(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 399 147**

(51) Int. CI.:

A61K 36/282 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007 E 07837941 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2061484**

(54) Título: **Tratamiento, prevención y reversión de una enfermedad hepática alcohólica**

(30) Prioridad:

08.09.2006 US 842983 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2013

(73) Titular/es:

RHODE ISLAND HOSPITAL (100.0%)
OFFICE OF RESEARCH ADMINISTRATION
ALDRICH BUILDING, ROOM 321 593 EDDY STREET
PROVIDENCE, RI 02903, US

(72) Inventor/es:

DE LA MONTE, SUZANNE, MARIE y
WANDS, JACK, RAYMOND

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento, prevención y reversión de una enfermedad hepática alcohólica

Antecendentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención se encuentra en el campo del tratamiento médico. En particular, la invención se refiere a los métodos para el tratamiento, la prevención o la reversión de la enfermedad o lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol mediante la administración de al menos un agonista del receptor δ activado por los inductores de la proliferación de los peroxisomas (PPARδ).

Técnica relacionada

Cada vez hay más datos que apoyan que el etanol hace que los hepatocitos no sean sensibles a las acciones tróficas de los factores de crecimiento y las redes de citocinas. De hecho, los hepatocitos de rata en cultivo expuestos a etanol tienen una respuesta notablemente menor de síntesis de ADN estimulada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y por la insulina. Así pues, la exposición al etanol a corto y largo plazo altera la síntesis de ADN de los hepatocitos *in vitro* [Carter et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 128: 767 (1985); Carter et al., *Alcohol Clin. Exp. Res*. 12: 555 (1988)] y la capacidad que tiene el hígado para regenerarse después de la hepatectomía parcial [Diehl et al., *Gastroenterology* 99: 1105 (1990); Diehl et al., *Hepatology* 16: 1212; Wands et al., *Gastroenterology* 77: 528 (1979)]. Se conocen mal el o los mecanismos moleculares precisos mediante los cuales el etanol inhibe la proliferación de los hepatocitos. La regeneración del hígado está regulada por varios factores de crecimiento y citocinas, de los cuales se cree que los más importantes son el factor de la necrosis tumoral (TNF-α), el EGF, el factor α del crecimiento transformante (TGF-α), la interleucina (IL-6), el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) y la insulina [Michalopoulos et al., *Science* 276: 60 (1997); Pistol et al., *FASEB J*. 10: 819 (1996); Fausto, *J. Hepatol*. 32: 19 (2000)]. En este sentido, los primeros estudios sugerían que el etanol interfiere con las cascadas de transducción de señales activadas por el HGF [Saso et al., *Alcohol Clin. Exp. Res*. 20: 330A (1996)], el EGF [Zhang et al., *J. Clin. Invest*. 98: 1237 (1996); Higashi et al., *J. Biol. Chem*. 266: 2178 (1991); Saso et al., *Gastroenterology* 112: 2073)], o el TNF-α [Akerman et al., *Hepatology* 17: 1066 (1993)] y con las señales en las que interviene el Ca^{2+} en los hepatocitos [Sun et al., *Mol*. *Endocrinol*. 11: 251 (1997)]. Además, el consumo prolongado de etanol altera la expresión de las proteínas G e inhibe la señalización dependiente de AMP cíclico en la regeneración del hígado de las ratas [Diehl et al., *FASEB J*. 10: 215 (1996); Hoek et al., *FASEB J*. 6: 2386 (1992)]. Otras vías de transducción de señales también se ven afectadas adversamente por la exposición *in vivo* al etanol, como han mostrado varios investigadores. Por ejemplo, está alterado el acoplamiento de la proteína G al receptor del EGF [Zhang et al., *Biochem*. *Pharmacol*. 61: 1021 (2001)]; está alterada la expresión, inducida por el TNF-α, del NFκβ y de JNK después de la hepatectomía parcial [Diehl, *Clin*. *Biochem*. 32: 571 (1999)]; y se reduce la activación de p42/44, MAPK, p38 MAPK y JNK por la exposición prolongada o aguda al etanol [Chen et al., *Biochem*. *J*. 334: 669 (1998)].

Dado que los factores de crecimiento de los hepatocitos, tales como EGF, TGF-α, HGF e insulina, activan las tirosina cinasas receptoras, se han examinado los efectos del etanol sobre la transducción de señales en los que interviene la fosforilación de las tirosinas de sus sustratos intracelulares. Los trabajos anteriores establecieron la relevancia biológica de esta vía dado que el etanol es un potente inhibidor de la síntesis de ADN [Carter et al., *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. 128: 767 (1985); Diehl et al., *Gastroenterology* 99: 1105 (1990); Wands et al., *Gastroenterology* 77: 528 (1979); Duguay et al., *Gut* 23: 8 (1982)] y la transducción de señales en la que interviene tanto la insulina [Sasaki et al., *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. 199: 403 (1994)] como AMP cíclico [Diehl et al., *Hepatology* 16: 1212 (1992)]. Estos efectos del etanol pueden deberse al desacoplamiento de las vías de transducción de la señal de la insulina que intervienen en la mitogénesis [Sasaki et al., *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. 199: 403 (1994)]. De hecho, la señalización en la que interviene IRS-1 desempeña una función crítica en la regulación del crecimiento de los hepatocitos en el hígado adulto [Ito et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 16: 943 (1996); Nishiyama et al., *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. 183: 280 (1992); Sasaki et al., *J*. *Biol*. *Chem*. 268: 3805 (1993); Tanaka et al., *J. Biol*. *Chem*. 271: 14610 (1996); Tanaka et al. *Hepatology* 26: 598 (1997); Tanaka et al., *Cancer Res*. 56: 3391 (1996); Tanaka et al., *J. Clin. Invest*. 98: 2100 (1996)]. Se ha demostrado en un modelo de ratón transgénico (Tg) en el que IRS-1 se sobreexpresó bajo el control del promotor de la albúmina, que la masa del hígado era un 20-30% mayor en los ratones Tg respecto a los ratones de control que no son Tg, y que esta diferencia se mantuvo a lo largo de la vida adulta [Tanaka et al., *Hepatology* 26: 598 (1997)]. Este efecto de la sobreexpresión de IRS-1 se asoció a un incremento de la síntesis de ADN en los hepatocitos, y la activación constitutiva de las cascadas de PI3K y de MAPK Ras/Erk. En otros modelos, la expresión del ARN antisentido de IRS-1 o la microinyección de los anticuerpos contra IRS-1 inhibió la síntesis de ADN y el crecimiento estimulados por la insulina [Rose et al., *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA*. 91: 797 (1994); Waters et al., *J*. *Biol*. *Chem*. 268: 22231 (1993)]. De igual forma se encontró que un mutante de IRS-1 negativo/dominante bloqueaba la proliferación celular estimulada por la insulina y por el IGF-I [Tanaka et al., *J. Clin. Invest.* 98: 2100 (1996)]. Además, las investigaciones recientes demostraron que la activación de la señalización a través de IRS-1 es esencial para la síntesis de ADN y para la progresión del ciclo celular, y que IRS-1 interviene directamente en la transformación celular [Ito et al., *Mol. Cell. Biol*. 16: 943 (1996); Tanaka et al., *J. Biol*. *Chem*. 271: 14610 (1996); Tanaka et al., *Cancer Res*. 56: 3391

(1996); Tanaka et al., *J. Clin. Invest*. 98: 2100 (1996)]. Los efectos de la sobreexpresión de IRS-1 sobre el crecimiento celular parecen depender de la activación constitutiva de las cascadas de transducción de señales mitógenas [Ito et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 16: 943 (1996); Nishiyama et al., *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*. 183: 280 (1992); Sasaki et al., *J. Biol*. *Chem*. 268: 3805 (1993); Tanaka et al., *J. Biol. Chem*. 271: 14610 (1996); Tanaka et al., *Hepatology* 26: 598 (1997); Tanaka et al., *Cancer Res*. 56: 3391 (1996); Tanaka et al., *J*. *Clin*. *Invest*. 98: 2100 (1996)]. En conjunto, estos estudios resaltan la importancia de la señalización de insulina/IGF-I para el crecimiento del hígado y el posible efecto adverso de la resistencia a la insulina sobre el proceso de reparación hepática.

