0,001 frente a solo isquemia.

El antagonista de receptor de NMDA MK-801 reducía también la toxicidad inducida por isquemia de células PC-12 (Figura 2). El inhibidor de ciclooxigenasa indometacina tenía un efecto protector moderado a 100 μ M (29% de reducción de la muerte celular), pero no a concentraciones menores (Figura 2). La Figura 2 muestra el porcentaje medio de muerte celular. Los datos se expresan como media \pm EEM. Se observó un 79 \pm 5,3% de muerte celular solo con isquemia. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la muerte celular con indometacina (IM) 100 μ M (29% de reducción de la muerte celular, p<0,05) y MK-801 10 μ M (62% de reducción de la muerte celular, p<0,001), **= p<0,01, ***=p<0,001 frente a solo isquemia.

El efecto neuroprotector de 7 β -OH-EPIA se antagonizaba totalmente por indometacina (IM) 10-100 μ M (Figura 3), siendo la toxicidad en estos cultivos indistinguible de los cultivos expuestos a solo isquemia. La Figura 3 muestra el porcentaje medio de muerte celular. Los datos se expresan como media \pm EEM. Se observó una muerte celular de 76 \pm 4,2% con solo isquemia. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la muerte celular con 7 β -OH-EPIA 10 μ M (50% de reducción de la muerte celular, p<0,001), MK-801 10 μ M (42% de reducción de la muerte celular, p<0,001), ***=p<0,001 frente a solo isquemia.

Como se observa en la Figura 4, la indometacina 10 μ M antagonizaba totalmente el efecto protector tanto de 7 β -OH-EPIA 1 μ M como 10 μ M. La Figura 4 muestra el porcentaje medio de muerte celular. Los datos se expresan como media \pm EEM. Se observó una muerte celular de 76 \pm 4,8% solo con isquemia. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la muerte celular con 7 β -OH-EPIA 1 μ M (25% de reducción de la muerte celular, p<0,05), 7 β -OH-EPIA 10 μ M (50% de reducción de la muerte celular, p<0,001), *= p<0,05, ***=p<0,001 frente a solo isquemia.

Conclusiones

5 La muerte de células PC-12 inducida por isquemia se reducía consistentemente con 7 β -OH-EPIA. La indometacina, que bloquea la síntesis de prostaglandina, no influía directamente en la muerte de células PC-12 a concentraciones de hasta 10 μ M. Sin embargo, cuando la concentración aumentaba adicionalmente hasta 100 μ M, se observó un efecto neuroprotector moderado.

La indometacina (10 μ M) no tenía un efecto directo sobre la muerte celular inducida por isquemia, pero atenuaba significativamente el efecto neuroprotector de 7 β -OH-EPIA, apoyando la hipótesis de que la síntesis de prostaglandina es necesaria para el efecto neuroprotector de 7 β -OH-EPIA.

Ejemplo 2**10 Efecto de la 7 β -hidroxiepiandosterona sobre la producción de las prostaglandinas D2, E2 y 15-desoxi- Δ 12,14-J2 por células mononucleares humanas**

El fin de este ejemplo era evaluar si la 7 β -OH-EPIA podía inducir la biosíntesis de metabolitos específicos del ácido araquidónico en células monocíticas humanas, a saber prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2) y 15-desoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2).

15 Se expusieron células sanguíneas monocíticas a una serie de concentraciones de 7 β -OH-EPIA en ausencia o presencia de factor de necrosis tumoral α (TNF α), un estímulo proinflamatorio, y se midió la cantidad de PGD2, PGE2 y 15d-PGJ2 producida mediante inmunoensayo enzimático (EIA).

20 La 7 β -OH-EPIA (0,1 nM-1000 nM) inducía un aumento dependiente de la concentración de la producción de PGD2 a partir de células mononucleares de sangre periférica humana normal. El TNF α aumentaba la producción de PGD2 en comparación con el control y esto se potenciaba a la concentración máxima de 7 β -OH-EPIA. La 7 β -OH-EPIA (1 nM-1000 nM) parecía no tener un efecto significativo sobre la biosíntesis de PGE2 en células mononucleares de sangre periférica humana normal, pero suprimía completamente los aumentos inducidos por TNF α de la producción de PGE2. Se encontró que la 7 β -OH-EPIA (0,1 nM-1000 nM) aumentaba la producción de 15d-PGJ2 en células mononucleares de sangre periférica humana normal aproximadamente 9-12 veces en ausencia de TNF α y 2-2,5 veces en presencia de TNF α , en comparación con sus respectivos controles.

Metodología***Células mononucleares de sangre periférica***

30 Se prepararon células mononucleares (monocitos y linfocitos) sometiendo 48 ml de sangre humana completa a una centrifugación por densidad de Ficoll/Hypaque. Se colocó la sangre encima del Ficoll (densidad = 1,077 g/ml) y se centrifugó a 400 g durante 1 hora (22°C), después de lo cual se retiraron las células de la interfase con pipeta y se transfirieron a tubos recientes. Se llenaron los tubos con medio de cultivo RPMI 1640 (2 volúmenes), se mezclaron concienzudamente y se centrifugaron entonces a 400 g durante 5 minutos (22°C). Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en medio de cultivo RPMI 1640 y se ajustó el volumen para dar el número apropiado de células por incubación, como se indica en la sección de resultados siguiente. Se incubaron las células en tubos de plástico estériles de 1,5 ml en un volumen final de 1 ml de medio RPMI 1640 durante 18 horas a 37°C, 5% de CO₂ en aire y 100% de humedad. Se añadió entonces 7 β -OH-EPIA, se incubaron las células durante una hora adicional a 37°C antes de añadir factor de necrosis tumoral α (TNF α) humano recombinante, y se continuaron las incubaciones durante 3 horas adicionales. Se preparó 7 β -OH-EPIA en dimetilsulfóxido (DMSO), todos los agentes restantes se prepararon en medio RPMI 1640. Los controles necesarios contenían medio o la misma concentración de DMSO, que era siempre < 0,1%v/v. Se terminaron las incubaciones centrifugando los tubos a 11.000 g durante 30 segundos a 22°C y transfiriendo los sobrenadantes a tubos de 1,5 ml recientes. Se procesaron entonces las muestras inmediatamente para estimación de PGD2 como se describe a continuación o se almacenaron a -20°C antes de la medida de PGE2 o 15d-PGJ2.

Inmunoensayos enzimáticos de prostaglandina (EIA)

45 Se determinó la producción de prostaglandina por células monocíticas humanas en respuesta a 7 β -OH-EPIA en ausencia o presencia de estimulación con TNF α midiendo los niveles extracelulares de eicosanoide usando kits de EIA disponibles comercialmente.

EIA de PGD2

50 La PGD2 no puede ensayarse directamente a partir de los sobrenadantes celulares porque es químicamente inestable y se degrada rápidamente hasta una serie de prostaglandinas de serie J, incluyendo PGJ2, Δ 12-PGJ2 y 15-desoxi- Δ 12,14-PGJ2. Para evitar este problema, se trató químicamente la PGD2 inestable para dar un derivado estable, en este caso la prostaglandina D2-metoxamina (PGD2-MOX), que se almacenó para análisis posteriores. Inmediatamente después de terminar las incubaciones, se añadieron 100 μ l de sobrenadante de muestra a tubos de 1,5 ml que contenían 100 μ l de un reactivo oximante de metilo (hidrocloruro de metoxilamina (MOX-HCl) y acetato

de sodio disueltos en una disolución de etanol/agua 10:90 v/v). Se dispusieron entonces los tubos en baño de agua y se dejó proceder la reacción durante 30 minutos a 60°C. Al final de este periodo, se almacenaron muestras a -80°C. Se estimaron posteriormente los niveles de PGD2 usando el kit de EIA de prostaglandina D2-MOX de Cayman Chemical (nº de cat. 512011).

5 EIA de PGE2

Se estimaron los niveles extracelulares de PGE2 usando el kit de EIA de PGE2 paramétrico de R&D Systems según las instrucciones del fabricante para el protocolo de alta sensibilidad.

EIA de 15d-PG2

10 Se estimaron los niveles extracelulares de 15d-PGJ₂ usando el kit de EIA de prostaglandina 15-desoxi-Δ¹²,14-prostaglandina J2 correlacionado de Assay Designs (nº de cat. 900-023) según las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

15 Los resultados se expresan como la media ± de para n= 3 incubaciones. Se usó una prueba de t de Student de datos no emparejados para determinar la probabilidad (P) de que dos conjuntos de datos fueran diferentes entre sí. La diferencia se consideró significativa cuando P < 0,05. Se llevaron a cabo los cálculos estadísticos en un ordenador Apple Macintosh usando el paquete de software Statview de Abacus Concepts Inc.

Resultados

Efecto de la 7β-OH-EPIA sobre la producción de PGD2 por células mononucleares humanas

20 La Figura 5(a) muestra el efecto de concentraciones crecientes de 7β-OH-EPIA (0,1 nM-1000 nM) sobre los niveles de PGD2 detectados en sobrenadantes celulares de 1 x 10⁷ células mononucleares de sangre periférica/ml incubadas durante 4 horas con 7β-OH-EPIA. La 7β-OH-EPIA parecía inducir un aumento de la producción de PGD2 dependiente de la concentración, alcanzando un máximo a 7β-OH-EPIA 100 nM (PGD2 102 ± 24 pg/ml) que era significativamente mayor que el control (PG2 40 ± 13 pg/ml; P = 0,01).

25 La Figura 5(b) muestra los efectos de concentraciones crecientes de 7β-OH-EPIA (0,1 nM-1000 nM) sobre los niveles de PGD2 detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares incubadas en presencia de TNFα (0,5 µg/ml). El TNFα estimuló un aumento de 2,3 veces de PGD2 en comparación con el control de vehículo DMSO (P < 0,05). A concentraciones de 0,1 nM-100 nM, la 7β-OH-EPIA parecía no tener efecto sobre la biosíntesis de PGD2 inducida por TNFα. A la concentración máxima de 7β-OH-EPIA usada en este experimento (1000 nM), los niveles de PGD2 aumentaron a 164 ± 31 pg/ml (P = 0,03 en comparación con TNFα solo).

Efecto de la 7β-OH-EPIA sobre la producción de PGE2 por células mononucleares humanas

30 La Figura 6(a) muestra el efecto de concentraciones crecientes de 7β-OH-EPIA (1 nM-1000 nM) sobre los niveles de PGE2 detectados en los sobrenadantes celulares de 6 x 10⁵ células mononucleares de sangre periférica/ml incubadas durante 4 horas con 7β-OH-EPIA. La 7β-OH-EPIA parecía aumentar los niveles de PGE2 en comparación con los controles de DMSO, sin embargo, estos aumentos no eran diferentes de forma estadísticamente significativa.

35 La Figura 6(b) muestra los efectos de concentraciones crecientes de 7β-OH-EPIA (1 nM-1000 nM) sobre los niveles de PGE2 detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares incubadas en presencia de TNFα (10 ng/ml). El TNFα estimuló un aumento significativo de 1,97 veces de PGE2 en comparación con el control de DMSO (P = 0,001). A concentraciones de 1 nM-100nM, la 7β-OH-EPIA suprimió significativamente la biosíntesis de PGE2 inducida por TNFα desde 167 ± 6 pg/ml en respuesta a solo TNFα hasta 75 ± 25 pg/ml, 82 ± 23 pg/ml y 74 ± 40 12 pg/ml para 7β-OH-EPIA 1 nM, 10 nM y 100 nM respectivamente (todos los P < 0,02 en comparación con solo TNFα). A la concentración máxima de 7β-OH-EPIA usada en este experimento (1000 nM), no se observó efecto sobre la producción de PGE2 inducida por TNFα.

Efecto de la 7β-OH-EPIA sobre la producción de 15d-PGJ2 por células mononucleares humanas

45 La Figura 7(a) muestra el efecto de concentraciones crecientes de 7β-OH-EPIA (0,1 nM-1000 nM) sobre los niveles de 15d-PGJ₂ detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares incubadas durante 4 horas con 7β-OH-EPIA. La 7β-OH-EPIA aumentó significativamente los niveles de 15d-PGJ₂ aproximadamente 9-12 a todas las concentraciones usadas. Los niveles aumentaron desde 51 ± 6 pg/ml para los controles de DMSO hasta 506 ± 101 pg/ml, 539 ± 51 pg/ml, 520 ± 45 pg/ml, 450 ± 133 pg/ml y 590 ± 84 pg/ml para 7β-OH-EPIA 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM respectivamente (todos los P < 0,05 en comparación con los controles de DMSO).

50 La Figura 7(b) muestra el efecto de concentraciones crecientes de 7β-OH-EPIA (0,1 nM-1000 nM) sobre los niveles de 15d-PGJ₂ detectados en los sobrenadantes celulares de células mononucleares incubadas con TNFα (10 ng/ml). A la concentración de citocina usada en este experimento, el TNFα parecía estimular un pequeño aumento de 15d-PGJ₂, sin embargo, este no era significativamente diferente de los controles de DMSO. A todas las concentraciones

usadas, la 7 β -OH-EPIA aumentó los niveles de 15d-PGJ2 en presencia de TNF α . Los niveles de 15d-PGJ2 aumentaron desde 157 \pm 39 pg/ml en presencia de solo TNF α hasta 348 \pm 48 pg/ml, 334 \pm 24 pg/ml, 356 \pm 85 pg/ml, 406 \pm 30 pg/ml y 318 \pm 100 pg/ml en presencia de TNF α más 7 β -OH-EPIA 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM respectivamente (todos los P < 0,05 en comparación con solo TNF α).

5 **Ejemplo 3**

7 α -hidroxi-DHEA, 7 β -hidroxi-DHEA y 7 β -hidroxi-EPIA son metabolitos nativos de deshidroepiandrosterona (DHEA) y epiandrosterona (EPIA). Puesto que se ha reseñado que numerosos esteroides interfieren con los procesos inflamatorios e inmunitarios, el objetivo era ensayar los efectos de estos hidroxiesteroides sobre la producción de PG y la expresión de genes enzimáticos relacionados. Se cultivaron monocitos de sangre periférica humana (PBMC) durante 4 h y 24 horas en presencia de cada uno de los esteroides (1-100 nM), con y sin la adición de la citocina proinflamatoria TNF α (10 ng/ml). Se midieron los niveles de PGE2, PGD2 y 15-desoxi- Δ 12,14-PGJ2 (15d-PGJ2) en el medio de incubación y se valoró el contenido celular de ARNm de ciclooxigenasa (COX-2) y PGE sintasa (m-PGES1) mediante PCR-TI cuantitativa. La adición de TNF α dio como resultado una producción de PG elevada y niveles de ARNm de COX-2 y m-PGES1 aumentados. Entre los tres esteroides ensayados, solo la 7 β -hidroxi-EPIA redujo la expresión de COX-2 y m-PGES1 reduciendo notablemente la producción de PGE2 y aumentando la de 15d-PGJ2. Estos resultados indican que la 7 β -hidroxi-EPIA tiene efectos antiinflamatorios.

1.1. Preparación y cultivo de PBMC humanas

Se recogió sangre completa de donantes en bolsas suplementadas con EDTA en el Etablissement Français du Sang (Brest, Francia). Se aislaron las PBMC entonces de la sangre completa en condiciones estériles al cabo de 36 horas después de la recogida. Se llevó a cabo la centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll (Eurobio). Después de lavar con medio RPMI 1640 (Eurobio), se suspendieron las células en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino termoinactivado al 10% (Eurobio), glutamina 2 mM (D. Dutscher), 100 U de penicilina/ml (D. Dutscher) y 100 μ g de estreptomina/ml (D. Dutscher). Se seleccionaron los monocitos mediante adherencia plástica durante 1 h y se sembraron aproximadamente 10⁷ células en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos (3 ml de medio por pocillo). Se efectuaron todas las incubaciones en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂. Se recuperaron las células y se dispersaron en 2 ml de medio de incubación reciente suplementado con 7 β -hidroxi-EPIA, 7 β -hidroxi-DHEA o 7 α -hidroxi-DHEA (en 20 μ l de etanol) en presencia o ausencia de TNF α 0,01 μ g/ml (Sigma-Aldrich). Las incubaciones de control contenían 20 μ l de etanol pero no esteroide. Se recogieron los sobrenadantes después de incubaciones de 4 y 24 horas para la medida de sus contenidos de PG y se usaron las células para el posterior aislamiento de ARN. Un método de extracción de una etapa usando el reactivo Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) proporcionó el ARN total.

1.2. PCR por transcriptasa inversa inmediata

Se sintetizaron ADNc a partir de ARN tratado con ADNasa 1 TURBO (Ambion, Huntingdon, RU) usando el kit de sistema de síntesis de primera hebra Superscript (Invitrogen). Las mezclas de amplificación por PCR-TI (50 μ l) contenían 2,5x de disolución RealMaster Mix/20x SYBR (11,25 μ l) (Eppendorf, Le Pecq, Francia) y cebadores de codificación e inversos 200 nM. Se ejecutaron las reacciones en un RealPlex ep gradient S Mastercycler (Eppendorf). Las condiciones de ciclado fueron 10 minutos a 95°C y 45 ciclos a 95°C, 55°C y 68°C durante 15 segundos, 30 segundos y 30 segundos, respectivamente. Cada ensayo incluía una curva patrón de cuatro puntos de dilución en serie de ADNc de control. Se usó el gen doméstico HPRT1 para cuantificación. Todos los cebadores oligonucleotídicos (Tabla 2) se sintetizaron mediante Genecust/Distribio (Evry, Francia). Se monitorizó la especificidad del producto amplificado examinando la curva de fusión del producto y se confirmó mediante análisis por electroforesis en gel de agarosa.