La insulina, un factor hepatótrofo bien conocido, actúa a través del receptor de la insulina (IR) para desempeñar una función importante en el crecimiento del hígado y en su metabolismo [Kharnzina et al., *Mol*. *Biol*. *Cell* 9: 193 (1998); White, *Recent Prog*. *Horm. Res*. 53: 119 (1998)]. Tras la unión a la subunidad IRα, la subunidad IRβ se autofosforila en los restos de tirosilo, lo que hace que mejore la actividad tirosilo cinasa del receptor [White, *Recent Prog*. *Horm*. *Res*. 53: 119 (1998)]. IRS-1 es un sustrato intracelular importante de la actividad tirosina cinasa del IR [Sun et al., *Nature* 352: 73 (1991)]. Los motivos de tirosilos fosforilados que se localizan dentro de la región del extremo carboxilo de la proteína IRS-1 [Myers et al., *Trends Biochem*. *Sci*. 19: 289 (1994)] transmiten las señales vía abajo a través de interacciones con moléculas que contienen SH2, que incluyen la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3K) [Backer et al., *EMBO J*. 11: 3469 (1992); Myers et al., *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA* 89: 10350 (1992)], la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2) [Skolnik et al., *Science* 260: 1953 (1993)], la fosfolipasa Cγ (PLCγ) [White, *Recent*. *Prog*. *Horm*. *Res*. 53: 119 (1998)], y la tirosilo fosfatasa SHP2/SyP [Sun et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 13: 7418 (1993)]. Estos acontecimientos de fijación son críticos para la activación de vías de señalización específicas, tales como la cascada de Ras/Raf/MAPKK/MAPK. Otra vía principal de interés implica la fijación de la subunidad p85 de PI3K a los motivos 613YMPM y 942YMKM de IRS-1 [Backer et al., *EMBO J*. 11: 3469 (1992); Myers et al., *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA* 89:10350 (1992)], lo que favorece la supervivencia celular inducida por la activación de Akt/proteína cinasa B (PKB) [Dudek et al., *Science* 275: 661 (1997); Eves et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 18: 2143 (1998)]. La PLCγ, al actuar sobre los fosfolípidos de la membrana, produce segundos mensajeros, fosfatos de inositol y diacilglicerol, implicados en el control de la concentración intracelular de Ca^{2+}, y la actividad de la proteína cinasa C [Carpenter et al., *Exp*. *Cell Res*. 253: 15 (1999); Sekiya et al., *Chem*. *Phys*. *Lipids* 98: 3 (1999)]. La secuencia del extremo amino de IRS-1 contiene tres dominios funcionales importantes que intervienen en la señalización: uno se ha identificado como una región con homología a la pleckstrina (PIT) [Musacchio et al., *Trends Biochem*. *Sci*. 18: 343 (1993)], y los otros dos son dominios de fijación de la fosfotirosina (PTB) [Sun et al., *Nature*, 377: 173 (1995); Gustafson et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 15: 2500 (1995)]. El dominio PH interviene en las interacciones de IRS-1 con la tirosina cinasa de tipo Janus Tyk-2 [Platanias et al., *J. Biol. Chem*. 271: 278 (1996)] y pueden intervenir en la interferencia entre IRS-1 y la proteína G [Touhara et al., *J. Biol. Chem*. 269: 10217 (1994)] o la señalización de los fosfolípidos [Harlan et al., *Nature* 371: 168 (1994)].

Una de las moléculas de señalización más importantes vía abajo captadas por las proteínas IRS es la PI3K, que fosforila los fosfoinosítidos en la posición D-3 [Carpenter et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 13: 1657 (1993); Dhand et al., *EMBO J*, 13: 511 (1994)]. Estos fosfolípidos activan la cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1), que fosforila a Akt, una serina cinasa (también denominada PKB) [Kandel et al., *Exp*. *Cell Res*. 253: 210 (1999); Franke et al., *Cell* 81: 727 (1995); Burgering et al., *Nature* 376: 599 (1995)] y activa a la cinasa de Akt. Muchos factores tróficos, entre ellos la insulina, utilizan la vía PI3K → PDK1 para incrementar la actividad de Akt. Los productos lipídicos de PI3K también pueden activar cinasas dependientes de los fosfoinosítidos, proteínas G pequeñas y moléculas de transducción de la señal de la proteína cinasa C [Avruch et al., *Mol*. *Cell*. *Biochem*. 182: 31 (1998); Le Good et al., *Science* 281: 2042 (1998); Zheng et al., *J*. *Biol*. *Chem*. 269: 18727 (1994)]. Además, los datos recientes sugieren que la PI3K puede controlar directamente la actividad de determinados componentes de la vía Ras/Raf/MAPK [Chaudhary et al., *Curr*. *Biol*. 10: 551 (2000)].

Varias dianas posteriores en la vía de la PI3K, tal como Akt, desempeñan una función crítica a la hora de regular la transcripción y destino de las células. Estos efectos requieren un equilibrio delicado y preciso de las señales necesario para la supervivencia y la muerte celular programada (apoptosis) [Burgering et al., *Nature* 376: 599 (1995); Franke et al., *Cell* 88: 435 (1997)]. La insulina induce la fosforilación de Akt en dos sitios (Thr308 y Ser473), con lo que se activa la cinasa de Akt de una manera dependiente de PI3K [Carpenter et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 13: 1657 (1993)]. GSK3β, una cinasa de proteínas en serina/treonina que se expresa de forma ubicua, es otro elemento clave de la vía PI3K/Akt [Kandel et al., *Exp*. *Cell*. *Res*. 253: 210 (1999); Avruch et al., *Mol*. *Cell*. *Biochem*. 182: 31 (1998)]. Que la actividad de GSK3β sea elevada favorece la apoptosis. La cinasa de Akt favorece la supervivencia e inhibe la apoptosis en parte mediante la fosforilación de GSK3 en la Ser 9/21 [Pap et al. *J. Biol. Chem*. 273: 19929 (1998)], que desactiva la cinasa e inhibe la actividad de GSK3β [Srivastava et al., *Mol*. *Cell*. *Biochem*. 182: 135 (1998); Cross et al., *Nature*, 378: 785 (1995)]. La actividad biológica de GSK3β es de interés particular porque esta cinasa puede regular el nivel y la actividad de la aspartilo (asparraginilo) β-hidroxilasa (AAH), que es un gen sensible al etanol y regulado por la insulina, y que es una diana posterior de la señalización de IRS-1 y un mediador importante de la migración celular.