1.3. Medidas de PG

Se usaron kits de EIA comercialmente disponibles para la determinación de los niveles de PGE2 (Oxford Biomedical Research, RU) y 15d-PGJ2 (Assay designs, Euromedex, Francia) en medios de cultivo. Se obtuvo la medida de los niveles de PGD2 usando el kit de EIA de prostaglandina D2-MOX (Cayman Chemical, Euromedex). En este caso, y antes del ensayo, se trataron inmediatamente las muestras recientes con el reactivo MOX-HCl, que convirtió PGD2 en PGD2-MOX, evitando así cualquier degradación química posterior.

1.4. Análisis estadístico de los datos

Se llevaron a cabo todos los ensayos por triplicado y se representaron los resultados como media \pm EEM. Se efectuó un análisis de varianza unidireccional seguido de pruebas de intervalo múltiple de Duncan para comparar las diferencias entre grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p<0,05.

2.1. Efectos de 7 α -hidroxi-DHEA

Se cultivaron PBMC humanos con y sin la adición de TNF α durante 4 o 24 horas. Se midieron los niveles de PGE2, PGD2 y 15d-PGJ2 en los medios de cultivo y se midió la producción de ARNm de genes relacionados (COX-2, m-PGES1) en la célula. Se muestran los datos obtenidos en la Tabla 2. La ausencia de TNF α y la suplementación con

tres concentraciones diferentes de 7 α -hidroxi-DHEA no causó cambios significativos en los niveles de PGE2, PGD2 y 15d-PGJ2 en cultivos durante 4 horas. Solo la 15d-PGJ2 mostró un aumento moderado después de 24 h de cultivo. La incubación con 7 α -hidroxi-DHEA aumentó significativamente los niveles de ARNm de m-PGES1 en cultivos después de 24 horas.

5 La presencia de TNF α causó el aumento esperado en los niveles de todas las PG después de 24 h. La incubación con 7 α -hidroxi-DHEA durante 4 h no cambió los niveles de PG a ninguna de las concentraciones ensayadas. En contraposición, los niveles de PGE2 y del par PGD2-15d-PGJ2 aumentaron y se redujeron significativamente respectivamente después de coincubación con 7 α -hidroxi-DHEA y TNF α durante 24 h, en comparación con solo TNF α . Además, la incubación con TNF α (concretamente, la activación inflamatoria) condujo a un marcado aumento de la producción de ARNm de COX-2 y m-PGES1. La coincubación con 7 α -hidroxi-DHEA no causó cambios consistentes en los niveles de ARNm en comparación con solo TNF α .

2.2. Efectos de 7 β -hidroxi-DHEA

15 Se cultivaron PBMC humanos con y sin la adición de TNF α durante 4 o 24 horas. Se midieron los niveles de PGE2, PGD2 y 15dPGJ2 en los medios de cultivo y se midió la producción de ARNm de genes relacionados (COX-2, m-PGES1) en la célula. Se muestran los datos obtenidos en la Tabla 3. La incubación con tres concentraciones de 7 β -hidroxi-DHEA durante 4 horas en ausencia de TNF α no causó cambios significativos en los niveles de PGE2, PGD2 y 15d-PGJ2 en el medio de cultivo. Sin embargo, los niveles de ARNm de PGD2 y 15d-PGJ2, así como de m-PGES1, aumentaron después de 24 horas de incubación con 7 β -hidroxi-DHEA en cultivo.

20 La presencia de TNF α causó el aumento esperado de todas las PG a las 24 h. La coincubación con 7 β -hidroxi-DHEA durante 4 horas no cambió adicionalmente los niveles de PG a ninguna de las concentraciones ensayadas. En contraposición, tanto los niveles de PGD2 como de 15d-PGJ2 se redujeron significativamente después de coincubación con 7 β -hidroxi-DHEA y TNF α durante 24 h, en comparación con solo TNF α . Además, la incubación con TNF α (concretamente, la activación inflamatoria) condujo a un marcado aumento de la producción de ARNm de COX-2 y m-PGES1. La coincubación con 7 β -hidroxi-DHEA no causó cambios consistentes en los niveles de ARNm en comparación con solo TNF α .

2.3. Efectos de 7 β -hidroxi-EPIA

30 Se cultivaron PBMC humanos con y sin la adición de TNF α durante 4 o 24 horas. Se midieron los niveles de PGE2, PGD2 y 15dPGJ2 en los medios de cultivo y se midió la producción de ARNm de los genes relacionados (COX-2, m-PGES1) en la célula. Se muestran los datos obtenidos en la Tabla 4. La incubación con tres concentraciones de 7 β -hidroxi-EPIA durante 4 horas en ausencia de TNF α no causó cambios significativos en los niveles de PGE2, PGD2 y 15d-PGJ2 en el medio de cultivo. Sin embargo, tanto PGD2 como 15d-PGJ2 aumentaron notablemente cuando se incubaron los cultivos celulares con 7 β -hidroxi-EPIA durante 24 h. La expresión de COX-2 no cambió detectablemente por el esteroide a las 4 o 24 horas, pero los niveles de ARNm de mPGES1 mostraron una reducción y un aumento significativos a las 4 horas y 24 horas, respectivamente.

35 La presencia de TNF α causó el aumento esperado de todas las PG a las 24 h. La coincubación con 7 β -hidroxi-EPIA durante 4 horas no cambió adicionalmente los niveles de PG a ninguna de las concentraciones ensayadas. En contraposición, a las 24 h, la dos dosis menores de 7 β -hidroxi-EPIA redujeron los niveles de PGD2 y aumentaron los de 15d-PGJ2, en comparación con solo TNF α . La incubación con TNF α (concretamente, activación inflamatoria) condujo también a un aumento marcado del ARNm de COX-2 y m-PGES1. Los aumentos en la producción de ARNm de COX-2 y m-PGES1 por TNF α se anularon cuando los cultivos celulares se incubaron con 7 β -hidroxi-EPIA 10 y 100 mM durante 24 horas.

En conjunto, estos resultados indican claramente que la 7 β -hidroxi-EPIA tiene sorprendentemente efectos antiinflamatorios.

45 **Tabla 2:** Efecto de tres dosis de 7 α -hidroxi-DHEA sobre los niveles de PG y la expresión génica en PBMC humanos cultivados con y sin TNF α . *producción de ARNm respecto a los controles; ^asignificativamente aumentada por encima de los controles (p<0,05); ^bsignificativamente reducida por debajo de los niveles de control (p<0,05). ^csignificativamente por encima de solo TNF α (p<0,05); ^dsignificativamente reducida pro debajo de solo TNF α (p<0,05).

Ensayo	Control		7 α -hidroxi-DHEA (1 nM)		7 α -hidroxi-DHEA (10 nM)		7 α -hidroxi-DHEA (100 nM)	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
PGE2 (ng/ml)	0,24 ± 0,012	0,21 ± 0,015	0,22 ± 0,006	0,23 ± 0,003	0,22 ± 0,006	0,30 ± 0,006	0,22 ± 0,005	0,25 ± 0,012

Ensayo	Control		7α-hidroxi-DHEA (1 nM)		7α-hidroxi-DHEA (10 nM)		7α-hidroxi-DHEA (100 nM)	
PGD2 (ng/mol)	0,15 ± 0,008	0,16 ± 0,019	0,17 ± 0,004	0,13 ± 0,001	0,18 ± 0,002	0,17 ± 0,003	0,17 ± 0,003	0,13 ± 0,002
15d-PGJ2 (ng/ml)	0,38 ± 0,015	0,40 ± 0,048	0,46 ± 0,004	0,51 ± 0,013 ^a	0,42 ± 0,010	0,59 ± 0,003 ^a	0,41 ± 0,004	0,58 ± 0,024 ^a
COX-2 (ARNm*)	1,00 ± 0,006	1,00 ± 0,003	0,56 ± 0,072 ^b	0,82 ± 0,27 ^b	0,94 ± 0,048	1,66 ± 0,408 ^a	1,10 ± 0,108	1,05 ± 0,214
mPGES1 (ARNm*)	1,00 ± 0,030	1,00 ± 0,019	0,76 ± 0,053	1,77 ± 0,324 ^a	0,94 ± 0,067	3,61 ± 0,662 ^a	0,71 ± 0,058	2,63 ± 0,475 ^b
Ensayo	TNFα (10 ng/ml)		7α-hidroxi-DHEA (1 nM) + TNFα (10 ng/ml)		7α-hidroxi-DHEA (10 nM) + TNFα (10 ng/ml)		7α-hidroxi-DHEA (100 nM) + TNFα (10 ng/ml)	
Duración del cultivo	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
PGE2 (ng/ml)	0,43 ± 0,018 ^a	1,26 ± 0,161 ^a	0,43 ± 0,003	1,53 ± 0,048 ^c	0,45 ± 0,012	1,75 ± 0,052 ^c	0,39 ± 0,009	1,40 ± 0,037 ^c
PGD2 (ng/mol)	0,20 ± 0,006	0,63 ± 0,029 ^a	0,20 ± 0,003	0,17 ± 0,01 ^d	0,17 ± 0,006	0,18 ± 0,008 ^d	0,18 ± 0,001	0,18 ± 0,004 ^d
15d-PGJ2 (ng/ml)	0,40 ± 0,013	1,10 ± 0,082 ^a	0,37 ± 0,020	0,63 ± 0,007 ^d	0,40 ± 0,004	0,71 ± 0,012 ^d	0,41 ± 0,021	0,51 ± 0,012 ^d
COX-2 (ARNm*)	4,49 ± 1,178 ^a	1,70 ± 0,347 ^a	4,72 ± 1,229 ^a	3,02 ± 0,594 ^a	3,70 ± 1,246 ^a	2,04 ± 0,631 ^a	3,30 ± 0,655 ^a	3,13 ± 1,218 ^a
mPGES1 (ARNm*)	1,57 ± 0,148 ^a	16,1 ± 3,82 ^a	0,87 ± 0,187	21,5 ± 6,66 ^a	0,76 ± 0,118	24,9 ± 10,30 ^a	0,62 ± 0,066	25,4 ± 6,96 ^a

Tabla 3: Efecto de tres dosis de 7β-hidroxi-DHEA sobre los niveles de PG y la expresión génica en PBMC humanos cultivados con y sin TNFα. *producción de ARNm respecto a los controles; ^asignificativamente aumentada por encima de los controles (p<0,05); ^bsignificativamente reducida por debajo de los niveles de control (p<0,05). ^csignificativamente por encima de solo TNF α (p<0,05); ^dsignificativamente reducida por debajo de solo TNFα (p<0,05).

5

Ensayo	Control		7β-hidroxi-DHEA (1 nM)		7β-hidroxi-DHEA (10 nM)		7β-hidroxi-DHEA (100 nM)	
Duración del cultivo	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
PGE2 (ng/ml)	0,24 ± 0,012	0,21 ± 0,015	0,22 ± 0,003	0,22 ± 0,003	0,22 ± 0,013	0,24 ± 0,002	0,22 ± 0,002	0,24 ± 0,004
PGD2 (ng/mol)	0,15 ± 0,008	0,16 ± 0,019	0,18 ± 0,002	0,21 ± 0,009 ^c	0,14 ± 0,001	0,24 ± 0,001 ^a	0,19 ± 0,008	0,34 ± 0,025 ^a
15d-PGJ2 (ng/ml)	0,38 ± 0,015	0,40 ± 0,048	0,45 ± 0,016	0,66 ± 0,013 ^a	0,40 ± 0,014	0,62 ± 0,008 ^a	0,42 ± 0,030	0,56 ± 0,020 ^a
COX-2 (ARNm*)	1,00 ± 0,006	1,00 ± 0,003	1,20 ± 0,179	1,76 ± 0,672	1,33 ± 0,039	1,54 ± 0,630	5,09 ± 1,166 ^a	2,78 ± 0,580 ^a
mPGES1 (ARNm*)	1,00 ± 0,030	1,00 ± 0,019	0,43 ± 0,057 ^b	1,94 ± 0,422 ^a	0,67 ± 0,071 ^b	1,64 ± 0,338 ^a	0,82 ± 0,085 ^b	1,64 ± 0,322 ^a

Ensayo	TNF α (10 ng/ml)		7 β -hidroxi-DHEA (1 nM) + TNF α (10 ng/ml)		7 β -hidroxi-DHEA (10 nM) + TNF α (10 ng/ml)		7 β -hidroxi-DHEA (100 nM) + TNF α (10 ng/ml)	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
PGE2 (ng/ml)	0,43 \pm 0,018 ^a	1,26 \pm 0,161 ^a	0,34 \pm 0,030	1,19 \pm 0,003 ^b	0,35 \pm 0,002	1,2 \pm 0,08 ^b	0,30 \pm 0,006	1,18 \pm 0,010 ^b
PGD2 (ng/mol)	0,20 \pm 0,006	0,63 \pm 0,029 ^a	0,16 \pm 0,006	0,47 \pm 0,011 ^c	0,21 \pm 0,007	0,42 \pm 0,006 ^c	0,16 \pm 0,012	0,40 \pm 0,041 ^c
15d-PGJ2 (ng/ml)	0,40 \pm 0,013	1,10 \pm 0,082 ^a	0,44 \pm 0,016	0,62 \pm 0,032 ^c	0,43 \pm 0,003	0,54 \pm 0,022 ^c	0,39 \pm 0,042	0,54 \pm 0,029 ^c
COX-2 (ARNm*)	4,49 \pm 1,178 ^a	1,70 \pm 0,347 ^a	4,81 \pm 1,280 ^a	1,65 \pm 0,331	2,67 \pm 0,229 ^a	2,52 \pm 0,580	3,23 \pm 0,242	3,07 \pm 1,117
mPGES1 (ARNm*)	1,57 \pm 0,148 ^a	16,1 \pm 3,82 ^a	0,60 \pm 0,050 ^d	29,2 \pm 5,19 ^a	1,01 \pm 0,098 ^d	16,3 \pm 3,80 ^a	0,78 \pm 0,055 ^d	14,0 \pm 4,91 ^a

Tabla 4: Efecto de tres dosis de 7 β -hidroxi-EPIA sobre los niveles de PG y la expresión génica en PBMC humanos cultivados con y sin TNF α . *producción de ARNm respecto a los controles; ^asignificativamente aumentada por encima de los controles (p<0,05); ^bsignificativamente reducida por debajo de los niveles de control (p<0,05). ^csignificativamente por encima de solo TNF α (p<0,05); ^dsignificativamente reducida por debajo de solo TNF α (p<0,05).

5

Ensayo	Control		7 β -hidroxi-EPIA (1 nM)		7 β -hidroxi-EPIA (10 nM)		7 β -hidroxi-EPIA (100 nM)	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
PGE2 (ng/ml)	0,24 \pm 0,012	0,21 \pm 0,015	0,26 \pm 0,011	0,26 \pm 0,015	0,23 \pm 0,022	0,23 \pm 0,021	0,22 \pm 0,020	0,24 \pm 0,022
PGD2 (ng/mol)	0,15 \pm 0,008	0,16 \pm 0,019	0,18 \pm 0,005	0,21 \pm 0,012 ^a	0,19 \pm 0,020	0,23 \pm 0,001 ^a	0,20 \pm 0,013	0,24 \pm 0,031 ^a
15d-PGJ2 (ng/ml)	0,38 \pm 0,015	0,40 \pm 0,048	0,39 \pm 0,080	0,85 \pm 0,014 ^a	0,39 \pm 0,010	0,91 \pm 0,032 ^a	0,37 \pm 0,018	1,70 \pm 0,016 ^a
COX-2 (ARNm*)	1,00 \pm 0,006	1,00 \pm 0,003	0,56 \pm 0,072 ^b	0,82 \pm 0,27 ^b	0,94 \pm 0,048	1,66 \pm 0,408	1,10 \pm 1,108	1,05 \pm 0,214
mPGES1 (ARNm*)	1,00 \pm 0,030	1,00 \pm 0,131	0,76 \pm 0,053 ^b	1,77 \pm 0,324 ^a	0,94 \pm 0,067	3,61 \pm 0,662 ^a	0,71 \pm 0,058 ^b	2,63 \pm 0,475 ^a
Ensayo	TNF α (10 ng/ml)		7 β -hidroxi-EPIA (1 nM) + TNF α (10 ng/ml)		7 β -hidroxi-EPIA (10 nM) + TNF α (10 ng/ml)		7 β -hidroxi-EPIA (100 nM) + TNF α (10 ng/ml)	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
PGE2 (ng/ml)	0,43 \pm 0,018 ^a	1,26 \pm 0,161 ^a	0,50 \pm 0,012	0,70 \pm 0,001 ^b	0,49 \pm 0,021	0,802 \pm 0,012 ^b	0,42 \pm 0,020	0,71 \pm 0,012 ^b
PGD2 (ng/mol)	0,20 \pm 0,006	0,63 \pm 0,029 ^a	0,22 \pm 0,082	0,47 \pm 0,013 ^d	0,22 \pm 0,010	0,42 \pm 0,009 ^d	0,23 \pm 0,007	0,40 \pm 0,030 ^d
15d-PGJ2 (ng/ml)	0,40 \pm 0,013	1,10 \pm 0,082 ^a	0,37 \pm 0,029	2,18 \pm 0,183 ^c	0,40 \pm 0,007	2,77 \pm 0,021 ^c	0,37 \pm 0,016	0,85 \pm 0,019
COX-2 (ARNm*)	4,49 \pm 1,178 ^a	1,70 \pm 0,347 ^a	7,39 \pm 0,282 ^c	2,74 \pm 0,555 ^c	2,75 \pm 0,147 ^d	0,94 \pm 0,194 ^d	5,76 \pm 0,660	0,67 \pm 1,132 ^c
mPGES1 (ARNm*)	1,57 \pm 0,148 ^a	16,1 \pm 3,82 ^a	1,11 \pm 0,235	21,6 \pm 4,28	1,15 \pm 0,183	6,29 \pm 1,31 ^d	1,29 \pm 0,323	6,19 \pm 2,898 ^c

Ejemplo 4 (referencia)**Efecto de la 7β-OH-EPIA sobre un modelo experimental de colitis**

La administración a ratas de dextranosulfato de sodio (DDS) en el agua de bebida durante 6 días consecutivos causa inflamación colónica (colitis) caracterizada por una reducción de la longitud del colon, una actividad de MPO aumentada, agotamiento del moco en las células caliciformes, expresión aumentada de COX-2 y mPEGS-1 sintasa y producción de prostaglandina E2 (PGE2). La administración de DDS aumenta también los marcadores de estrés oxidativo tales como la proteína carbonilo (Prot CO) y Tbars en el intestino. Se proporcionan ahora pruebas de que el tratamiento con 7β-hidroxi-EPIA una vez al día durante 7 días antes de la administración de DDS puede prevenir el desarrollo de colitis inducida por DDS. La administración de 7β-hidroxi-EPIA 0,01 mg/kg previno completamente el daño por colitis y la inflamación de tejido, y este efecto de la 7β-hidroxi-EPIA estaba asociado con una marcada reducción de los marcadores de estrés oxidativo y la producción de PGE2, asociado con un aumento temprano pero transitorio de la expresión de COX-2 y con un aumento mantenido de la producción de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ2. Estos resultados muestran que la 7β-hidroxi-EPIA tiene marcados efectos antiinflamatorios a niveles de dosis muy bajos en este modelo experimental aceptado de enfermedad intestinal inflamatoria (EII).

Procedimientos experimentales**Animales**

Todos los protocolos y procedimientos experimentales estaban de acuerdo con la directiva 86/609/CEE de la Comunidad Europea para uso de animales de laboratorio. Se alimentaron ratas Wistar macho (180-200 g) adquiridas en Charles River (L'Arbresle, Francia) con pienso de laboratorio para roedores y se les dio agua a voluntad.

Tratamiento con fármaco e inducción de colitis

Después de un periodo de adaptación de 7 días, se dividieron los animales en dos grupos de control (control ficticio y grupo de control tratado con 7β-hidroxi-EPIA) y dos grupos de colitis (colitis y colitis tratada con 7β-hidroxi-EPIA). Se administró por vía i.p. 7β-hidroxi-EPIA (0,01, 0,1 y 1 mg/kg de peso corporal disuelto en DMSO) o DMSO solo (vehículo) una vez al día durante 7 días, del día 0 al día 7. Se indujo la colitis del día 7 al 14 mediante la adición de DDS (peso molecular 36-50 kDa; MP Biomedicals, Francia) al agua de bebida. Los dos grupos de control recibieron solo agua corriente.

Valoración macroscópica del daño colónico

Los días 9, 11, 13 y 14, se registraron el peso corporal, longitud de colon y consistencia de las heces y se evaluó la hemorragia rectal reciente por inspección ocular. Se puntuó con anonimato la gravedad del daño colónico como se describe en Mabley et al., 2001, *Inflamm. Res.*; 50: 561-569: (0: bolitas bien formadas y sin daño colónico; 1: colon con una pequeña cantidad de sangre presente mezclada con heces; 2: colon con una gran cantidad de sangre presente con heces; 3: colon lleno de sangre y sin heces).

Examen histológico

Se fijó en formaldehído al 4% (Labonord, Templemars, Francia) una porción del colon proximal (1 cm) y se embebió en parafina. Se prepararon secciones de tejido (5 μm), después de ello se limpiaron, hidrataron y tiñeron con hematoxilina/eosina o con azul alciano según protocolos estándares para la evaluación histológica del daño colónico y el contenido de moco de las células caliciformes, respectivamente.

Preparación de homogeneizados de tejido

Se abrió el colon a lo largo del margen mesentérico y se rasparon las células epiteliales con el borde romo de un portaobjetos, entonces se pesaron, lavaron y centrifugaron. Se homogeneizó el sedimento en 9 volúmenes de tampón TKE (Tris-HCl 10 mM; KCl 150 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,25 mM, pH 7,4) y se congelaron entonces a -80°C hasta su uso posterior. Se midió el contenido de proteína de los homogeneizados según Lowry et al. (*J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-74).

Actividad de MPO

Se valoró la actividad de MPO en los homogeneizados usando el método de o-dianisidina de Krawisz et al. (*Gastroenterology* 1984; 87(6): 1344-50) con las modificaciones de Pelissier et al. (*Steroids* 2006; 71 (3): 240-8). Se expresó la actividad de MPO como la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio de absorbancia por minuto a 460 nm usando el coeficiente de extinción de o-dianisidina oxidada ($1,13 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Determinación bioquímica del estrés oxidativo

Se midió la peroxidación lipídica (Tbars) mediante la modificación de Albrecht et al., (1992, *Toxicol. Lett.*; 63: 91-96) del método descrito por Ohkawa et al. (*Anal. Biochem.* 1979; 95: 315-58). Se midió la absorbancia del aducto rojo

1:2 de malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, Francia) a 532 nm (coeficiente de extinción usado: $0,156 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se valoraron los contenidos de carbonilo en las proteínas oxidadas (Prot CO) mediante el método de Levine *et al.* (Methods Enzymol. 1990; 186: 464-78). El contenido de grupo sulfhidrido no proteico (mayoritariamente GSH) se tomó como marcador de defensa antioxidante en homogeneizados y se determinó mediante el método de Sedlak y Lindsay (Anal. Biochem. 1968; 25(1): 192-205).

Inmunoensayos de prostaglandina

Se usaron kits de EIA comercialmente disponibles para la determinación de los niveles de PGE2 (Oxford Biomedical Research, RU) y los niveles de 15d-PGJ2 (Assay designs, Euromedex, Francia) en sobrenadantes colónicos obtenidos a partir de homogeneizados recientes. Se obtuvo la medida de los niveles de PGD2 usando el kit de EIA de prostaglandina D2-MOX (Cayman Chemica, Euromedex). En este caso, y antes del ensayo, se trataron inmediatamente las muestras recientes con el reactivo MOX-HCl, que convertía PGD2 en PGD2-MOX, evitando así cualquier degradación química adicional.

PCR por transcriptasa inversa inmediata

Se extrajo el ARN total de muestras colónicas recientes (300 mg) usando el reactivo Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia). Se purificó ARN de poli(A) del ARN total con el kit MicroPoly(A)Purist (Ambion, Huntingdon, RU). Se sintetizó el ADNc usando el kit de sistema de síntesis de primera hebra Superscript (Invitrogen). Se efectuó una PCR inmediata usando mezclas (de 25 μl) que contenían 2,5x de disolución RealMaster MixJ20x SYBR (11,25 μl) (Eppendorf, Le Pecq, Francia) y cebadores de codificación e inversos 300 nM. Se ejecutaron las reacciones en un RealPlex ep gradient S mastercycler (Eppendorf). Las condiciones de ciclado eran de 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos a 95°C, 55°C y 68°C durante 15 segundos, 30 segundos y 30 segundos, respectivamente. Cada ensayo incluía una curva patrón de cuatro puntos de dilución en serie de ADNc de control. Se sintetizaron los cebadores oligonucleotídicos mediante Genecust/Distribio (Evry, Francia). Se monitorizó la especificidad del producto amplificado mediante examen de la curva de fusión del producto y se confirmó mediante análisis por electroforesis en gel de agarosa. Se expresaron los niveles de ARNm respecto a los del control de DMSO después de normalización con HPRT1.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo todos los ensayos por triplicado para cada animal y se representan los resultados como media \pm EEM. Se efectuó un análisis de varianza unidireccional seguido de pruebas de intervalo múltiple de Duncan para comparar las diferencias entre grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Estudio del desarrollo temporal de la inducción de colitis

El tratamiento de ratas con DSS al 5% en el agua de bebida durante 7 días (de D7 a D14) dio como resultado signos clínicos e histológicos de colitis sin mortalidad. Típicamente, todas las ratas exhibieron una diarrea grave 5 días después de la inducción de colitis (día 12) y apareció hemorragia rectal el día siguiente. Se registró una reducción del peso corporal, masa de tejido adiposo epididímico y peso del hígado el día 11 en todas las ratas tratadas con DSS en comparación con los controles ficticios (-5%, -17%, -8%; $p < 0,05$, respectivamente). Se observaron estas reducciones también el día 14 (Tabla 5). No se observó cambios en el peso del bazo. En comparación con el grupo de control ficticio, las ratas tratadas con DSS demostraron también un significativo acortamiento del colon desde el día 11 (14%, $p < 0,05$) hasta el día 14 (-26%; $p < 0,05$), véase la Tabla 5, asociado a un tejido colónico engrosado y una pérdida de heces fecales. Se midió la actividad de MPO en la mucosa colónica como índice de infiltración neutrofílica. El día 13 y 14, se observó un aumento de 9 y 7 veces de la actividad de MPO mucosa en el grupo de colitis en comparación con los controles ficticios ($p < 0,05$) (Fig. 8A). No se observó modificación de la actividad de MPO antes del día 13. Estos resultados son consistentes con el análisis histológico. Es más, resultaron evidentes los sellos distintivos de la inflamación colónica, a saber, distorsión críptica, infiltración neutrofílica en el tejido mucoso y pérdida de células caliciformes que contenían menos mucinas, en el grupo de colitis el día 13 y eran más pronunciados el día 14 en comparación con el grupo de control ficticio (datos no mostrados).

Como se muestra en la Fig. 8, los niveles de los dos marcadores de estrés oxidativo, a saber Prot CO y Tbars, y del parámetro de defensa antioxidante GSH aumentaron significativamente por encima de los niveles de control el día 13 y 14 en la mucosa colónica de animales con colitis.

Efecto protector de 7 β -hidroxi-EPIA sobre la colitis

La dos dosis bajas de 7 β -hidroxi-EPIA (0,01, 0,1 mg/kg) previnieron los daños colónicos inducidos por DSS como se indica por la supresión de la diarrea y hemorragia rectal el día 14. La inyección intraperitoneal de 7 β -hidroxi-EPIA 0,01 mg/kg una vez al día durante 7 días antes de la administración de DSS restauró el peso corporal a los niveles de control sin alterar el peso del epidídimo (Tabla 5). Entre el día 9 y el día 14, la reducción de la longitud del colon fue menos pronunciada en los grupos tratados con las dos dosis menores del esteroide (0,01, 0,1 mg/kg) que en el

grupo de colitis (datos no mostrados para el día 9, Tabla 5). La 7 β -hidroxi-EPIA previno el agotamiento de moco en las células caliciformes el día 14 y los cambios histológicos tales como anomalía de criptas e infiltración neutrofílica (datos no mostrados) y redujo significativamente la actividad de MPO a todos los niveles de dosis, 0,01, 0,1 y 1 mg/kg (Fig. 8A). Los niveles de los parámetros de estrés oxidativo (Prot CO, Tbars) y GSH fueron similares los días 9 (no mostrado) y 11 en todos los grupos, a saber, los grupos de control ficticio, colitis y colitis tratada con 7 β -hidroxi-EPIA (0,01, 0,1 y 1 mg/kg) (Fig. 8B, C y D). Todos los marcadores de estrés oxidativo y el marcador de defensa antioxidante permanecieron intactos en animales que se habían tratado con 7 β -hidroxi-EPIA (de D0-D7), mientras que estos parámetros aumentaron significativamente en el grupo de colitis ($p < 0,05$). Estos resultados muestran que la 7 β -hidroxi-EPIA tiene marcados efectos antiinflamatorios a niveles de dosis muy bajos en este modelo experimental de enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Tabla 5: Peso corporal y de órganos final, longitud de colon, valoración macroscópica de la puntuación del daño colónico en ratas con colitis inducida por DSS (DSS (al 5%) en agua corriente durante 7 días (día 7-día 14). Se obtuvieron los datos al final del experimento (día 14) y se expresan como media \pm EEM. Los valores que no comparten la misma letra del superíndice (a-c) en una línea son significativamente diferentes ($p < 0,05$). La puntuación del daño colónico fue según Mabley *et al.* (2001, *Inflamm. Res.*, 50, 561-569) (0: bolitas bien formadas sin daño colónico; 1: colon con una pequeña cantidad de sangre presente mezclada con heces; 2: colon con una gran cantidad de sangre presente con heces; 3: colon lleno de sangre y sin heces). * mg/kg de peso corporal

Grupo	Control	Colitis	Grupo de colitis pretratado con 7 β -hidroxi-EPIA		
	0	0	0,01*	0,1*	1*
Número de ratas (n)	15	23	3	12	12
Peso corporal (g)	304,6 \pm 6 ^a	279,6 \pm 6,5 ^b	297,5 \pm 9,5 ^a	272,1 \pm 6 ^b	267,3 \pm 7,7 ^b
Peso de epidídimo (g)	2,5 \pm 0,08 ^a	2,1 \pm 0,1 ^b	2,5 \pm 0,03 ^a	1,9 \pm 0,14 ^b	1,9 \pm 0,1 ^b
Peso de hígado (g)	12,7 \pm 0,4 ^a	11,1 \pm 0,3 ^b	12,1 \pm 0,3 ^a	12,3 \pm 0,6 ^a	11,9 \pm 0,4 ^a
Peso de bazo (g)	0,9 \pm 0,05 ^a	0,9 \pm 0,08 ^a	0,8 \pm 0,02 ^a	1,03 \pm 0,2 ^a	0,82 \pm 0,06 ^a
Longitud de colon (cm)	18,4 \pm 0,6 ^a	13,7 \pm 0,4 ^b	16 \pm 0,01 ^c	15,6 \pm 0,3 ^c	14,2 \pm 0,6 ^b

Producción de prostaglandina (PG) en tejido colónico: efectos de 7 β -hidroxi-EPIA

Los tratamientos con 7 β -hidroxi-EPIA no alteraron los niveles de PGE2 y PGD2 en tejido colónico de ratas de control sin colitis (datos no mostrados). En contraposición, la administración de 7 β -hidroxi-EPIA del día 0 al día 7 condujo a un aumento significativo por encima de los niveles basales de los niveles de 15d-PGJ2 del día 2 al día 14. La administración de 7 β -hidroxi-EPIA 0,1 mg/kg dio como resultado un aumento de 51 veces el día 2, que se redujo progresivamente del día 4 al día 14 (incrementos en el intervalo de 44 veces a 5 veces) (Fig. 9A, Fig. 10C).

La administración del agente inflamatorio DSS del día 7 al día 14 dio como resultado aumentos marcados de la producción de la prostaglandina proinflamatoria PGE2 el día 14, mientras que los niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ2 se redujeron drásticamente (Fig. 10).

El tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA 0,01 mg/kg del D0 al D7 previno completamente la producción inducida por DSS de PGE2 colónica el día, mientras que aumentó drásticamente el nivel de 15d-PGJ2 (Fig. 10).

Expresión de COX-2 y PG sintasa en los grupos ficticio y de colitis: efecto del pretratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA

Debido a que se observaron modificaciones significativas de los niveles de prostaglandina con la administración de DSS y los tratamientos con 7 β -hidroxi-EPIA, se ensayó si se alteraba la expresión de COX-2, mPGES-1 y H-PGDS por el pretratamiento con esteroide mediante la cuantificación del ARNm específico mediante PCR-TI inmediata. Se examinó la transcripción de estos genes y se relacionó con la del gen doméstico HPRT1. En ratas de control sin colitis, la administración de 7 β -hidroxi-EPIA 0,1 mg/kg indujo un aumento significativo de 1,5 veces de los niveles de ARNm de COX-2 a las 15 h, seguido de una reducción significativa el día 2 y el día 4, volviendo después de ello a los valores basales (Fig. 9B). La expresión de ARNm de mPGES-1 aumentó transitoriamente entre las 6 h y 15 h, volviendo hacia los valores basales el día 2. La síntesis de ARNm de H-PGDS permaneció intacta durante el transcurso del experimento.

Después de la inducción de colitis por DSS, se observó un aumento de 2,5 veces de la expresión de ARNm de COX-2 el día 13 y 14 (Fig. 11A), mientras que el ARNm de mPGES-1 aumentó significativamente solo el día 13 (Fig. 11B). La H-PGDS no se alteró por la administración de DSS.

El pretratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA (del día 0 al día 7) suprimió este aumento en la síntesis de ARNm tanto de COX como de mPGES por DSS (Fig. 11).

5 En conjunto, estos descubrimientos indican que los efectos antiinflamatorios de la 7 β -hidroxi-EPIA están mediados por una reducción de PGE2 y un aumento de la producción de 15d-PGJ2 simultáneos. El efecto duradero de la 7 β -hidroxi-EPIA sobre la producción de 15d-PGJ2 observado en este estudio sugiere que la 7 β -hidroxi-EPIA causa cambios sostenidos en la expresión de genes implicados en la inflamación y su resolución.

10 En los dibujos, la Figura 8 muestra los efectos del tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA sobre (A) mieloperoxidasa (MPO) y los marcadores de estrés oxidativo, a saber (B) Prot CO, (C) Tbars y (D) el marcador antioxidante GSH en tejido colónico. Los niveles de biomarcador muestran que las ratas tratadas con DSS diferían significativamente de los controles los días 13 y 14 ($p < 0,05$). La 7 β -hidroxi-EPIA redujo significativamente la actividad de MPO los días 13 y 14 en comparación con el grupo de colitis ($p < 0,05$) y restauró los parámetros de estrés oxidativo (B, C y D) a los niveles de control los días 13 y 14 a todos los niveles de dosis. Los valores son media \pm EEM (A) y se refieren al grupo ficticio (B, C y D) con 3-23 ratas por grupo. En las Figuras 8A a 8D, barras negras= control ficticio; barras blancas= grupos de DSS-colitis; barras grises oscuras = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 0,01 mg/kg; barras grises medias= DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 0,1 mg/kg y barras grises claras = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 1,0 mg/kg. Grupo de DSS-colitis frente al control ficticio ($p < 0,05$); grupos tratados con 7 β -hidroxi-EPIA frente al grupo DSS-colitis ($p < 0,05$).