La fosforilación, dependiente de Akt, de la proteína proapoptósica BAD, un miembro de la familia de Bcl-2, es otro acontecimiento clave para el proceso de la supervivencia celular. La cantidad de BAD y fosfo-BAD participa en la regulación del equilibrio entre la apoptosis y la supervivencia celular inducida por la insulina. La cinasa específica del sitio Ser112 de BAD es una proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) localizada en la membrana mitocondrial [Harada et al., *Mol. Cell*. 3: 413 (1999)], que favorece la interacción subcelular entre el sustrato y la cinasa mediante

la cual una proteína de la membrana mitocondrial externa, la proteína de anclaje de la cinasa A, sujeta a la holoenzima de PKA al orgánulo donde BAD es activa. Tras la exposición a un factor de supervivencia, tal como la insulina, la subunidad catalítica localizada de PKA fosforila a la BAD mitocondrial en la Ser112. La fosforilación de BAD en la Ser112 y en la Ser136 la inactiva y desplaza a BAD de la fijación a Bcl-2, lo que hace que BAD se traslade al citosol. Este proceso inhibe la apoptosis y favorece la supervivencia celular [Zha et al., *Cell* 87: 619 (1996)].

En la actualidad existen datos convincentes de que, en algunas circunstancias, la actividad de Akt puede inhibir la apoptosis al regular los factores de transcripción que controlan la expresión de los genes de muerte celular. Recientemente se ha demostrado que Akt regula el gen FKHRL1, un miembro de los factores de transcripción de la familia Forkhead. Cuando Akt se activa por estimulación de insulina/IGF-I, supuestamente a través de la vía de transducción de señales de IRS-1, fosforila a FKHRL1 y favorece su asociación con las proteínas chaperonas 14-3-3, lo que da lugar a la retención del factor de transcripción FKHRL1 en el citoplasma. En cambio, la fosforilación reducida de FKHRL1 por Akt puede conducir a su traslado al núcleo y la posterior activación de los genes destinatarios. En este sentido, una de las dianas más importantes de FKHRL1 es el gen del ligando (L) de Fas, que contiene 3 secuencias consenso para la fijación al ADN de FKHRL1. La fijación de FKHRL1 a la región del promotor de FasL incrementa la expresión del gen de FasL y promueve la muerte celular [Brunet et al., *Curr*. *Opin*. *Neurobiol*. 11: 297 (2001)]. Así pues, la inhibición de la señalización de Akt induce la expresión de FasL [Suhara et al., *Mol*. *Cell*. *Biol*. 22: 680 (2002)]. En este sentido, los hallazgos de los experimentos anteriores sugieren que el consumo rápido e intenso, o prolongado, de etanol podría conducir a una inducción de la expresión de FasL en las ratas y en los ratones [Deauciuc et al., *Alcohol Clin*. *Exp*. *Res*. 23: 349 (1999); Zhou et al., *Am*. *J*. *Pathol*. 159: 329 (2001); Deauciuc et al., *Hepatol*. *Res*. 19: 306 (2001); Castaneda et al., *J*. *Cancer Res*. *Clin*. *Oncol*. 127: 418 (2001)], aunque no se hayan determinado todavía el o los mecanismos. Se ha sugerido que la inducción del gen de FasL en el contexto del alcoholismo prolongado puede producirse a través de la reducción, dependiente de Akt, de la fosforilación de los factores de transcripción Forkhead, y este proceso activa los mecanismos de la muerte celular programada en los hepatocitos. Por consiguiente, es importante reconocer las consecuencias biológicas de las alteraciones inducidas por el etanol en los mecanismos de señalización tanto dependientes de IRS-1 como independientes de IRS-1, dado que incumben a la proliferación y la supervivencia de los hepatocitos.

Existen datos experimentales directos que indican que el etanol reduce la actividad de PI3K en el hígado mediante una vía dependiente de IRS-1. Sin embargo, la posibilidad de que haya otros posibles mecanismos de inhibición de PI3K por la acción del etanol condujo a examinar la expresión de PTEN en el hígado. La lógica de estos experimentos reside en que se ha encontrado que PTEN es un regulador negativo clave de la actividad de PI3K [Yamada et al., *J. Cell. Sci.* 114: 2375 (2001); Seminario et al., *Semin*. *Immunol*. 14: 27 (2002); Leslie et al*., Cell Signal.* 14: 285 (2002); Maehama et al., *Annu*. *Rev*. *Biochem*. 70: 247 (2001); Corner et al., *Cell* 109: 541 (2002)]. La molécula de PTEN tiene varios dominios conservados, tales como el dominio de fijación al fosfolípido C2, dos regiones PEST, un dominio de fijación PDZ y un motivo de fijación PIP2. Aunque al principio se describió que era gen supresor de tumores, ahora se ha determinado que los sustratos principales (*in vivo*) son PI (3, 4, 5) P_3 y PI (4, 5) P_2. La presencia de una mutación puntual que inactiva sólo el dominio de la fosfatasa lipídica de PTEN (G-129-E) es suficiente para producir un fenotipo $PTEN^-$ que incluye la pérdida de la supresión tumoral. Por otra parte, la sobreexpresión de PTEN bloquea la fosforilación de los tirosilos de IRS-1 y la formación del complejo IRS-1/Grb-2/SOS sin interferir en la fosforilación de tirosilos del receptor de la insulina. El efecto neto dentro de la célula es la inhibicón de la activación de MAPK, la progresión del ciclo celular y la proliferación [Weng et al., *Hum*. *Mol*. *Genet*. 10: 605 (2001)]. Estos hallazgos sugieren que PTEN regula negativamente las vías de señalización implicadas en la proliferación de los hepatocitos.

Así pues, es de gran interés respecto a los efectos del etanol en el hígado que PTEN desfosforila e inhibe el funcionamiento de PI3K [Dahia et al., *Hum*. *Mol*. *Genet*. 8: 185 (1999); Maehama et al., *Trends Cell*. *Biol*. 9: 125 (1999); Li et al., *Cancer Res*. 57: 2124 (1997)]. Y a la inversa, la inactivación de PTEN potencia el funcionamiento de PI3K y favorece el reclutamiento de la Akt de la membrana, lo que conduce a un incremento de la fosforilación de Akt y de la actividad cinasa de Akt [Kandel et al., *Exp*. *Cell*. *Res*. 253: 210 (1999); Maehama et al., *Trends Cell Biol*. 9: 125 (1999)]. Por consiguiente, cuando hay poca PTEN se incrementa la actividad cinasa de Akt y se favorece el crecimiento y la supervivencia, mientras que una gran cantidad de PTEN inhibe a PI3K/Akt y favorece la transmisión de las señales apoptósicas, así como la inhibición de la proliferación celular. Hay un incremento significativo de la expresión de PTEN y de la actividad fosfatasa en el tejido hepático procedente de ratas con exposición prolongada al etanol respecto a las ratas de control. Este fenómeno puede deberse a mecanismos transcripcionales, postranscripcionales o a ambos. En este sentido, la expresión de PTEN y su actividad fosfatasa están reguladas negativamente por la fosforilación [Torres et al., *J*. *Biol*. *Chem*. 276: 993 (2001)] y sugieren que la cantidad de PTEN puede estar controlada por la fosforilación inducida por la insulina en los cultivos primarios de hepatocitos, y que la exposición al etanol realza la actividad biológica y la cantidad de la proteína porque altera la fosforilación de la región del extremo carboxilo de la molécula. Es destacable que, en el tejido hepático expuesto al etanol, la magnitud del incremento de la expresión de PTEN esté acompañada de la potenciación de la actividad de GSK-3β, coherente con los efectos inhibidores esperados de PTEN sobre la señalización vía abajo a través de PI3K. Esta observación sugiere que el etanol puede tener un efecto importante en el hígado sobre la muerte celular programada, así como sobre las vías proliferativas, a través de la modulación de la expresión de PTEN.