15 La Figura 9 muestra el nivel colónico de 15d-PGJ2 (A) y la cuantificación de la expresión relativa de ARNm de COX-2, mPGES-1 y H-PGDS (B) en diversos momentos durante el tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA. Los valores son medias \pm EEM ($n = 3$ a 15) (A) y los ARNm se expresan respecto al del control ficticio, después de normalización con HPRT1 (B). En la Figura 9A, barra negra = grupo de control ficticio; barra gris oscura = 7 β -hidroxi-EPIA 0,01 mg/kg, barra gris media= 7 β -hidroxi-EPIA 0,1 mg/kg y barra gris clara = 7 β -hidroxi-EPIA 1,0 mg/kg. En la Figura 9B, barra gris oscura con puntos blancos= COX-2; barra gris clara con puntos negros = mPGES=1 y barra blanca con puntos negros = H-PGDS.

20 La Figura 10 muestra el efecto de la 7 β -hidroxi-EPIA sobre la síntesis colónica de prostaglandina E2, D2 y 15d-PGJ2 durante la administración de DSS. La administración de DSS aumentó significativamente la síntesis de PGE2 (A), D2 (B) y 15d-PGJ2 (C) ($p < 0,05$) los días 13 y 14 ($p < 0,05$). El tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA durante 7 días antes de la administración de DSS redujo la síntesis de PGE2 los días 13 y 14 (A), aumentando la producción de 15d-PGJ2 significativamente a todos los niveles de dosis (C). Los datos se expresan como media \pm EEM con $n = 3$ a 23. En las Figuras 10A a 10C, barra negra = control ficticio; barra blanca = grupo de DSS-colitis; barra gris oscura con puntos blancos = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 0,01mg/kg; barra gris clara con puntos negros = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 0,1 mg/kg y barra blanca con puntos negros = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 1,0 mg/kg.

25 La Figura 5 muestra la expresión colónica de ARNm de COX-2, mPGES-1 y H-PGDS durante la inducción de colitis. La colitis condujo a una síntesis de ARNm de COX-2 significativamente aumentada los días 13 y 14 (A), mientras que mPGES-1 aumentó solo el día 13 (B). Se observó la vuelta a los niveles basales de expresión génica con todas las dosis de 7 β -hidroxi-EPIA. En las Figuras 10A a 10C, barra blanca = grupo de DSS-colitis; barra gris oscura = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 0,01mg/kg; barra gris media= DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 0,1 mg/kg y barra gris clara = DSS + 7 β -hidroxi-EPIA 1,0 mg/kg.

Ejemplo 5 (referencia)

1. Efecto de la 7 β -OH-EPIA en la artritis inducida por colágeno

40 Este estudio ensayó la eficacia de la 7 β -OH-EPIA en el control de los cambios inflamatorios y patológicos asociados a un modelo de artritis inducida por colágeno. El modelo de murido demuestra enfermedad clínica que recuerda la artritis humana.

45 Se administraron a ratones DBA/1 macho (10-12 semanas de edad) 100 μ g de colágeno de pollo de tipo II emulsionado en coadyuvante completo de Freund (CII/CFA) el día 0 mediante inyección en la base de la cola. Se administraron los tratamientos diariamente del día 20 al 50 mediante inyección subcutánea (grupos 2, 3 y 4) y del día 0 al 30 por inyección subcutánea (grupo 5) como se describe a continuación:

Grupos experimentales ($n = 10$ /grupo)

Grupo 1: día 0 CII/CFA, no tratado-tratado ficticiamente, días 20 a 50

Grupo 2: día 0 CII/CFA, tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA 1 μ g/kg, días 20 a 50

50 Grupo 3: día 0 CII/CFA, tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA 10 μ g/kg, días 20 a 50

Grupo 4: día 0 CII/CFA, tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA 100 μ g/kg, días 20 a 50

Grupo 5: día 0 CII/CFA, tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA 10 μ g/kg, días 0 a 30

Grupo 6: día 0 CII/CFA, no tratado-tratado ficticiamente, días 0 a 30

A su terminación, se extirparon las patas traseras, se recogieron homogeneizados de rodilla para la medida de prostaglandina (grupos 1 y 4 solo) y se fijaron las patas para examen patológico mediante métodos estándares. Se semiseccionó longitudinalmente cada pata, se diseccionó y se descalcificó para permitir el seccionamiento. Se procesaron rutinariamente las muestras descalcificadas, se seccionaron y se preparó una sección teñida para examen. Esto incluye ambas mitades de cada espécimen. Se puntuó cada pata según un sistema de puntuación estándar. Se puntuaron las muestras con anonimato, sin conocimiento del protocolo experimental o la identidad de los grupos.

Se puntuó el hinchamiento articular clínico dos veces por semana desde el día 21 al 50. En cada ocasión, se dio a cada uno de los cuatro miembros una puntuación según el siguiente sistema de puntuación (puntuación patológica clínica combinada):

- | | |
|------|---|
| 0 | normal |
| 1 | ligero hinchamiento de toda la articulación o inflamación de dígitos individuales |
| 2 | hinchamiento intermedio de toda la articulación con enrojecimiento y/o inflamación en más de un dígito |
| 3 | inflamación articular grave y enrojecimiento que se extiende a múltiples dígitos |
| 15 4 | inflamación articular grave y enrojecimiento que se extiende a múltiples dígitos, signos claros de remodelación ósea. |

Se muestran los resultados en la Tabla 6. Puede observarse que tratar con 7 β -OH-EPIA condujo a una marcada reducción del hinchamiento articular medido mediante el método de puntuación patológica clínica anterior, en comparación con los grupos de control (los grupos de control ficticio 1 a 6 se han combinado). Se confirmó este descubrimiento mediante la prueba patológica de un hinchamiento reducido en las patas (Tabla 7). A partir de la Tabla 7, puede observarse que la puntuación patológica menor, en que 9 de 10 animales estaban completamente exentos de cambios histopatológicos en las articulaciones de las patas, fue cuando el tratamiento con 7 β -hidroxi-EPIA comenzó al mismo tiempo (día 0) que se administró el colágeno para inducir la artritis y el tratamiento continuó hasta el día 30. Por tanto, el tratamiento temprano con 7 β -hidroxi-EPIA de enfermedades tales como artritis reumatoide puede tener efectos beneficiosos.

2. Medida de prostaglandinas en homogeneizados de rodilla

Se midieron los niveles de 15d-PGJ2 y PGE2 en homogeneizados de rodilla preparados como anteriormente usando técnicas de ensayo estándares. Puede observarse a partir de la Tabla 8 que los niveles de PGE2 eran menores en el grupo tratado con 7 β -OH-EPIA 0,1 mg/kg en comparación con el grupo de control no tratado. El grupo tratado con 7 β -OH-EPIA 0,1 mg/kg tenía mayores niveles de 15d-PGJ2 en comparación con el control no tratado.

Conclusión:

Existía un claro efecto antiinflamatorio de la 7 β -hidroxi-EPIA. El tratamiento en el momento de inducción parecía tener el máximo efecto. Esto está de acuerdo con otros compuestos de ensayo que incluyen esteroides en este modelo y refleja la facilidad relativa de prevención del daño articular en contraposición con la reversión de los cambios existentes. Una vez dicho esto, los niveles de enfermedad en aquellos animales tratados con las mayores dosis de 7 β -hidroxi-EPIA eran similares cuando el tratamiento se retrasaba hasta el día 20. Este nivel de protección de la enfermedad es bueno para un régimen terapéutico. La dosis menor de 7 β -hidroxi-EPIA parecía tener menos efecto sobre los niveles de enfermedad, aunque se requeriría un análisis estadístico para investigar si esto era un claro efecto de la dosis.

El análisis de los niveles de prostaglandina E2 y 15d-J2 mostró un claro efecto del tratamiento. Los niveles de PGE2 eran menores en ratones tratados en comparación con controles no tratados. En contraposición, los niveles de 15d-PGJ2 aumentaron después del tratamiento.

Tomadas en conjunto, las observaciones patológicas clínicas y la histopatología proporcionan una fuerte evidencia del efecto antiinflamatorio de la 7 β -hidroxi-EPIA en este modelo de artritis. El tratamiento antes del inicio de la enfermedad era lo más eficaz, como es casi invariablemente el caso en este modelo. Sin embargo, el descubrimiento de que la 7 β -hidroxi-EPIA puede suprimir la progresión de la enfermedad cuando se administra aproximadamente en el momento de inicio destaca a este compuesto frente a muchos competidores y es muy alentador.

Tabla 6 Efecto de la 7β-hidroxi-EPIA sobre la histopatología en ratas CIA, tratamiento los días 20-50

Grupo	N	Puntuación de histopatología (ambas patas el día 50)
Ficticio- no tratado	10	1,35
7β-hidroxi-EPIA 1,0 μl/kg	10	0,60
7β-hidroxi-EPIA 10,0 μl/kg	9	0,44
7β-hidroxi-EPIA 100,0 μl/kg	10	0,85

A partir de estos resultados, puede concluirse que la 7β-hidroxi-EPIA a dosis tan bajas como 1,0 μl/kg es capaz de reducir el daño articular.

Tabla 7 Efecto de la 7β-hidroxi-EPIA sobre la histopatología en ratas CIA, tratamiento los días 0-30

Grupo	N	Puntuación de histopatología (ambas patas el día 50)
Ficticio- no tratado	9	1,22
7β-hidroxi-EPIA 10,0 μl/kg	10	0,2*
*9 de 10 animales estaban completamente exentos de cambios histopatológicos		

- 5 A partir de estos resultados, puede concluirse que la 7β-hidroxi-EPIA a 10,0 μg/kg previene casi completamente el desarrollo de la enfermedad, concretamente daño articular.

Tabla 8 Efecto de la 7β-hidroxi-EPIA (0,1 μg/kg al día, D 20-50), hinchamiento de articulación y contenido de prostaglandina en ratas CIA el día 50

	No tratado	Tratado
Puntuación clínica	7,50 ± 2,51	3,10 ± 2,96
PGE2 (pg/ml)	177,09 ± 70,08	95,61 ± 34,65
15d-PGJ2 (pg/ml)	19,12 ± 6,43	78,96 ± 22,18
PGE2/15d-PGJ2 (pg/ml)	9,26	1,21

- 10 A partir de estos resultados, puede concluirse que la 7β-hidroxi-EPIA reduce la gravedad de los síntomas clínicos de artritis inducida por colágeno y altera la producción de prostaglandina en tejido a favor de la resolución de la inflamación, la protección celular y la reparación de tejido.

Ejemplo 6 (referencia)

Efecto de la 7β-OH-EPIA sobre un modelo de neuropatía periférica inducida por cisplatino

- 15 El cisplatino es un compuesto antimitótico usado para el tratamiento de cánceres. Sin embargo, su uso está limitado por varios efectos adversos, entre los que las neuropatías periféricas son particularmente molestas. Las neuropatías inducidas por cisplatino son predominantemente neuropatías sensoriales. Los pacientes padecen pérdida de sensibilidad en las extremidades distales seguido de ataxia sensorial. Los estudios histológicos han mostrado degeneración axónica: en cultivos celulares, el tratamiento de neuronas sensoriales con cisplatino indujo una reducción de la densidad de la red neurítica seguido de una degeneración del cuerpo celular. El factor de crecimiento nervioso (NGF), un factor de crecimiento específico para neuronas sensoriales, tiene efectos protectores sobre las neuronas frente a esta intoxicación. La intoxicación de neuronas sensoriales en cultivo por cisplatino es por tanto un modelo adecuado para el estudio de los efectos neuroprotectores de los compuestos en neuropatías periféricas.

- 25 Se evaluaron los efectos neuroprotectores de la 7β-OH-EPIA en neuronas sensoriales de rata en un modelo de neuropatía periférica.

Se incubaron cultivos primarios de neuronas sensoriales de ganglios de la raíz dorsal disociadas con cisplatino 3 μg/ml, con y sin 7β-OH-EPIA, durante 48 horas y 72 horas y se evaluaron los siguientes parámetros:

- cuerpos celulares neuronales teñidos con un anticuerpo anti-MAP2 (proteína asociada a microtúbulos 2)

- densidad de la red neurítica teñida con anticuerpo anti-tubulina β .

Cultivos de neuronas

5 Se prepararon neuronas sensoriales de rata según el método descrito por Hall *et al.* 1997 [Hall *et al.* (*J. Neurosci.* 15 de abril de 1997; 17(8); 2775-84]. Brevemente, se sacrificó una rata hembra (a los 15 días de gestación) por dislocación cervical (ratas Wistar; Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) y se extirparon los fetos del útero. Se extirparon sus médulas espinales con los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y se dispusieron en medio de Leibovitz enfriado con hielo (L15, Fisher 11415-049) que contenía 50 UI/ml de penicilina, estreptomicina 50 $\mu\text{g/ml}$ (PS, al 1%) y albuminatos séricos bovinos (BSA al 1%, Sigma A6003). Se recuperaron los DRG y se disociaron por tripsinación durante 20 minutos a 37°C (tripsina-EDTA 10X, al 10%, Fisher 15400054) diluido en PBS sin calcio ni magnesio (Fisher 2007-03). Se detuvo la reacción mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Fisher 21969-035) que contenía ADNasa I de clase II (0,1 mg/ml, Roche Diagnostic 104159) y suero fetal bovino (FBS al 10%, Fisher 10270-098). Se trituró la suspensión celular con una pipeta de 10 ml y se centrifugó a 350 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió entonces el sedimento de células disociadas en medio de cultivo definido.

15 Se contaron las células viables en un citómetro Neubauer usando la prueba de exclusión con azul de tripano (Sigma) y se sembraron a una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc). Se prerrecubrieron los pocillos con poli-L-lisina (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma P2636) en agua estéril ultrapura (Merck Eurolab 60759.01).

Se dejaron adherir las células durante 2 h y se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 /95% de aire.

20 *Incubación de cultivos neuronales con 7 β -OH-EPIA*

Después de 5 días de cultivo, se cambió el medio de cultivo por un medio de cultivo definido siguiendo las diferentes condiciones descritas a continuación:

- Vehículo (DMSO al 0,1%)
- Vehículo (DMSO al 0,1%) + cisplatino (3 $\mu\text{g/ml}$, ref. Sigma: p4394)
- 25 • Compuesto de ensayo 7 β -OH-EPIA (1 nM, 10 nM y 100 nM) + cisplatino (3 $\mu\text{g/ml}$)
- Compuesto de referencia NGF (10 ng/ml) + cisplatino (3 $\mu\text{g/ml}$).

Se llevaron a cabo 6 pocillos por condición para valorar la supervivencia neuronal. Después de 48 y 72 horas de incubación, se fijaron las células neuronales durante 5 minutos en una disolución de etanol/ácido acético (95%/5%) a -20°C y se aclararon 3 veces con PBS.

30 Para el control del efecto neurotrófico de los compuestos, se incubaron NGF (10 ng/ml) y 7 β -OH-EPIA (1 nM, 10 nM y 100 nM) durante 48 horas y 72 horas. Al final de la incubación, se fijaron las células durante 5 minutos en una disolución de etanol/ácido acético (95%/5%) a -20°C y se aclararon 3 veces con PBS.

Análisis del número de cuerpos celulares y la red neurítica por campo

35 Se marcaron los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales mediante anticuerpo monoclonal anti-MAP-2 (Sigma M4403) y se marcaron las neuritas de las neuronas sensoriales mediante anticuerpo monoclonal anti-tubulina β (Sigma T8660). Se diluyeron estos anticuerpos a 1:400 en disolución de incubación (PBS con 5% de FCS y 0,1% de saponina, Sigma S-7900). Estos anticuerpos marcan específicamente cuerpos celulares neuronales y neuritas, respectivamente.

40 Después de 2 horas de incubación, se lavaron las células con PBS y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A 11001) diluida a 1:300 en disolución de incubación, revelando los anticuerpos anti-MAP-2 y anti-tubulina β . Se tiñeron los núcleos celulares con un marcador fluorescente (disolución de tinción de Hoechst, SIGMA H6024, 1 $\mu\text{g/ml}$ en disolución de incubación durante 1 hora).

45 Para cada condición, se tomaron 2 fotos por pocillo (12 fotos por condición) usando un In Cell Analyzer 1000 (Amersham Biosciences) controlado por el software informático In Cell Analyzer 1000 3.2. Para el marcaje de MAP-2, el número de aumentos fue de x10, para el marcaje con tubulina β , el número de aumentos fue de x20. Para cada marcaje, se tomaron todas las imágenes en las mismas condiciones.

50 Los análisis del número de cuerpos celulares marcados con anticuerpos anti-MAP-2 y la longitud total de las neuritas marcadas con anticuerpos anti-tubulina β se llevaron a cabo con el software In Cell Analyzer 1000 3.2.Workstation. Los resultados se expresaron en porcentajes en comparación con el vehículo. Se llevaron a cabo las comparaciones de cada grupo usando la prueba de t de datos no emparejados.

Resultados

Protección por 7 β -OH-EPIA frente a la pérdida de densidad neurítica inducida por cisplatino**Incubación con cisplatino 3 μ g/ml durante 48 horas.**

5 La densidad neurítica expresó una media de 5459 μ m de longitud neurítica total por campo después de la incubación de neuronas sensoriales con medio ("vehículo"), concretamente sin cisplatino, durante 48 horas. La incubación con cisplatino durante 48 horas redujo la longitud neurítica total por campo a aproximadamente 4585 μ m. Esta reducción de la densidad de red neurítica por el cisplatino era estadísticamente significativa (-16%, p<0,001) en comparación con el vehículo.

La incubación con NGF 10 ng/ml durante 48 horas previno la pérdida de neuritas inducida por cisplatino y causó un aumento significativo de la longitud neurítica en comparación con cultivos incubados con solo medio.