La importancia biológica cuando se aplica a enfermedades humanas es que el etanol puede afectar adversamente a

las cascadas de señalización específicas relacionadas con la proliferación y la supervivencia de los hepatocitos que están reguladas por la insulina y por los factores de crecimiento insulinoides (IGF-I y IGF-II), y las cascadas de transducción de señales independientes de IRS-1 y dependientes de IRS-1. Hay efectos del etanol sobre el sistema de Fas, que parecen estar unidos a la alteración de la señalización de PI3K/Akt. Las vías de proliferación y de supervivencia a través de IRS-1 y PI3K se ven alteradas sorprendentemente por la exposición prolongada al etanol *in vivo*, y la vía de señalización de Fas podría contribuir a la apoptosis de los hepatocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, cada vez hay más datos que indican que el etanol induce la expresión de FasL, y que puede desempeñar una función importante en la lesión de los hepatocitos observada en los alcohólicos con enfermedad hepática, pero siguen sin conocerse el o los mecanismos moleculares de las alteraciones del receptor de Fas (R)/FasL debidas al etanol [Benedetti et al., *J. Hepatol*. 6, 137 (1988); Natori et al., *J. Hepatol*. 34: 248 (2001); Goldin et al., *J. Pathol*. 171: 73 (1993); Nanji, *Semin*. *Liver Dis*. 18: 187 (1998); Higuchi et al., *Hepatology* 34: 320 (2001)].

Otro efecto adverso del consumo prolongado de etanol en el hígado se refiere al estrés oxidativo que se manifiesta mediante la peroxidación lipídica y daños en el ADN. En este sentido, que el hígado esté expuesto al etanol incrementa la producción celular de las especies reactivas del oxígeno (ERO) que incluyen el H_2O_2. Cuando ocurre esto, las defensas antioxidativas son inadecuadas, disminuye la viabilidad de los hepatocitos y se producen lesiones hepáticas [Sohn et al., *J. Neurol. Sci*, 162: 133 (1999); Tanaka et al., *J. Clin*. *Invest*. 103: 341 (1999); Diehl et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: 1 (2005)]. En este cuadro clínico hay un incremento de la inflamación del hígado que conduce a enfermedad crónica, tal como hígado graso, hepatitis alcohólica, cirrosis y, en algunos casos, el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Por consiguiente, el consumo prolongado de etanol tiene dos efectos adversos importantes sobre el hígado, a saber, la inducción y perpetuación de la lesión hepática a través del estrés oxidativo, lesión mitocondrial, inducción de las vías de la muerte celular programada, daños en el ADN e inhibición del proceso de reparación hepática (a saber, regeneración del hígado) principalmente a través de las cascadas de transducción de la señal de insulina/IGF-1, y es una de las causas principales de enfermedad hepática en los humanos por todo el planeta.

La magnitud de este problema se ilustra mediante lo siguiente: aproximadamente el 67% de los adultos consumen alcohol y 14 millones de estadounidenses satisfacen los criterios para el abuso y/o dependencia del alcohol. En este contexto, la enfermedad hepática alcohólica afecta a más de 2 millones de estadounidenses y muchos más por todo el planeta. Las consecuencias clínicas son que el 40% de las personas con enfermedad hepática alcohólica mueren de cirrosis hepática. Por lo tanto, existe una necesidad real de descubrir formas de prevenir o tratar estas temidas complicaciones del alcoholismo.

Se sabe que los agonistas de PPAR-α revierten el hígado graso a pesar del consumo continuo de alcohol (véase Crabb, D, W. «Alcohol deranges hepatic lipid metabolism via altered transcriptional regulation», TRANSATIONS OF THE AMERICAN CLINICAL AND CLIMATOLOGICAL ASSOCIATION, NOVERLY PRESS, vol. 115, 1 de enero de 2004, páginas 273-287).

Compendio de la invención

Se ha demostrado que existe una relación entre la lesión hepática alcohólica y la resistencia a la insulina mediante el hallazgo de una alteración de la respuesta a la insulina y alteraciones en las vías de insulina/IGF en el hígado de animales con una ingesta prolongada de alcohol. Estos hallazgos definen una conexión entre la enfermedad hepática alcohólica y la vía de señalización de insulina/IGF que se puede explotar para propósitos terapéuticos.

Esta invención se refiere al descubrimiento sorprendente de que la administración de determinados agonistas de los PPAR (receptores activados por los inductores de la proliferación de los peroxisomas) inhiben sorprendentemente el estrés oxidativo y los daños en el ADN del hígado utilizando un modelo animal de enfermedad hepática alcohólica y, más importante, mejoran considerablemente la regeneración hepática. El efecto neto es que se atenúa o impide la lesión hepática desencadenada por el etanol y se acelera enormemente el proceso de reparación hepática. Esta invención tiene implicaciones importantes para el tratamiento de la lesión hepática y de la enfermedad hepática alcohólica.

Así pues, un aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz de agonista selectivo de PPAR-δ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la reversión de una enfermedad hepática alcohólica en un animal.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz de agonista selectivo de PPAR-δ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal.

En una realización, la invención se refiere a la utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista selectivo de PPAR-δ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la reversión de la resistencia a la insulina en el hígado de un animal producida por la ingesta prolongada de alcohol.

En otra realización, la invención se refiere a la utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ en la fabricación de un medicamento para estimular o restaurar la respuesta regenerativa hepática en un animal con ingesta prolongada de alcohol.

Sorprendentemente, se ha descubierto que los agonistas de PPAR son particularmente eficaces para el tratamiento y la prevención de la lesión hepática en los animales en alimentación prolongada con alcohol, un modelo de enfermedad hepática alcohólica. Además, en este modelo, los agonistas de PPAR rescatan la alteración de la regeneración hepática debida al etanol. Así pues, se espera que a los pacientes humanos que son alcohólicos crónicos o que sufren una lesión hepática alcohólica o una enfermedad hepática alcohólica, se les pueda administrar agonistas de PPAR para impedir o enlentecer la formación de más lesiones hepáticas, para favorecer la regeneración de tejido hepático sano y para tratar o mejorar los síntomas de la lesión hepática o de la enfermedad hepática.

También describimos un modelo animal de lesión y enfermedad hepática alcohólica producidas por la alimentación prolongada con etanol en las ratas Long-Evans. Sorprendentemente, se ha descubierto que las ratas Long-Evans muestran una respuesta robusta a la alimentación con etanol en comparación con otras cepas de rata, lo que las convierte idealmente en adecuadas para el estudio de los efectos de la ingesta prolongada de alcohol.

Opcionalmente, el etanol está incluido en la dieta diaria de las ratas Long-Evans. Por ejemplo, el etanol puede comprender aproximadamente el 0%, 2%, 4,5%, 6,5%, 9,25% (v/v) (equivalente al 0%, 8%, 18%, 26% o 37% del contenido calórico) o más de la dieta diaria.

Además describimos un método para escrutar en busca de un fármaco que sea potencialmente útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica, que comprende la administración de un fármaco al modelo animal producido mediante la alimentación prolongada con etanol en las ratas Long-Evans y determinar el nivel de lesión hepática, de resistencia a la insulina y/o de respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el fármaco, en donde una mejora del nivel de la lesión hepática, de la resistencia a la insulina y/o de la respuesta de la regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al que no se administró el fármaco indica que el fármaco es potencialmente útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica.

Adicionalmente describimos un método para evaluar un posible tratamiento para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica, que comprende la administración del posible tratamiento al modelo animal producido por la alimentación prolongada con etanol en las ratas Long-Evans y determinar el nivel de la lesión hepática, de la resistencia a la insulina y/o de la respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al que no se ha administrado el posible tratamiento, en donde una mejora en el nivel de la lesión hepática, de la resistencia a la insulina y/o de la respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al que no se ha administrado el posible tratamiento indica que el tratamiento es potencialmente útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 muestra la lesión hepática (arriba), la potenciación de la peroxidación lipídica (en el centro) y los daños en el ADN (abajo) mediante la alimentación prolongada con etanol en comparación con la pareja de control en alimentación isocalórica.

Las figuras 2A-2F muestran la medición de la expresión del gen de la insulina, el IGF-I y el IGF-II en los animales con etanol y en los animales de control (A, B, y C) en comparación con la expresión de su receptor correspondiente (D, E, y F) mediante RT-PCR en tiempo real.

Las figuras 3A-3C muestran la reducción de la fijación de la insulina a su receptor en las ratas en alimentación prolongada con etanol (A). Obsérvese que no hay cambios en la fijación del receptor a IGF-I o IGF-II en comparación con los controles (B, C).

Las figuras 4A-4C muestran que no hay diferencias en la expresión génica de IRS-1, 2 y 4 entre los animales alimentados con etanol y los controles (A-C). Obsérvese la disminución de la expresión de AAH, que es un gen que responde a la insulina, en el grupo de alimentación prolongada con etanol (D). Este resultado demuestra que el hígado es resistente a la insulina.

La figura 5 muestra que la alimentación prolongada con etanol afecta a la regeneración hepática según se midió mediante la incorporación de BrdU a las 24 horas de la hepatectomía parcial.

La figura 6 muestra que los agonistas de PPAR rescatan la inhibición de la regeneración hepática inducida por el etanol. Obsérvese que el tratamiento con el agonista de PPAR-δ devuelve la respuesta regenerativa del hígado al nivel normal según se midió mediante la incorporación de BrdU. Los agonistas de PPAR-δ y de PPAR-α tienen efectos beneficiosos más modestos sobre la reparación hepática.

La figura 7 muestra las pruebas de que los agonistas de PPAR rescatan los efectos del etanol prolongado sobre la peroxidación lipídica según se midió mediante la inmunorreactividad del HNE. Obsérvese que los ligandos de PPAR α, γ y δ funcionan igualmente bien en la prevención de la lesión celular en el hígado.

La figura 8 muestra que los daños en el ADN producidos por el consumo prolongado de alcohol se atenúan con los

agonistas de PPAR. Obsérvese que el ligando de PPAR-δ es mejor que el de α y γ a la hora de prevenir lesiones en los hepatocitos.

Las figuras 9A-9L muestran el efecto de los agonistas de PPAR sobre la estructura del hígado en los animales de control.

Las figuras 10A-10L muestran el efecto de los agonistas de PPAR sobre la estructura del hígado en los animales alimentados con etanol.

Las figuras 11A-11F muestran el efecto de los agonistas de PPAR sobre los perfiles de los hepatocitos en los animales de control y en los alimentados con etanol.

Las figuras 12A-12I muestran el efecto del etanol y de los agonistas de PPAR sobre la expresión hepática de los polipéptidos de la insulina y de los IGF, sus receptores y las moléculas IRS.

Las figuras 13A-13H muestran el efecto de los tratamientos con etanol y con los agonistas de PPAR sobre la fijación de la insulina al receptor.

Las figuras 14A-14H muestran el efecto de los tratamientos con etanol y con los agonistas de PPAR sobre la fijación del IGF-I al receptor.

Las figuras 15A-15H muestran el efecto de los tratamientos con etanol y con los agonistas de PPAR sobre la fijación del IGF-II al receptor.

Las figuras 16A-16D muestran el efecto de los tratamientos con etanol y con los agonistas de PPAR sobre la expresión de AAH y de GAPDH mediante el análisis Western.

Las figuras 17A-17C muestran el efecto de los tratamientos con etanol y con los agonistas de PPAR sobre la expresión de AAH y de GAPDH mediante el análisis ELISA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la importante función desempeñada por el incremento de la resistencia a la insulina en la aparición de lesión y enfermedad hepáticas alcohólicas y la capacidad de los agonistas de PPAR para prevenir o tratar la lesión hepática y restaurar la respuesta de regeneración hepática. La administración de agonistas de PPAR a los animales en ingesta prolongada de alcohol bloquea la lesión hepática que se produce en respuesta a la ingesta de alcohol, que incluye el daño debido al estrés oxidativo (p. ej., peroxidación lipídica) y los daños en el ADN. Además, la administración de los agonistas de PPAR revierte la inhibición de la respuesta de la regeneración hepática que se produce durante la ingesta prolongada de alcohol. Por consiguiente, la invención se refiere un agonista selectivo de PPAR-δ con el objeto de utilizarlo en el tratamiento, la prevención o la reversión de una enfermedad hepática alcohólica en un animal.

Otro aspecto de la invención se refiere a un agonista selectivo de PPAR-δ con el objeto de utilizarlo en el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal.

En una realización, la invención se refiere a un agonista selectivo de PPAR-δ con el objeto de utilizarlo en el tratamiento, la prevención o la reversión de la resistencia a la insulina en el hígado de un animal producida por la ingesta prolongada de alcohol.

En otra realización, la invención se refiere a un agonista selectivo de PPAR-δ para la utilización en la estimulación o restauración de la respuesta regenerativa hepática en un animal con una ingesta prolongada de alcohol.

En una realización de la invención, dicho tratamiento comprende la administración de al menos dos agonistas de PPAR diferentes. En otra realización, se da a conocer la administración de al menos tres agonistas de PPAR diferentes. En una realización, los agonistas PPAR se fijan a al menos dos subtipos diferentes de receptores de PPAR, p. ej., α y δ, o δ y γ. En otra realización, los agonistas de PPAR se fijan a los tres subtipos de receptores PPAR. Los agonistas de PPAR pueden incluir compuestos que se fijan selectivamente a un subtipo de receptor PPAR y/o compuestos que se fijan a más de un subtipo de receptor PPAR.

La terminología «enfermedad hepática alcohólica», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al espectro de cambios anatomopatológicos clínicos en el hígado ocasionados por la ingesta de alcohol. Las enfermedades de una enfermedad hepática alcohólica incluyen hígado graso (esteatosis), hepatitis alcohólica y cirrosis alcohólica.