10 La incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM y 10 nM protegió a las neuronas sensoriales frente a la pérdida neurítica inducida por cisplatino a las 48 horas. Este efecto era estadísticamente significativo. La longitud neurítica total era de 5378 μ m y 5549 μ m después de 48 horas de incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM y 10 nM respectivamente, lo que representa una reducción de la toxicidad inducida por el cisplatino de 90,7% y 101% respectivamente.

Incubación con cisplatino 3 μ g/ml durante 72 horas

15 Las neuronas sensoriales en medio "vehículo" sin cisplatino expresaron una media de 5320 μ m de longitud neurítica total por campo. La incubación con cisplatino durante 72 horas redujo la longitud neurítica total por campo a aproximadamente 4046 μ m. Esta reducción de la densidad de la red neurítica por el cisplatino era estadísticamente significativa (-24%, p<0,001) en comparación con el vehículo.

20 La incubación con NGF 10 ng/ml durante 72 horas previno la pérdida de neuritas inducida por el cisplatino y causó un aumento significativo de la longitud neurítica en comparación con cultivos cultivados solo con medio.

La incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM protegió a las neuronas sensoriales frente a la pérdida de neuritas inducida por cisplatino a las 72 horas. El efecto era estadísticamente significativo. La longitud neurítica total era de 4948 μ m después de 72 horas de incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM, lo que representa una reducción de la toxicidad inducida por cisplatino de un 70,8%.

25 **Tabla 9** Efectos del vehículo (0,1% de DMSO), NGF (10 ng/ml) y 7 β -OH-EPIA (1 nM, 10 nM y 100 nM) sobre la longitud neurítica de las neuronas sensoriales después de 48 horas de incubación en presencia de cisplatino (3 μ g/ml).

Tratamiento	Conc.	Longitud neurítica media (μ m)	EEM	N	% del control sin cisplatino	p (en comparación con vehículo + cisplatino)
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	5459,72	184	12	100	p<0,001
Vehículo (DMSO al 0,1%) intoxicación con cisplatino 3 μ g/ml	-	4585,52	133	12	84	-
NGF Intoxicación con cisplatino 3 μ g/ml	10 ng/ml	6362,44	297	12	117	p<0,001
7 β -OH-EPIA Intoxicación con cisplatino 3 μ g/ml	100 nM	4442,51	125	12	81	p>0,05
	10 nM	5549,41	146	12	102	p<0,001
	1 nM	5377,89	106	12	99	p<0,001

Tabla 10 Efectos del vehículo (DMSO al 0,1%), NGF (10 ng/ml) y 7 β -OH-EPIA (1 nM, 10 nM y 100 nM) sobre la longitud neurítica de neuronas sensoriales después de 72 horas de incubación en presencia de cisplatino (3 μ g/ml)

Tratamiento	Conc.	Longitud neurítica media (μ m)	EEM	N	% del control sin cisplatino	p (en comparación con vehículo + cisplatino)
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	5320,43	156,74	12	100	p<0,001
Vehículo (DMSO al 0,1%) intoxicación con cisplatino 3 μ g/ml	-	4046,14	138,52	12	76	-
NGF Intoxicación con cisplatino 3 μ g/ml	10 ng/ml	6000,30	221,31	12	113	p<0,001
7 β -OH-EPIA Intoxicación con cisplatino 3 μ g/ml	100 nM	4080,89	172,07	12	77	p>0,05
	10 nM	4275,04	125,14	12	80	p>0,05
	1 nM	4947,99	130,81	12	93	p<0,001

Protección por 7 β -OH-EPIA frente a la muerte neuronal inducida por cisplatino (pérdida de cuerpos celulares neuronales).**5 Incubación con cisplatino 3 μ g/ml durante 48 horas**

Se observó una media de 61 neuronas sensoriales por campo después de incubación junto con "vehículo" sin cisplatino a las 48 horas. La incubación con cisplatino 3 μ g/ml redujo el número de neuronas a una media de 41 neuronas sensoriales por campo. Esta pérdida de cuerpos celulares neuronales por el cisplatino era estadísticamente significativa (-33%, p<0,001) en comparación con el número de cuerpos celulares valorados después de 48 horas sin cisplatino, concretamente, medio que contiene solo vehículo.

La incubación con NGF 10 ng/ml durante 48 horas previno casi completamente la pérdida de cuerpos celulares inducida por cisplatino.

La incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM, 10 nM y 100 nM protegió a las neuronas sensoriales frente a la muerte celular inducida por cisplatino a las 48 horas. Este efecto era estadísticamente significativo. El número total de neuronas sensoriales por campo era de 51, 45 y 50 después de 48 horas de incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM, 10 nM y 100 nM respectivamente, lo que representa una reducción de la muerte celular inducida por cisplatino de un 53,1%, 18,7% y 43,8% respectivamente.

Incubación con cisplatino 3 μ g/ml durante 72 horas

Se observó una media de 54 neuronas sensoriales por campo después de incubación en medio junto con "vehículo" sin cisplatino a las 72 horas. La incubación con cisplatino 3 μ g/ml redujo el número de neuronas a una media de 33 neuronas sensoriales por campo. Esta pérdida de cuerpos celulares neuronales por el cisplatino era estadísticamente significativa (-39%, p<0,001) en comparación con el número de cuerpos celulares valorados después de 72 horas sin cisplatino, concretamente, medio que contiene solo vehículo.

La incubación con NGF 10 ng/ml durante 48 horas previno completamente la pérdida de cuerpos celulares inducida por el cisplatino.

La incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM y 10 nM y 100 nM protegió casi completamente a las neuronas sensoriales frente a la muerte celular inducida por cisplatino a las 72 horas. Este efecto era estadísticamente significativo. El número total de neuronas sensoriales por campo era de 52, 55 y 52 después de 72 horas de incubación con 7 β -OH-EPIA 1 nM, 10 nM y 100 nM respectivamente, lo que representa una reducción de la muerte celular inducida por cisplatino de un 93%, 104% y 93% respectivamente.

Tabla 11 Efectos del vehículo (DMSO al 0,1%), NGF (10 ng/ml) y 7β-OH-EPIA (1 nM, 10 nM y 100 nM) sobre el número de cuerpos celulares por campo después de 48 horas de incubación con cisplatino (3 µg/ml).

Tratamiento	Conc.	Media	EEM	N	% del control sin cisplatino	p (en comparación con vehículo + cisplatino)
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	60,83	1,59	12	100	p<0,001
Vehículo (DMSO al 0,1%) intoxicación con cisplatino 3 µg/ml	-	40,75	1,88	12	67	-
NGF Intoxicación con cisplatino 3 µg/ml	10 ng/ml	58,33	1,38	12	96	p<0,001
7β-OH-EPIA Intoxicación con cisplatino 3 µg/ml	100 nM	49,58	1,12	12	82	p<0,001
	10 nM	45,50	1,26	12	75	p<0,05
	1 nM	51,42	2,11	12	85	p<0,001

Tabla 12 Efecto del vehículo (DMSO al 0,1%), NGF (10 ng/ml) y 7β-OH EPIA (1 nM, 10 nM y 100 nM) sobre el número de cuerpos celulares por campo después de 72 horas de incubación con cisplatino (3 µg/ml).

Tratamiento	Conc.	Media	EEM	N	% del control sin cisplatino	p (en comparación con vehículo + cisplatino)
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	53,75	1,29	12	100	p<0,001
Vehículo (DMSO al 0,1%) intoxicación con cisplatino 3 µg/ml	-	32,83	1,47	12	61	-
NGF Intoxicación con cisplatino 3 µg/ml	10 ng/ml	54,92	1,41	12	1,2	p<0,001
7β-OH-EPIA Intoxicación con cisplatino 3 µg/ml	100 nM	52,25	1,24	12	97	p<0,001
	10 nM	54,58	1,37	Z	1,2	p<0,001
	1 nM	52,42	1,65	12	98	p<0,001

5 **Ejemplo 7 (referencia)**

El presente estudio evalúa los efectos promotores del crecimiento de neuritas de la 7β-OH-EPIA sobre motoneuronas y neuronas sensoriales de médula espinal disociadas en cultivos primarios. Se tiñeron las neuronas con anticuerpo anti-tubulina β y el análisis de la longitud neuronal total se llevó a cabo usando un "In Cell Analyzer". Se cultivaron los cultivos de células neuronales con 7β-OH-EPIA 10^{-9} M- 10^{-4} M y se valoró la densidad de la red neuronal después de 6 horas, 12 horas y 24 horas de incubación. Se usaron factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF), un factor de crecimiento específico para motoneuronas, y factor de crecimiento nervioso (NGF), un factor de crecimiento específico para neuronas sensoriales, como compuestos de referencia. Los datos muestran que la 7β-OH-EPIA tiene marcados efectos neurotróficos, tanto sobre motoneuronas como neuronas sensoriales. Estos efectos, que eran comparables con los efectos de BDNF y NGF, eran particularmente pronunciados a concentraciones nanomolares del hidroxisteroide. En conjunto, los descubrimientos apoyan los usos de 7-hidroxisteroides para promover el crecimiento neurítico y para tratar neuropatías periféricas.

1. Materiales y métodos

1.1. Preparación de cultivos celulares de motoneuronas de médula espinal

Se prepararon motoneuronas espinales de rata según el método descrito por Martinou *et al.*, 1992 (Martinou JC, Martinou I, Kato AC "Cholinergic differentiation factor (CDF/L1 F) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro". *Neuron*. Abril de 1992; B(4): 737-44). Brevemente, se sacrificaron ratas Wistar hembra preñadas a los 15 días de gestación mediante dislocación cervical y se extrajeron los fetos del útero. Se extirparon

sus médulas espinales y se dispusieron en medio de Leibovitz enfriado con hielo (L15, Invitrogen, 11415-049) que contenía un 1% de albuminatos séricos bovinos (BSA exenta de ácidos grasos, Eurobio, Les Ulis, Francia, GXXBSA01-65). Se extirparon cuidadosamente las meninges.

5 Se disociaron las motoneuronas espinales mediante tripsinación durante 20 minutos a 37°C (tripsina-EDTA 10X, Invitrogen 15400054) diluido en PBS sin calcio ni magnesio (Invitrogen 2007-03). Se detuvo la reacción mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen 21969-035) que contenía ADNasa I de clase II (0,1 mg/ml, Roche Diagnostic 104159) y suero fetal bovino al 10% (FCS, Invitrogen 10270098). Se disoció entonces mecánicamente la suspensión mediante 3 pasadas por una pipeta de 10 ml. Se centrifugaron entonces las células a 580 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió entonces el sedimento de células disociadas en medio L15 y se enriqueció la suspensión resultante en motoneuronas mediante centrifugación a 180 g durante 10 minutos a temperatura ambiente en una capa de disolución de BSA (al 3,5%) en medio L15. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en medio L15 suplementado con ADNasa I (al 1%). Se colocó entonces la suspensión sobre un colchón de Optiprep (d: 1,06 g/ml; Abcys, Paris, Francia; 1030061) y se centrifugó a 335 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se recogió la fase superior que contenía las motoneuronas purificadas, se resuspendió con medio L15 y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió finalmente el sedimento celular en un medio de cultivo definido consistente en medio neurobasal suplementado con B27 al 2%, L-glutamina 2 mM y penicilina 50 UI/ml-estreptomicina 50 µg/ml. Se contaron las células viables en un citómetro Neubauer usando la prueba de exclusión con azul de tripano (Sigma T8154), se sembraron entonces a 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos ((prerrecubiertas con poli-1-lisina; Nunclon, Invitrogen P5899) y se cultivaron a 37°C en atmósfera de aire humidificado (95%) y CO₂ (5%).

1.2. Preparación de cultivos celulares de neuronas sensoriales de rata

Se prepararon neuronas sensoriales de rata según el método descrito por Hall *et al.* 1997 (Hall AK, Ai X, Hickman GE, MacPhedran SE, Nduaguba CO, Robertson CPO "The generation of neuronal heterogeneity in a rat sensory ganglion", *J. Neurosci.* 15 de abril de 1997; 17(8): 2775-84). Brevemente, se sacrificaron ratas hembra (15 días de gestación) mediante dislocación cervical (ratas Wistar; Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) y se extrajeron los fetos del útero. Se extirparon sus médulas espinales con los ganglios de raíz dorsal (DRG) y se dispusieron en medio de Leibovitz enfriado con hielo (L15, Fisher 11415-049) que contenía penicilina 50 UI/ml-estreptomicina 50 µg/ml (PS, al 1%) y albuminatos de suero bovino (BSA al 1%, Sigma A6003). Se recuperaron los DRG y se disociaron mediante tripsinación durante 20 minutos a 37°C (tripsina-EDTA 10X, al 10%, Fisher 15400054) diluido en PBS sin calcio ni magnesio (Fisher 2007-03). Se detuvo la reacción mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen 21969-035) que contenía ADNasa I de clase II (0,1 mg/ml, Roche Diagnostic 104159) y suero fetal bovino al 10% (FCS, Fisher 10270098). Se trituró la suspensión celular con una pipeta de 10 ml y se centrifugó a 350 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió entonces el sedimento de células disociadas en medio de cultivo definido.

35 Se contaron las células viables en un citómetro Neubauer usando la prueba de exclusión con azul de tripano (Sigma) y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc). Se prerrecubrieron los pocillos con poli-L-lisina (10 µg/ml, Sigma P2636) en agua estéril ultrapura (Merck Eurolab 60759.01).

Se dejaron adherir las células durante 2 horas y se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire.

40 1.3. Incubación de cultivos celulares de motoneuronas de médula espinal con compuestos activos

Se cambió el medio de cultivo por un medio de cultivo definido después de un periodo de incubación de 12 horas según las condiciones descritas a continuación:

Control (vehículo, DMSO al 0,1%)

7β-OH-EPIA 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M y 10⁻⁹ M (en DMSO al 0,1%)

45 BDNF 50 ng/ml y 10 ng/ml (en DMSO al 0,1%)

Después de 6 horas, 12 horas y 24 horas de incubación, se fijaron las células durante 5 minutos en disolución de etanol/ácido acético (95%/5%) a -20°C y se aclararon 3 veces en PBS.

1.4. Incubación de cultivos celulares de neuronas sensoriales con compuestos activos

50 Se cambió el medio de cultivo por un medio de cultivo definido después de un periodo de incubación de 12 horas siguiendo las condiciones descritas a continuación:

Control (vehículo, DMSO al 0,1%)

7β-OH-EPIA - 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M y 10⁻⁹ M (en DMSO al 0,1%)

NGF 50 ng/ml y 10 ng/ml (en DMSO al 0,1%)

Después de 6 horas, 12 horas y 24 horas de incubación, con 7β-OH-EPIA, se fijaron las células durante 5 minutos en disolución de etanol/ácido acético (95%/5%) a -20°C y se aclararon 3 veces con PBS.

1.5. Análisis del crecimiento neurítico

5 Se marcaron las motoneuronas y neuronas sensoriales con anticuerpo monoclonal anti-tubulina β (Sigma T8660) diluido a 1:400 en disolución de incubación (PBS con 5% de FCS y 0,1% de saponina, Sigma S-7900). Este anticuerpo marca específicamente cuerpos celulares neuronales y neuritas.

Después de 2 horas de incubación, se lavaron las células con PBS y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11001) diluida a 1:300 en disolución de incubación para revelar los anticuerpos anti-tubulina β.

10 El análisis de la longitud total de las neuronas marcadas con anticuerpos anti-tubulina β (neuronas) se llevó a cabo usando el software In Cell Analyzer 1000 3.2.Workstation.

Los resultados se expresaron en porcentaje en comparación con el vehículo. Se llevó a cabo la comparación de grupos usando la prueba de t de datos no emparejados.

2- Resultados

15 2.1. Efecto del tratamiento con fármacos sobre la longitud neurítica de motoneuronas

El análisis de la longitud total de las extensiones celulares da una indicación de las propiedades neurotróficas de los compuestos de ensayo.

a) Después de 6 horas de incubación

20 Se muestran los resultados en la Tabla 13. El tratamiento con BDNF 50 ng/ml y 10 ng/ml aumentó significativamente la densidad de la red neurítica formada por motoneuronas respectivamente un 180% y un 193% en comparación con el vehículo ($p < 0,001$).

La incubación con 7β-OH-EPIA 10^{-8} M y 10^{-9} M durante 6 horas aumentó significativamente la densidad de la red neurítica de motoneuronas respectivamente un 150% y un 188%, en comparación con el vehículo ($p < 0,001$).

b) Después de 12 horas de incubación

25 Se muestran los resultados en la Tabla 14. El tratamiento con BDNF 50 ng/ml y 10 ng/ml aumentó significativamente la densidad de la red neurítica formada por motoneuronas respectivamente un 152% y un 173% en comparación con el vehículo ($p < 0,001$).

La incubación con 7β-OH-EPIA 10^{-4} M a 10^{-9} M durante 12 horas aumentó significativamente la densidad de la red neurítica, de 226% a 137%, en comparación con el vehículo.

30 c) Después de 24 horas de incubación

Se muestran los resultados en la Tabla 15. 24 horas de incubación con BDNF 10 ng/ml aumentaron significativamente la densidad de la red neurítica en comparación con el vehículo (170%, $p < 0,01$). Sin embargo, la incubación con BDNF 50 ng/ml no modificó significativamente la densidad de la red neurítica.

35 La incubación con 7β-OH-EPIA 10^{-8} M durante 24 horas aumentó la densidad de la red neurítica un 174% en comparación con el vehículo ($p < 0,005$).

2.2. Efecto del tratamiento con fármacos sobre la longitud neurítica de las neuronas sensoriales

a) Después de 6 horas de incubación

40 Se muestran los resultados en la Tabla 16. El tratamiento con NGF 50 ng/ml y 10 ng/ml durante 6 horas aumentó significativamente la densidad de la red neurítica formada por neuronas sensoriales respectivamente un 273% ($p < 0,001$) y 191% ($p < 0,01$).