La terminología «ingesta prolongada de alcohol», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a que un animal consume de media al menos aproximadamente 0,1 g de alcohol puro (etanol) por kilogramo de masa corporal al día, p. ej., de media al menos aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, o 5 (g/kg)/día. Para un humano se considera que la ingesta prolongada de alcohol es de media al menos de aproximadamente 10 g de alcohol puro al

día, p. ej., de media al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 g/día.

La terminología «cantidad terapéuticamente eficaz», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad suficiente de fármaco terapéutico que da lugar a una mejoría de uno o más síntomas de un trastorno, o que previene el avance de un trastorno, o que ocasiona la regresión del trastorno. Por ejemplo, respecto al tratamiento de una enfermedad hepática, en una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz se referirá a la cantidad de un fármaco terapéutico que disminuye el número de hepatocitos lesionados, que enlentece el ritmo al que se incrementa el número de hepatocitos lesionados, que incrementa la velocidad de la regeneración hepática o que incrementa el tiempo de supervivencia al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 100%. En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz se referirá a la cantidad de un agente terapéutico que incrementa una función biológica del hígado al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 100%. La función hepática puede medirse con ensayos que son convencionales en la medicina clínica, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, la medición de las transaminasas [p. ej., alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST)], la γ-glutamil transpeptidasa (GGT), el volumen corpuscular medio (MCV, por su nombre en inglés), el tiempo de la protrombina, el número de plaquetas, la bilirrubina, la albúmina y/o la fosfatasa alcalina. En una realización más, una cantidad terapéuticamente eficaz se referirá a la cantidad de un fármaco terapéutico que disminuye la resistencia a la insulina en el hígado al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 100%. La resistencia a la insulina puede medirse con ensayos que son convencionales en la técnica y los que se explican en la presente memoria, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, la medición de la insulina fijada al receptor de la insulina, pruebas de tolerancia a la glucosa y la expresión de los genes que responden a la insulina.

La terminología «prevenir», «que previene» y «prevención», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una disminución de la presencia de células patológicas (p, ej., hepatocitos lesionados) en un animal. La prevención puede ser completa, p. ej., la ausencia total de células patológicas en un sujeto. La prevención puede ser también parcial, de tal forma que la presencia de células patológicas en un sujeto es menor de la que habría aparecido sin la presente invención.

En un aspecto de la invención se da a conocer un agonista selectivo de PPAR-δ con el objeto de utilizarlo en el tratamiento, la prevención o la reversión de una enfermedad hepática alcohólica en un animal. En determinadas realizaciones, el tratamiento comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agonista selectivo de PPAR-δ. El agonista selectivo de PPAR-δ se puede administrar antes o después de la aparición de los síntomas físicos o histológicos de una enfermedad hepática. En una realización, la enfermedad hepática es esteatosis, hepatitis alcohólica o cirrosis alcohólica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un agonista selectivo de PPAR-δ con el objeto de utilizarlo en el tratamiento, la prevención o la reversión de una lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal. En determinadas realizaciones se da a conocer una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agonista selectivo de PPAR-δ. El agonista selectivo de PPAR-δ puede administrarse antes o después de la aparición de los síntomas físicos o histológicos de una lesión hepática. La lesión hepática puede ser cualquier tipo de lesión celular o hística asociada a la ingesta de alcohol. Por ejemplo, la lesión puede estar asociada al estrés oxidativo (p. ej., peroxidación lipídica) o daños en el ADN. La terminología «asociado a», tal y como se utiliza en la presente memoria, significa que la lesión hepática alcohólica se pone de manifiesto mediante los signos físicos (p. ej., histológicos, serológicos) de una afección (p. ej., estrés oxidativo o daños en el ADN).

En una realización, la invención se refiere a un agonista selectivo de PPAR-δ con el objeto de utilizarlo en el tratamiento, la prevención o la reversión de la resistencia a la insulina en el hígado de un animal producida por la ingesta prolongada de alcohol. En determinadas realizaciones, el agonista selectivo de PPAR-δ se encuentra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El agonista selectivo de PPAR-δ se puede administrar antes o después de la aparición de la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina se puede deber a alteraciones inducidas por el alcohol en cualquier punto a lo largo de las vías de señalización de insulina/IGF, p. ej., disminución de la fijación de la insulina al receptor de la insulina, disminución de la expresión de IGF-I, incremento de la expresión de IGF-II, incremento de la expresión de los receptores para IGF-I e IGF-II, o disminución de la expresión de los genes que responden a la insulina, tal como AAH.

La resistencia a la insulina se puede medir mediante la detección de una alteración de la cantidad o actividad de al menos un factor de la vía de señalización de insulina/IGF. En una realización, la detección de una alteración se lleva a cabo *in vivo*. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de imagen (p. ej, resonancia magnética, tomografía axial

computerizada, tomografía computerizada de emisión de fotón único, tomografía de emisión de positrones, rayos X, ultrasonidos) en combinación con anticuerpos marcados para detección, ligandos, sustratos enzimáticos, etc., para determinar la cantidad o actividad de al menos un factor de la vía de señalización de insulina/IGF en un sujeto. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero sin limitarse a ellos, marcadores radioactivos, fluorescentes, paramagnéticos y superparamagnéticos. Puede utilizarse en la presente invención cualquier técnica de imagen *in vivo* conocida en la técnica. Ejemplos de técnicas de imagen se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 6.737.247, 6.676.926, 6.083.486, 5.989.520, 5.958.371, 5.780.010, 5.690.907, 5.620.675, 5.525.338, 5.482.698 y 5.223.242.

En otra realización, la detección de una alteración se lleva a cabo *in vitro*, p. ej., utilizando una muestra biológica. Una muestra biológica puede ser cualquier tejido o líquido de un sujeto que es idóneo para detectar la cantidad o actividad de al menos un factor de la vía de señalización de insulina/IGF. Los ejemplos de muestras útiles incluyen, pero sin limitarse a ellos, tejidos hepáticos de biopsia, sangre, plasma, líquido seroso, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina y linfa.

Los factores de la vía de la señalización de insulina/IGF que se pueden detectar y medir incluyen, pero sin limitarse a ellos, insulina, factor de crecimiento I de tipo insulinoide (IGF-I), IGF-II, receptor de la insulina, receptor del IGF-I, receptor del IGF-II, receptor de la insulina fosforilado en tirosina, receptor de IGF-I fosforilado en tirosina, receptor de IGF-II fosforilado en tirosina, sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1), IRS-2, IRS-4, IRS-1 fosforilado en tirosina, IRS-2 fosforilado en tirosina, IRS-4 fosforilado en tirosina, fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la subunidad p85 de la PI3K, Akt, fosfo-Akt, cinasa-3β de la glucógeno sintasa (GSK-3β) y fosfo-GSK-3β. Las actividades que se pueden medir incluyen, pero sin limitarse a ellas, la capacidad de fijación al ligando del receptor de la insulina, del receptor de IGF-I, o del receptor de IGF-II, actividad cinasa del receptor de la insulina, del receptor de IGF-I, o del receptor de IGF-II, interacción de la subunidad p85 de la PI3K con IRS-1, IRS-2 o IRS-4 fosforilados, fijación de IRS-1, IRS-2 o IRS-2 fosforilados a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2), tirosina fosfatasa de la proteína SHPTP-2, o la subunidad p85 de la PI3K, la actividad enzimática de la cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKK), Erk MAPK, Akt/proteína cinasa B, Ask-3β.