La incubación con 7β-OH-EPIA 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M durante 6 horas aumentó la densidad de la red neurítica de las neuronas sensoriales respectivamente un 171% ($p < 0,001$), 176%, ($p < 0,005$) y 149% ($p < 0,05$) en comparación con el control.

b) Después de 12 horas de incubación.

45 Se muestran los resultados en la Tabla 17. La incubación con NGF 50 ng/ml y 10 ng/ml aumentó significativamente la densidad de la red neurítica formada por neuronas sensoriales en comparación con el vehículo respectivamente un 216% ($p < 0,001$) y 128% ($p < 0,05$).

La incubación con 7β-OH-EPIA 10⁻⁹ M y 10⁻⁷ M aumentó significativamente la densidad de la red neurítica en comparación con el vehículo respectivamente un 145% (p<0,001) y 134% (p<0,05).

c) Después de 24 horas de incubación

5 Se muestran los resultados en la Tabla 18. Después de 24 horas de incubación con NGF 50 ng/ml y 10 ng/ml, aumentó significativamente la densidad de la red neurítica formada por las neuronas sensoriales respectivamente un 309% y 371% en comparación con el vehículo (p<0,001).

Después de 24 horas de incubación con 7β-OH-EPIA 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M y 10⁻⁹ M durante 24 horas, aumentó la densidad de la red neurítica en comparación con el vehículo respectivamente un 173% (p<0,005), 174% (p<0,01) y un 147% (p<0,05).

10

Tabla 13

Motoneuronas- Longitud neurítica por campo después de 6 horas de incubación						
Tratamiento	Conc.	Media (µm)	EEM	N	% del vehículo	P
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	254,3	19,0	12	100	-
BDNF	50 ng/ml	457,2	19,4	12	180	p<0,001
	10 ng/ml	489,5	19,0	12	193	p<0,001
7β-OH-EPIA	10 ⁻⁴ M	315,9	18,9	12	124	p<0,05
	10 ⁻⁵ M	293,3	22,8	12	115	p<0,05
	10 ⁻⁶ M	354,5	33,7	12	139	p<0,05
	10 ⁻⁷ M	350,5	34,3	12	138	p<0,05
	10 ⁻⁸ M	382,4	25,8	12	150	p<0,001
	10 ⁻⁹ M	479,3	40,8	12	188	p<0,001

Tabla 14

Motoneuronas- Longitud neurítica por campo después de 12 horas de incubación						
Tratamiento	Conc.	Media (µm)	EEM	N	% del vehículo	P
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	423,8	38,3	12	100	-
BDNF	50 ng/ml	643,7	34,1	12	152	p<0,001
	10 ng/ml	731,3	34,8	12	173	p<0,001
7β-OH-EPIA	10 ⁻⁴ M	602,4	24,8	12	142	p<0,001
	10 ⁻⁵ M	680,9	30,8	12	161	p<0,001
	10 ⁻⁶ M	580,3	55,5	12	137	p<0,03
	10 ⁻⁷ M	956,7	54,6	12	137	p<0,001
	10 ⁻⁸ M	759,0	61,6	12	179	p<0,001
	10 ⁻⁹ M	764,9	59,9	12	180	p<0,001

Tabla 15

Motoneuronas- Longitud neurítica por campo después de 24 horas de incubación						
Tratamiento	Conc.	Media (µm)	EEM	N	% del vehículo	P
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	215,8	39,6	12	100	-
BDNF	50 ng/ml	293,6	20,1	12	136	p<0,001
	10 ng/ml	366,1	29,6	12	170	p<0,001
7β-OH-EPIA	10 ⁻⁴ M	188,4	23,3	12	87	p<0,05
	10 ⁻⁵ M	200,9	20,7	12	93	p<0,05
	10 ⁻⁶ M	224,8	36,7	12	104	p<0,05
	10 ⁻⁷ M	271,7	34,0	12	126	p<0,05
	10 ⁻⁸ M	374,6	22,3	12	174	p<0,005
	10 ⁻⁹ M	265,9	26,2	12	123	p<0,05

Tabla 16

Neuronas sensoriales- Longitud neurítica por campo después de 6 horas de incubación						
Tratamiento	Conc.	Media (µm)	EEM	N	% del vehículo	P
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	102,2	14,1	12	100	-
NGF	50 ng/ml	279,1	31,8	12	273	p<0,001
	10 ng/ml	195,2	28,8	12	191	p<0,01
7β-OH-EPIA	10 ⁻⁴ M	103,2	10,7	12	101	p<0,05
	10 ⁻⁵ M	114,8	8,2	12	112	p<0,05
	10 ⁻⁶ M	97,7	11,4	12	96	p<0,05
	10 ⁻⁷ M	151,8	11,7	12	149	p<0,05
	10 ⁻⁸ M	179,3	16,0	12	176	p<0,005
	10 ⁻⁹ M	174,2	9,1	12	171	p<0,001

Tabla 17

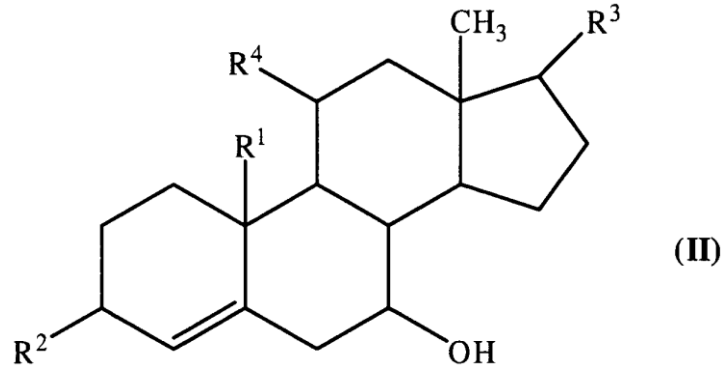
Neuronas sensoriales- Longitud neurítica por campo después de 12 horas de incubación						
Tratamiento	Conc.	Media (µm)	EEM	N	% del vehículo	P
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	298,4	12,8	12	100	-
NGF	50 ng/ml	644,3	40,0	12	216	p<0,001
	10 ng/ml	381,3	31,4	12	128	p<0,05
7β-OH-EPIA	10 ⁻⁴ M	290,3	32,3	12	97	p<0,05
	10 ⁻⁵ M	321,0	18,4	12	108	p<0,05
	10 ⁻⁶ M	287,0	24,3	12	96	p<0,05
	10 ⁻⁷ M	398,4	35,8	12	134	p<0,05
	10 ⁻⁸ M	368,3	32,2	12	123	p<0,05
	10 ⁻⁹ M	431,8	24,2	12	145	p<0,001

Tabla 18

Neuronas sensoriales- longitud neurítica por campo después de 24 horas de incubación						
Tratamiento	Conc.	Media (μm)	EEM	N	% del vehículo	P
Vehículo (DMSO al 0,1%)	-	220,7	12,4	12	100	-
NGF	50 ng/ml	682,1	64,2	12	309	p<0,001
	10 ng/ml	819,9	61,5	12	371	p<0,001
7 β -OH-EPIA	10 ⁻⁴ M	228,6	38,8	12	104	p<0,05
	10 ⁻⁵ M	244,8	28,2	12	111	p<0,05
	10 ⁻⁶ M	189,9	24,4	12	86	p<0,05
	10 ⁻⁷ M	380,8	45,8	12	173	p<0,005
	10 ⁻⁸ M	384,3	52,2	12	174	p<0,01
	10 ⁻⁹ M	324,9	45,1	12	147	p<0,05

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de fórmula (II):



en la que:

- 5 R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo

R², R³ y R⁴ son iguales o diferentes entre sí y representan cada uno un grupo oxo, un grupo hidroxilo, un grupo mercapto, un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo o un grupo acilo;

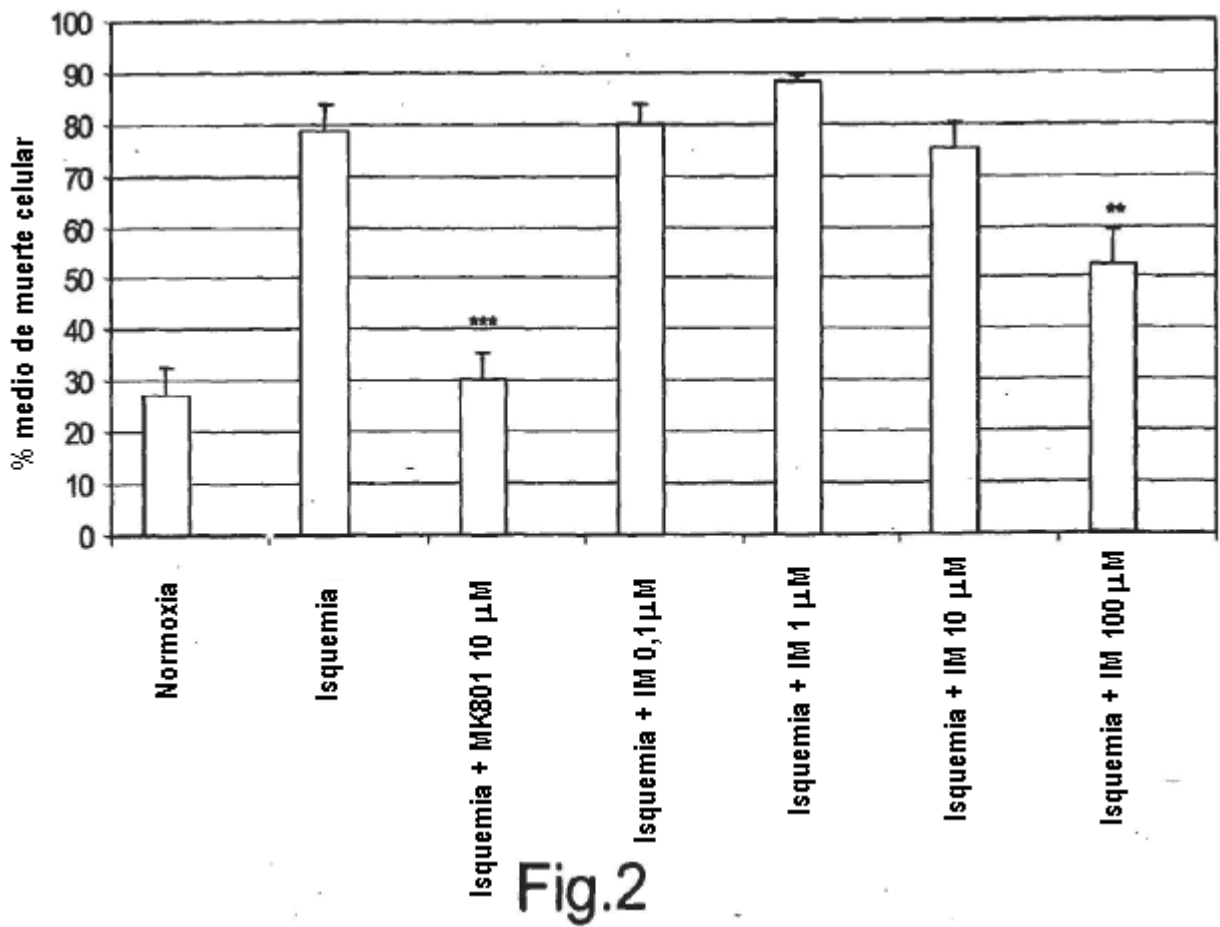
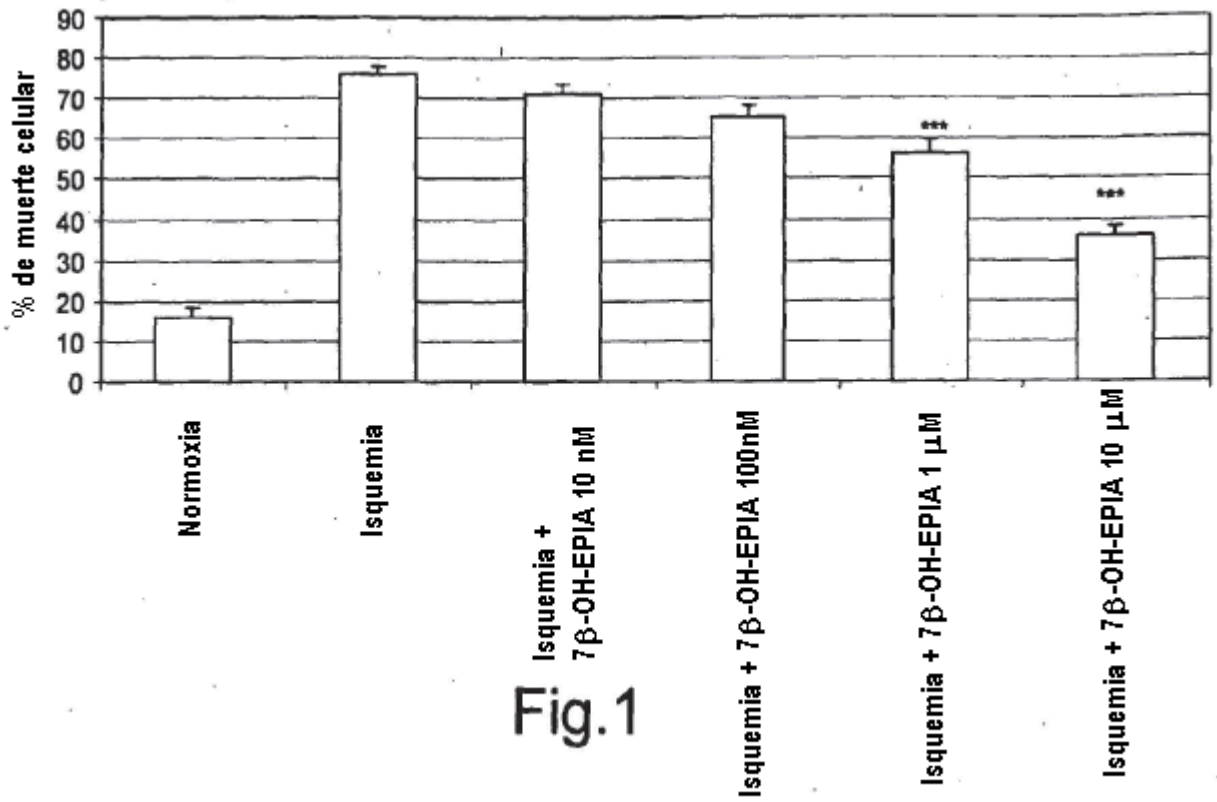
o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos,

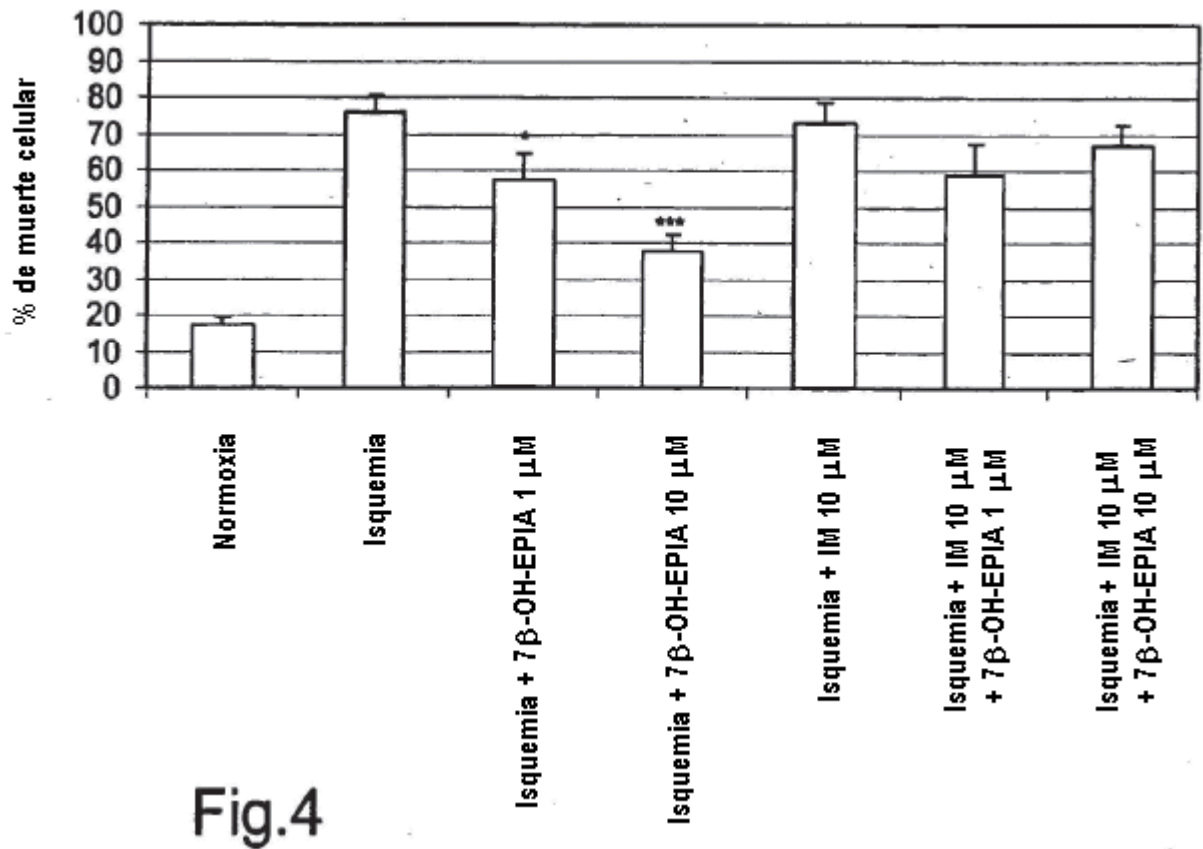
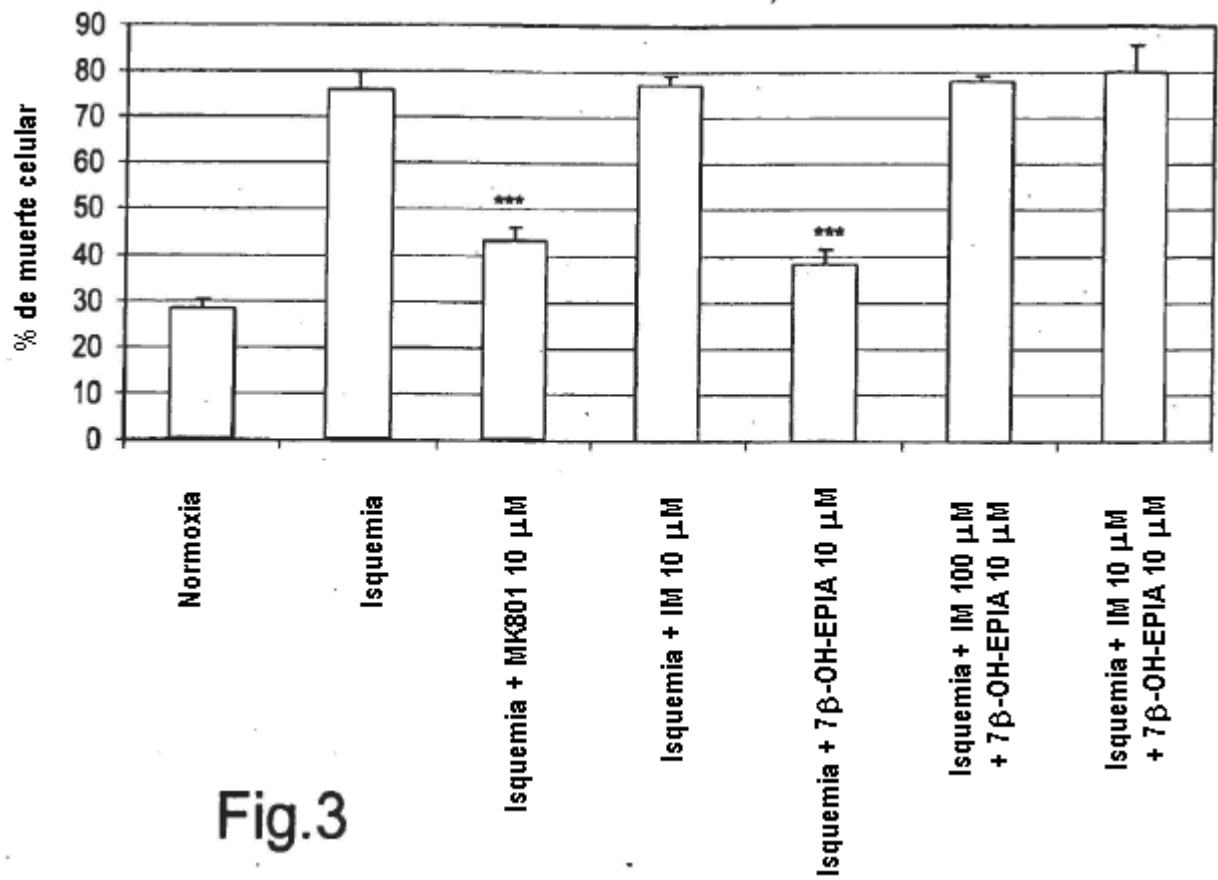
- 10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias incluyen asma, rinitis, bronquitis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

3. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para el tratamiento o la profilaxis de asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

- 15 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en que dicho compuesto de fórmula (II) es 7-hidroxitestosterona.





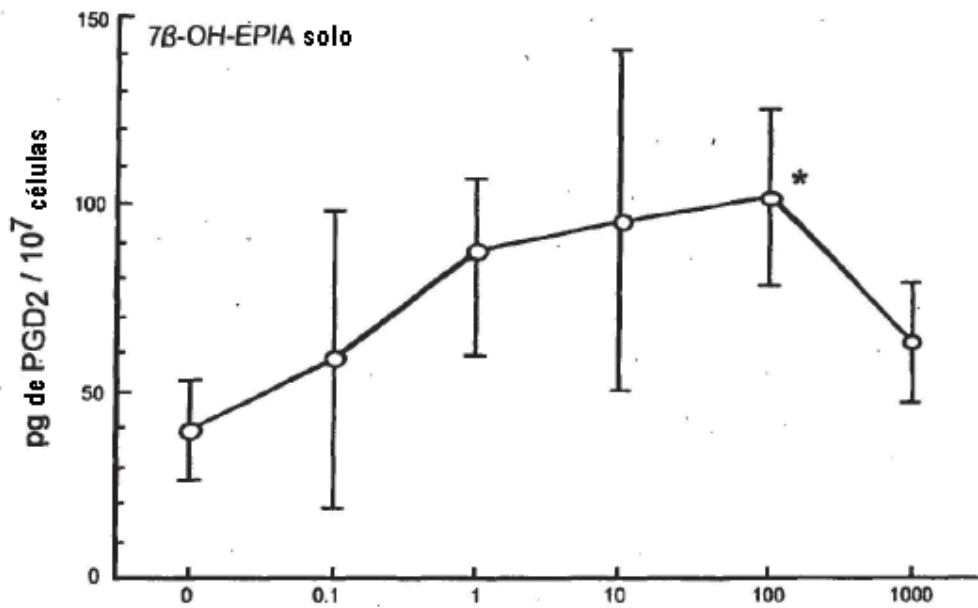
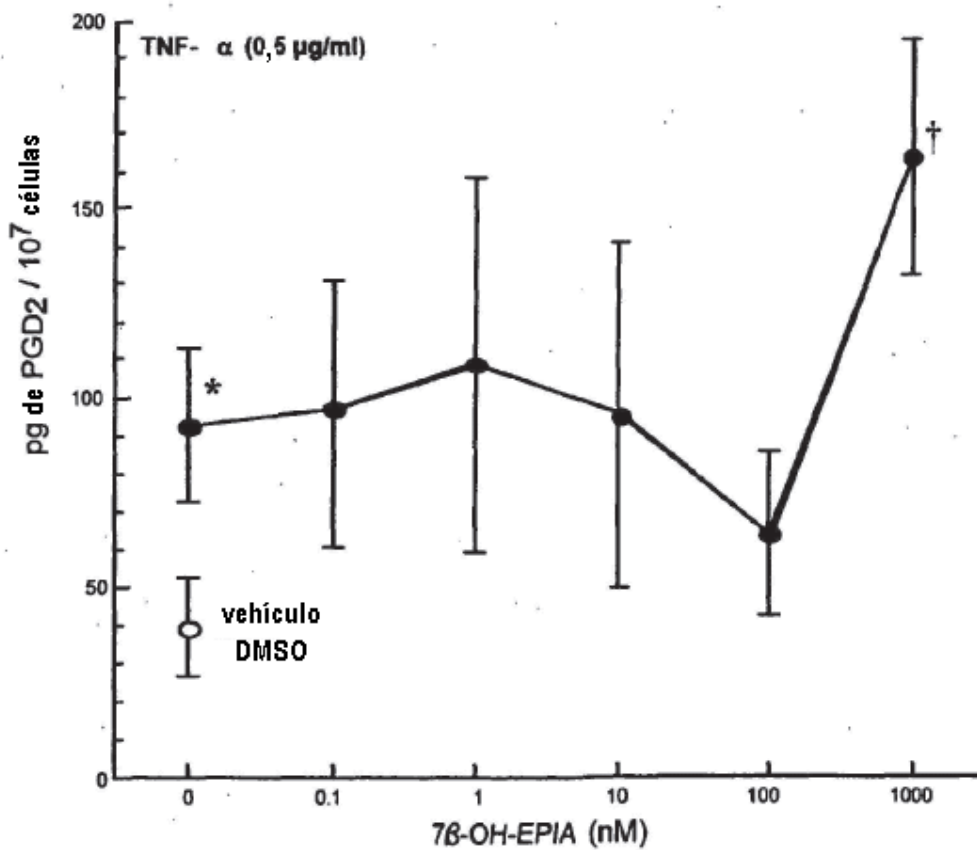


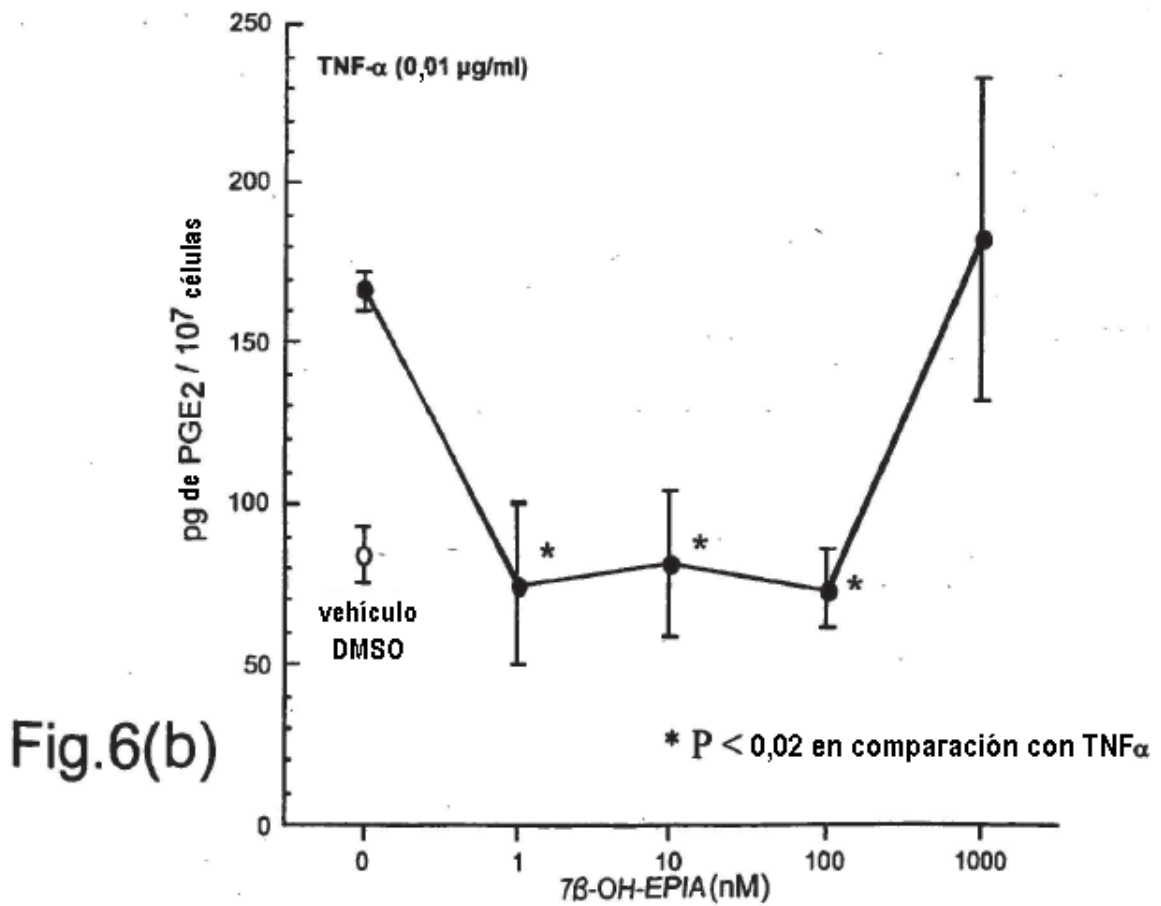
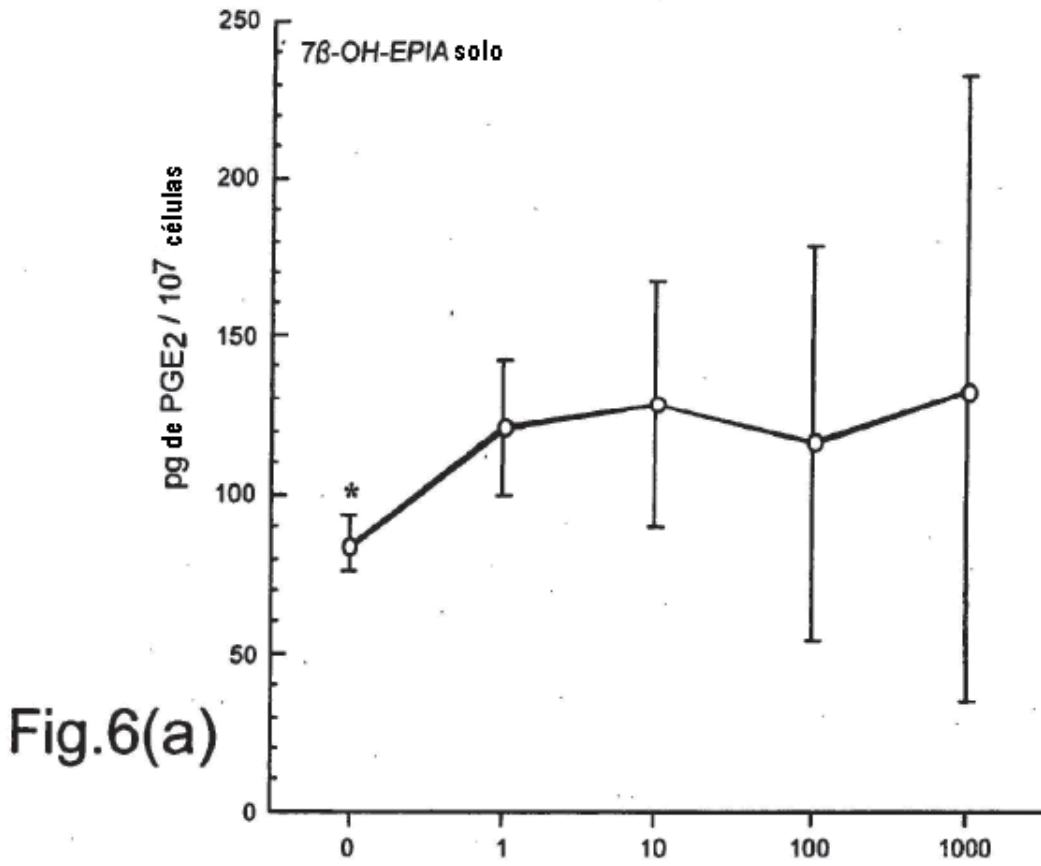
Fig 5(a)



* P < 0,05 en comparación con el control de DMSO

†P < 0,05 en comparación con TNFα solo

Fig.(5b)



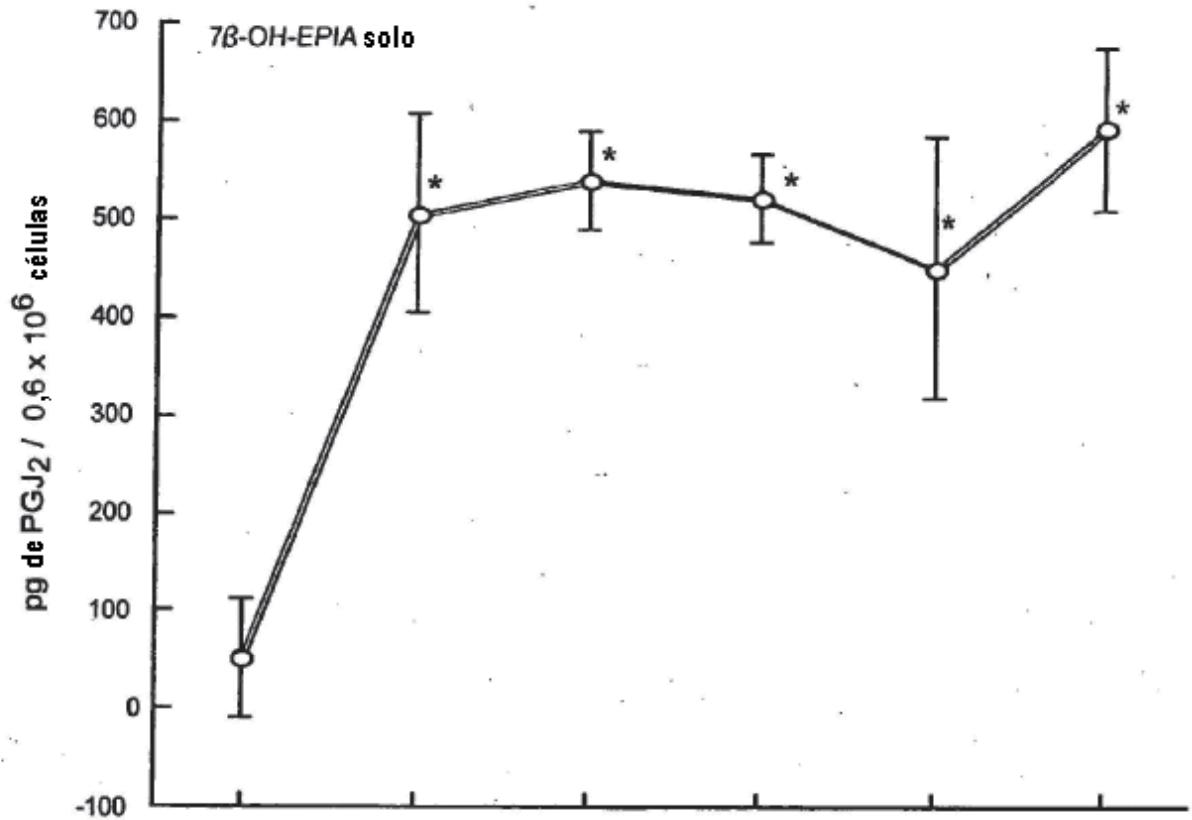
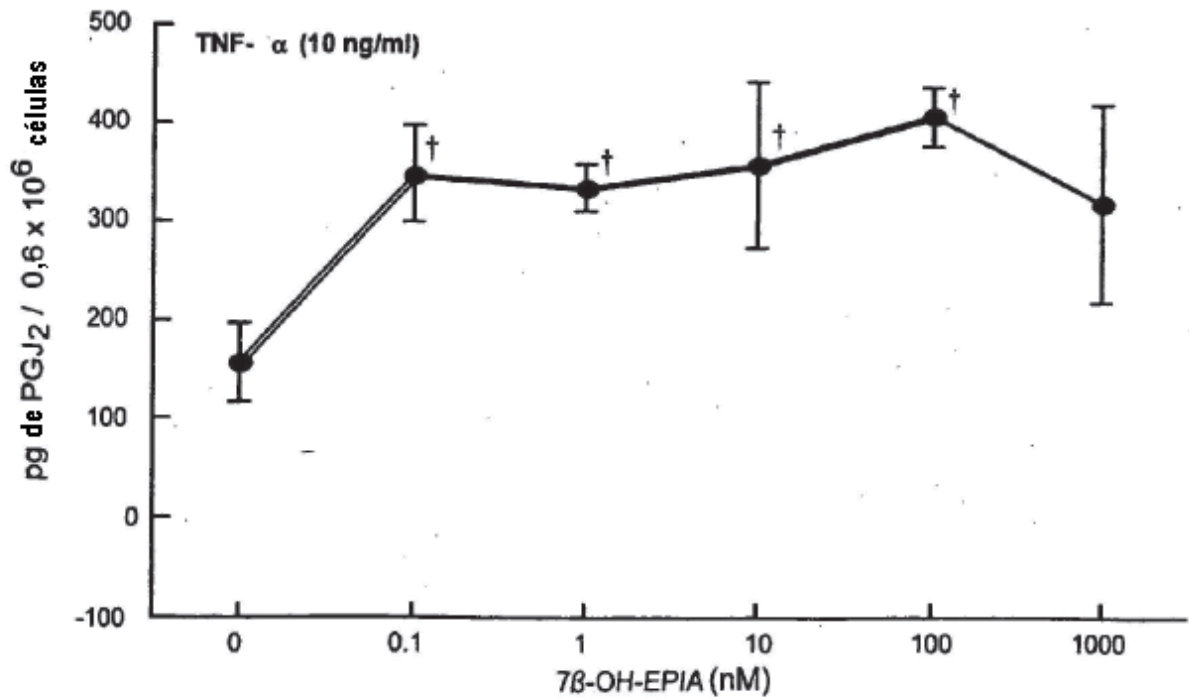