La abundancia de los factores de la vía de señalización de insulina/IGF se puede medir a nivel de la proteína o del ARN (p. ej., ARNm). En los presentes métodos puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para cuantificar proteínas específicas en una muestra biológica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, inmunoensayos, transferencia Western, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, electroforesis en gel, electroforesis capilar, cromatografía en columna, ensayos de fijación a ligando y ensayos enzimáticos. Véase, p. ej., Harlow et al., *Antibodies*: *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 3.ª edición, (1995).

Para medir la cantidad de un ARN específico se puede utilizar en la invención cualquier ensayo conocido en la técnica para la detección de ácidos nucleicos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ensayos de amplificación y transcripción inversa (retrotranscripción), ensayos de hibridación, transferencia Northern, transferencia puntiforme, hibridación *in situ*, electroforesis en gel, electroforesis capilar y cromatografía en columna. Véase, p, ej., Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 3.ª ed, (1995); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ª ed, vol 1-3 (1989). El ensayo puede detectar el propio ARN o un ADNc generado mediante la transcripción inversa del ARN. Los ensayos se pueden realizar directamente con muestras biológicas o con ácidos nucleicos aislados de las muestras.

En otra realización, la invención se refiere a un agonista selectivo de PPAR-δ que estimula o restaura la respuesta regenerativa hepática en un animal. En determinadas realizaciones se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agonista de PPAR. El agonista selectivo de PPAR-δ se puede administrar antes o después de la reducción en la respuesta regenerativa hepática. El incremento de la respuesta regenerativa inducida por un agonista selectivo de PPAR-δ puede ser al menos aproximadamente el 10% mayor que la respuesta regenerativa observada en ausencia del agonista de PPAR, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% mayor. La medición de la respuesta regenerativa hepática se pude llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como la medición de la velocidad de síntesis de ADN.

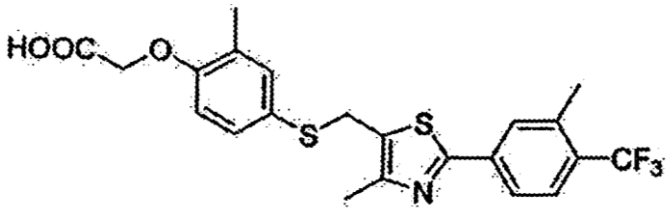
Los compuestos y los medicamentos de la invención se pueden administrar a animales que muestran una enfermedad que es resultado de lesión o enfermedad hepática, animales en los que se sospecha que muestran una enfermedad que es resultado de lesión o enfermedad hepática y animales que corren un riesgo de mostrar una enfermedad que es resultado de lesión o enfermedad hepática. Por ejemplo, se puede tratar preventivamente los que tienen una predisposición genética al alcoholismo o los que son bebedores moderados, pero que ya tienen una lesión hepática por otras razones (p, ej., hepatitis vírica).

Los agonistas de PPAR que se pueden utilizar en la presente invención incluyen los agonistas selectivos de PPAR-δ, como se describe en las patentes de los EE.UU. n.º 6.713.514, 6.677.298, 6.462.046, 5.925.657 y 5.326.770 y en Combs et al., *J. Neurosci*. 20: 558 (2000). La terminología selectivo se utiliza para describir fármacos que tienen una actividad de más de 10 veces, preferiblemente más de 100 veces y lo más preferiblemente más de 1000 veces, mayor en un subtipo del receptor PPAR que en otro subtipo de receptor PPAR. La caracterización de la afinidad del receptor y la actividad funcional para los fármacos en los subtipos de receptor PPAR se puede determinar con la

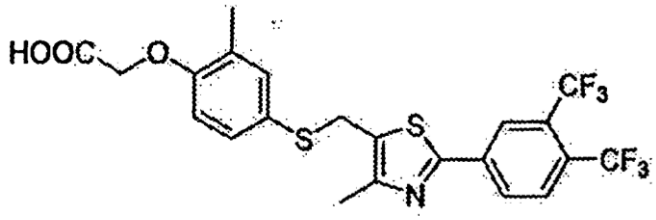
metodología que se describe en la patente internacional WO 2005049572. La utilización de los agonistas de PPAR-δ en los pacientes con enfermedad hepática puede tener la ventaja añadida de incrementar el número de fibras musculares de tipo I, lo que puede conferir resistencia a la obesidad y mejorar el perfil metabólico, incluso sin hacer ejercicio [Wang et al., *PloS Biol*. 2: 3294 (2004)].

Los agonistas selectivos de PPAR-δ incluyen, sin limitación, GW-501516, GW-0742, L-165041 y carbaprostaciclina, que se definen estructuralmente del siguiente modo:

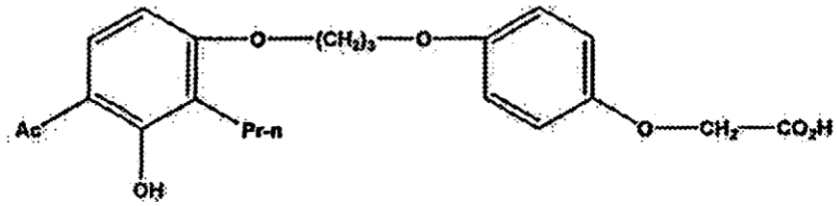
GW-501516



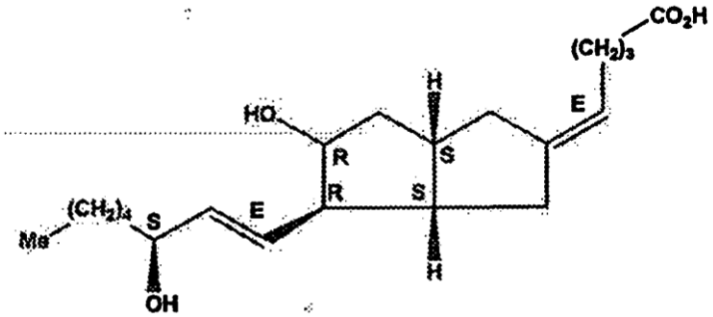
GW-0742



L-165041



Carbaprostaciclina



Otros agonistas de PPAR-δ útiles incluyen, sin limitación, RWJ-800025, L-160043 y los compuestos descritos en las patentes de los EE.UU n.º 7.091.245, 7.015.329, 6.869.967, 6.787.552, 6.723.740, 6.710.053 y 6.300.364 y en la patente europea EP 1586573, la patente de los EE.UU. 20050245589 y la patente internacional WO 2005049572.

Algunas realizaciones de la presente invención dan a conocer un agonista selectivo de PPAR-δ para la utilización en combinación con un otro fármaco conocido en la técnica por ser útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de una enfermedad o lesión hepática alcohólica. Otros fármacos de ejemplo incluyen, sin limitación, glucocorticoides (p, ej., prednisona, prednisolona), pentoxifilina, ácido ursodesoxicólico, colchicina y diuréticos (p. ej, amilorida, furosemida).