Fig.7(a)



† P < 0,05 en comparación con TNF α
 * P < 0,05 en comparación con el control de DMSO

Fig.7(b)

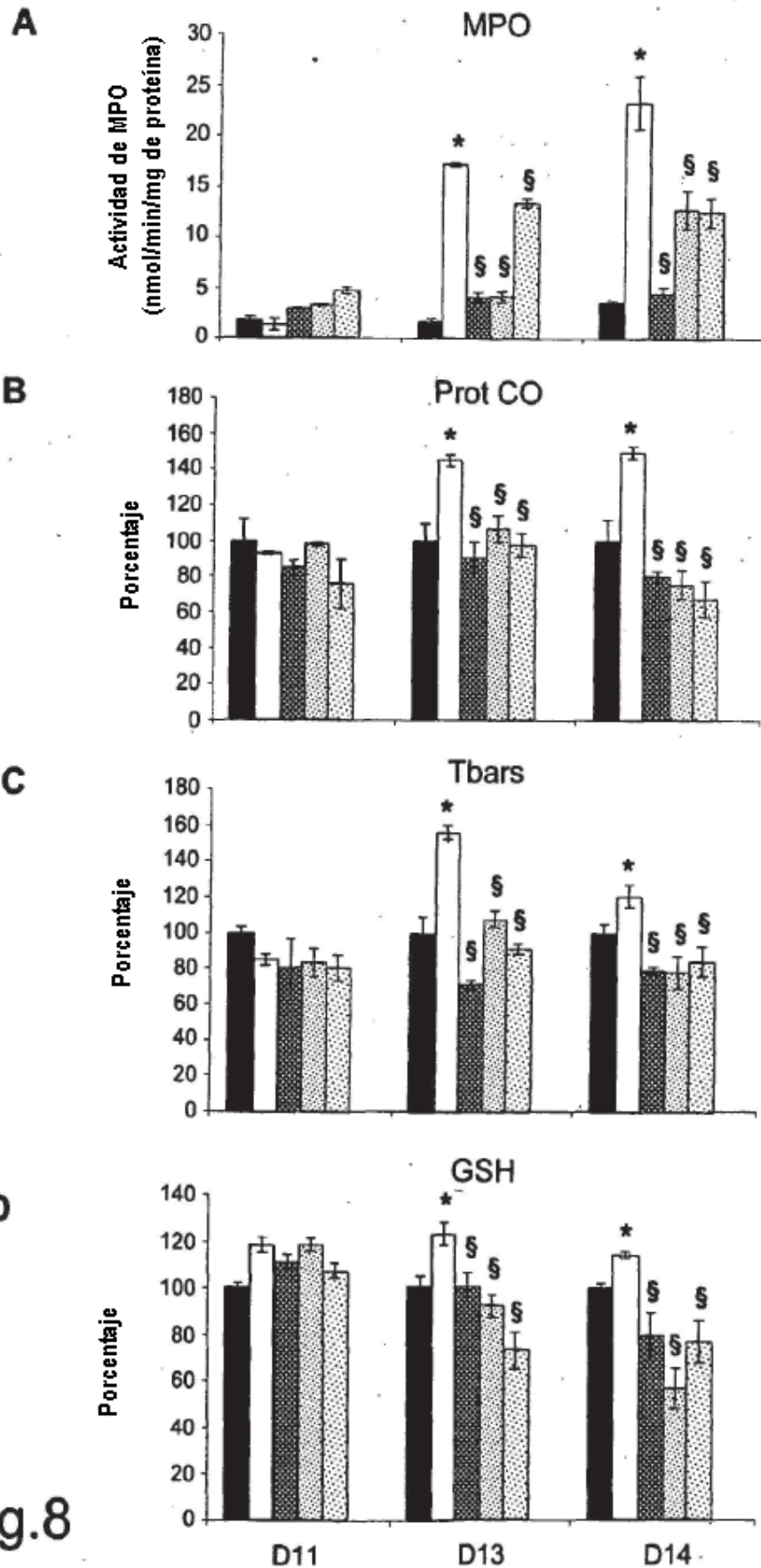


Fig.8

Administración de DSS (días) después del tratamiento con 7β-OH-EPIA

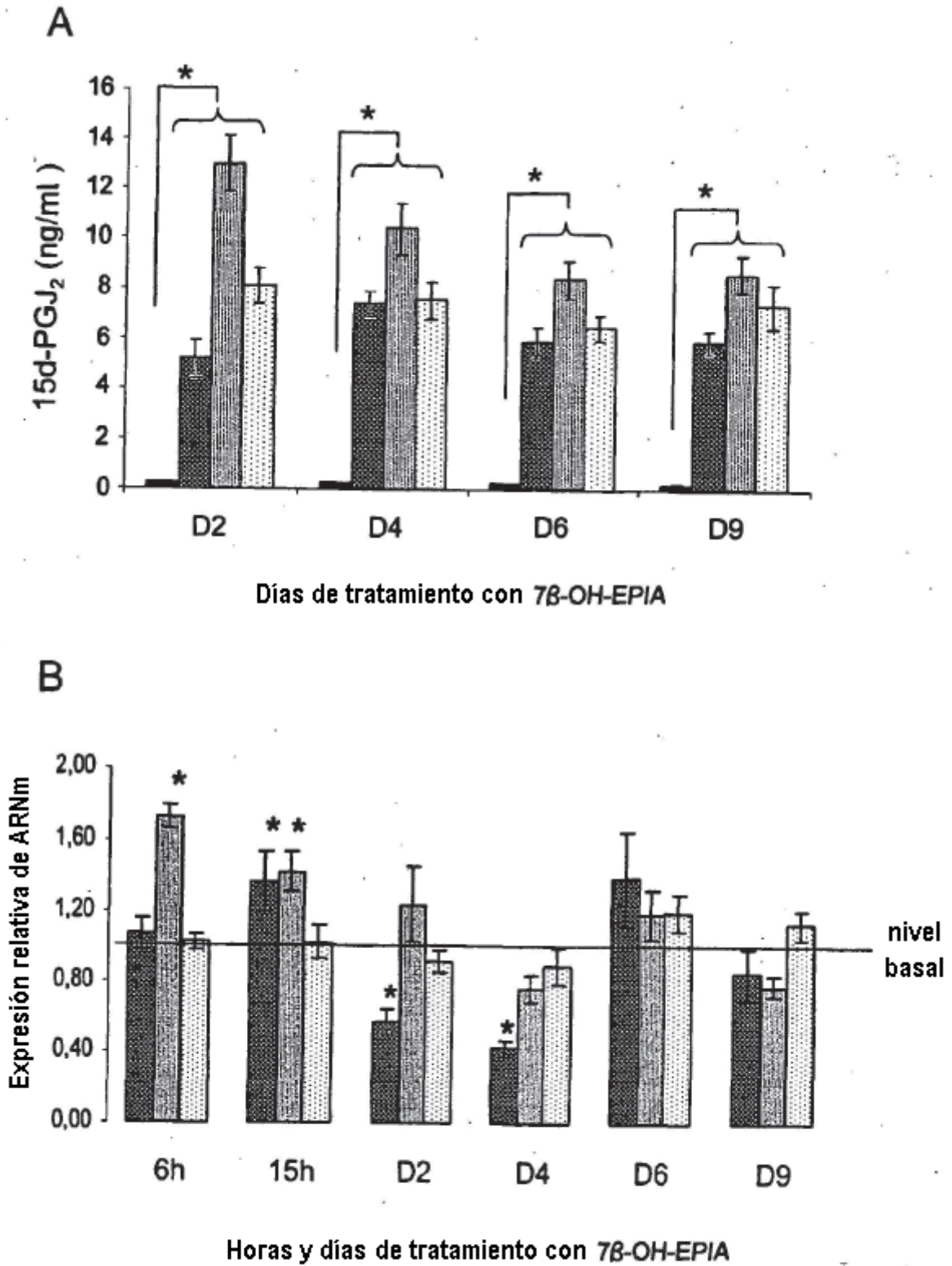


Fig.9

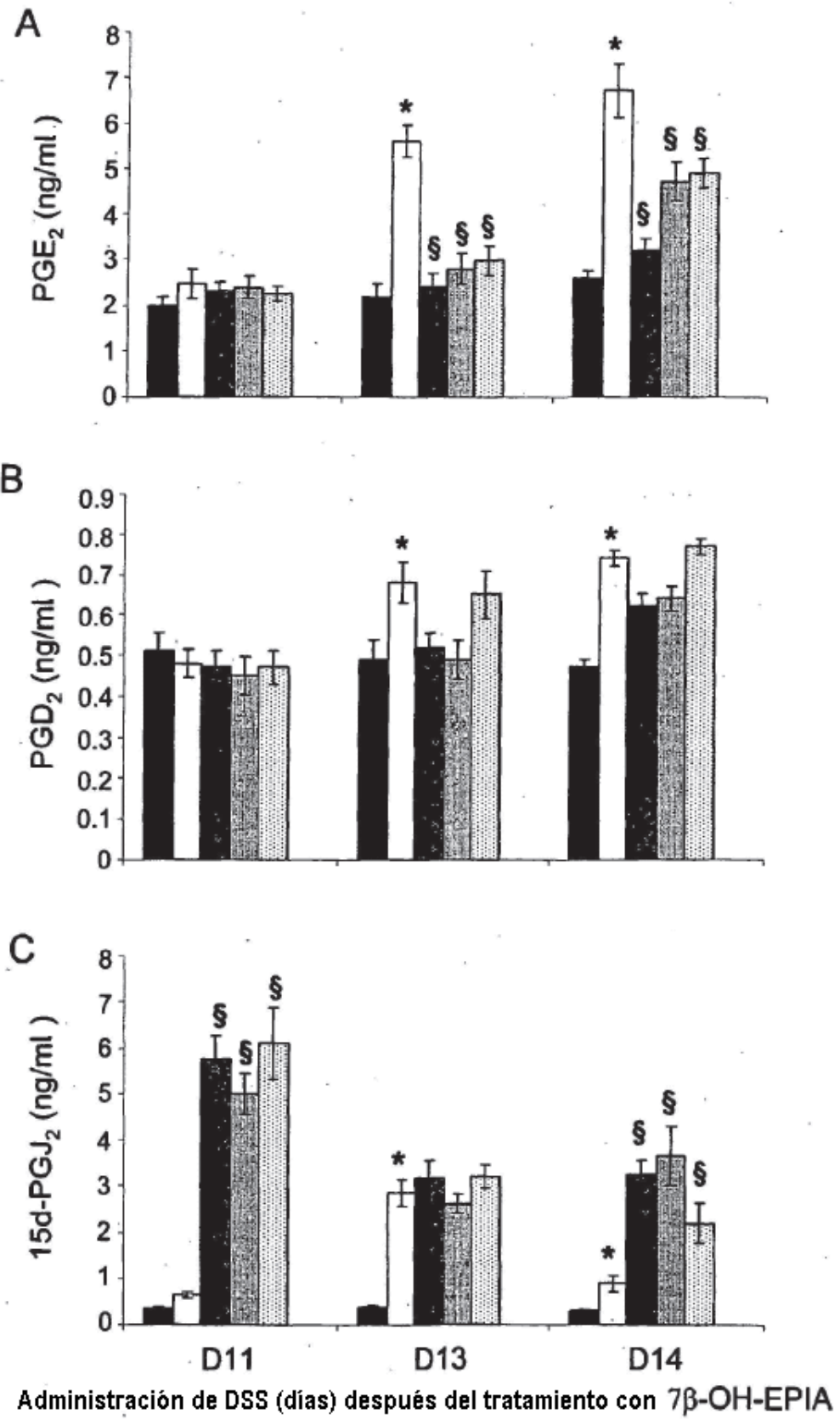


Fig 10

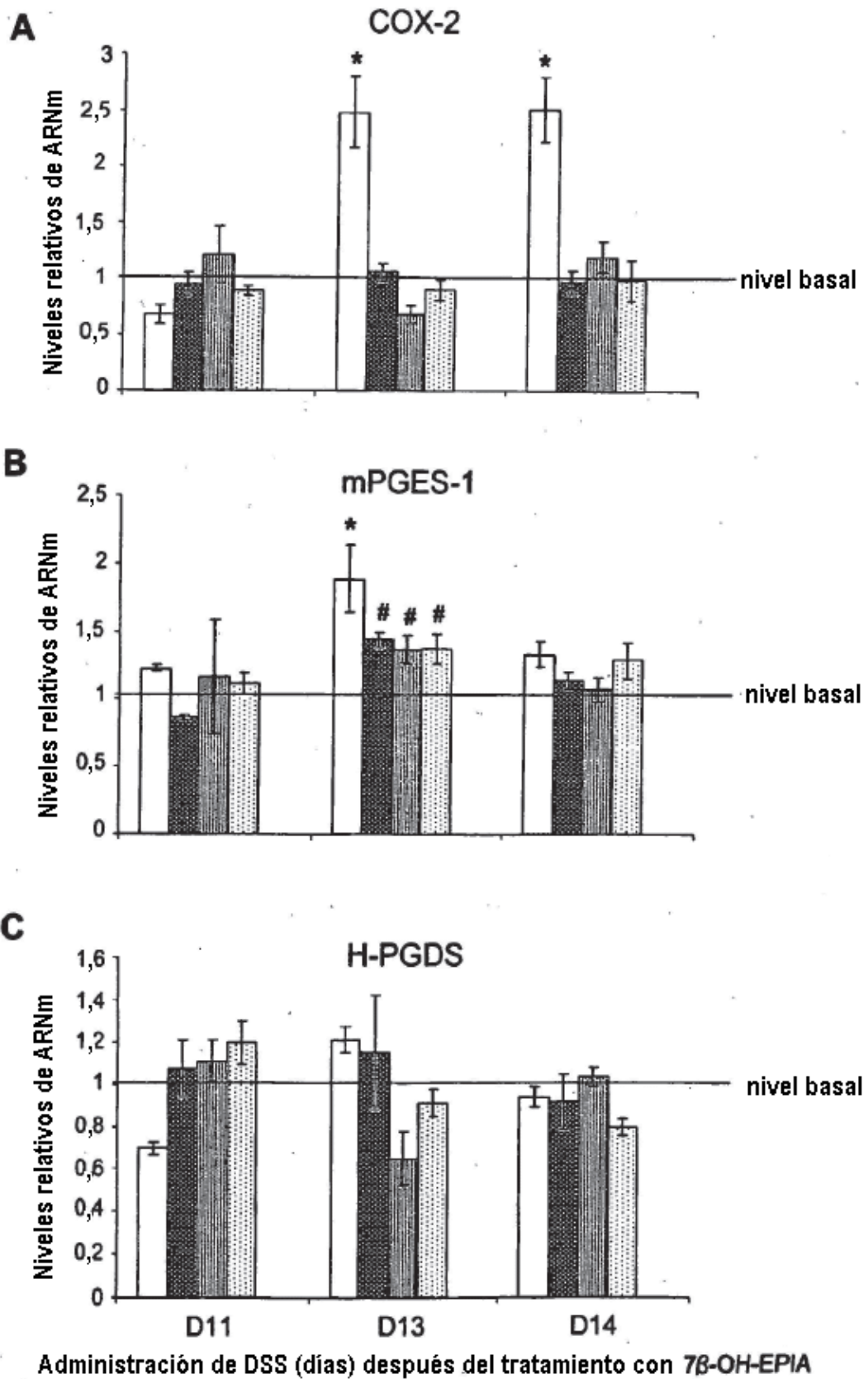


Fig.11