En algunas realizaciones de la invención, un agonista selectivo de PPAR-δ y otro fármaco son para la administración por separado a un animal, p, ej., como dos composiciones diferentes. En otras realizaciones, un agonista selectivo de PPAR-δ y otro fármaco son para la administración como parte de una única composición.

En algunas realizaciones de la presente invención, un agonista selectivo de PPAR-δ y otro fármaco son para la administración a un animal con una o más de las siguientes condiciones: con diferente periodicidad, con diferente duración, a diferente concentración, por diferente vía de administración, etc. En algunas realizaciones, un agonista selectivo de PPAR-δ se administra antes que el otro fármaco, p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas antes de administrar el otro fármaco. En algunas realizaciones, un agonista selectivo de PPAR-δ se administra después del otro fármaco, p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas después de la administración del otro fármaco. En algunas realizaciones, un agonista selectivo de PPAR-δ y otro fármaco se administran a la vez, pero con diferentes pautas, p. ej., un agonista selectivo de PPAR-δ se administra diariamente mientras que el otro fármaco se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En otras realizaciones, un agonista de PPAR se administra una vez a la semana mientras que el otro fármaco se administra diariamente, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

La administración de un agonista de PPAR puede continuarse a la vez que se administra otro fármaco. Adicionalmente, la administración de un agonista de PPAR puede continuarse más allá de la administración del otro fármaco o viceversa.

En algunas realizaciones de la invención, se puede repetir al menos una vez la administración de un agonista de PPAR en combinación con otro fármaco. La administración se puede repetir tantas veces como sea necesario para conseguir o mantener una respuesta terapéutica, p. ej., de una a unas 10 veces o más. Con cada repetición, el agonista selectivo de PPAR-δ y el otro fármaco pueden ser iguales o diferentes a los utilizados en la repetición anterior. Adicionalmente, de una repetición a otra puede variar el periodo de tiempo de administración del agonista de PPAR y del otro fármaco y la manera en la que se administran.

Los fármacos de la presente invención se pueden conectar a una molécula transportadora para realzar la captación celular de los compuestos. Los ejemplos de tales moléculas transportadoras incluyen péptidos transportadores tales como los descritos por Fulda et al., *Nature Med*. 8: 808 (2002), Arnt et al., *J. Biol*. *Chem*. 277: 44236 (2002), y Yang et al., *Cancer Res*. 63: 831 (2003), péptidos fusógenos (véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5.965.404) y virus y partes de virus tales como cápsidas vacías y hemaglutinina vírica (véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5.547.932). Otras moléculas transportadoras incluyen ligandos para el receptor de la superficie celular, tal como las asialoglucoproteínas (que se fijan al receptor de las asialoglucoproteínas; véase, la patente de los EE.UU. n.º 5.166.320) y anticuerpos contra los receptores de la superficie celular, tales como anticuerpos específicos contra los linfocitos T, p. ej., anticuerpos anti-CD4 (véase la patente de los EE.UU. n.º 5.693.509).

Las composiciones descritas en la presente memoria incluyen todas las composiciones en donde los fármacos de la presente invención están contenidos en una cantidad que es eficaz para conseguir el propósito para el que se diseñaron. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación del margen óptimo de la cantidad eficaz de cada componente se encuentra dentro de los conocimientos de la técnica. La dosis real y la pauta del tratamiento las puede determinar fácilmente el médico experto en la técnica, teniendo en cuenta la vía de administración, la edad, la masa, y la salud del sujeto, así como la etapa de la enfermedad hepática y, por supuesto, cualquier efecto secundario de los fármacos, la eficacia de los fármacos, y de acuerdo con los procedimientos y prácticas médicas habituales. Típicamente, los fármacos se pueden administrar a los animales, p. ej., humanos, por vía oral a una dosis de 0,0025 a 50 mg/kg, o una cantidad equivalente de la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, por día de la masa corporal del animal a tratar de la lesión hepática o de la enfermedad hepática. Preferiblemente, se administran por vía oral de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática o hepática. Para la inyección intramuscular, la dosis es por lo general de aproximadamente la mitad de la dosis oral. Por ejemplo, una dosis intramuscular adecuada sería de aproximadamente 0,0025 a aproximadamente 25 mg/kg, y lo más preferiblemente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg.

La dosis oral unitaria puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg de cada fármaco. La dosis unitaria se puede administrar una o más veces al día como uno o más comprimidos o cápsulas que contiene cada uno de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg, convenientemente de aproximadamente 0,25 a 50 mg, de los fármacos.

Además de administrar los fármacos como sustancias químicas brutas, los fármacos de la invención se pueden administrar como parte de una preparación farmacéutica que contiene vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. Preferiblemente, las preparaciones, en particular las preparaciones que se pueden administrar por vía oral o tópica y que se pueden utilizar para el tipo de administración preferido, tales como comprimidos, grageas, pastillas y cápsulas de liberación lenta, enjuagues bucales y colutorios, geles, suspensiones líquidas, acondicionador para el pelo, fijador, champúes y también preparaciones que se pueden administrar por vía rectal, tales como supositorios, así como las soluciones idóneas para la administración por inyección, por vía tópica u oral, contienen de aproximadamente el 0,01% al 99%, preferiblemente de aproximadamente el 0,25% al 75% de compuesto(s) activo(s) junto al excipiente.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a cualquier sujeto que puede experimentar los efectos

beneficiosos de los compuestos de la invención. Antes que ninguno entre tales sujetos están los mamíferos, p. ej., humanos, aunque la invención no pretende estar tan limitada. Otros animales incluyen animales de veterinaria (vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros, gatos y similares).

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de los mismos se pueden administrar mediante cualquier medio que consiga el propósito para el que se diseñaron. Por ejemplo, la administración puede ser por las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal, intratecal, intracraneal, intranasal o tópica. Alternativamente, o a la vez, la administración puede ser por vía oral. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del destinatario, de la clase de tratamiento concurrente, si lo hay, de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado.

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican de un modo que se conoce por sí mismo, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de mezclado, granulación, fabricación de grageas, disolución o liofilización. Así pues, las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener con la combinación de los compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente con la molienda de la mezcla resultante y el procesamiento de la mezcla de gránulos, después de añadir los auxiliares adecuados, si se desea o fuera necesario, para obtener los comprimidos o núcleos de grageas.

Los excipientes adecuados son, en particular, sustancias de relleno tales como sacáridos, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato de tricalcio o hidrogenofosfato de calcio, así como aglutinantes tales como pasta de almidón, utilizando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polinivinilpirrolidona. Si se desea, se pueden añadir disgregantes tales como los almidones mencionados más arriba y también carboximetilalmidón, polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Los auxiliares son, sobre todo, reguladores del flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, tal como estearato de magnesio o estearato de calcio, y/o polietilenglicol. Los núcleos de las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Para este propósito se pueden utilizar soluciones de sacáridos concentrados que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Para producir revestimientos resistentes a los jugos gástricos se utilizan soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Se pueden añadir material de colorante o pigmentos a los revestimientos de los comprimidos o de las grageas, por ejemplo, para la identificación o para la caracterización de combinaciones de dosis de compuestos activos.

Otras preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que se pueden mezclar con sustancias de relleno tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden preferiblemente en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, o parafina líquida. Además, se pueden añadir estabilizantes.

Las posibles preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en una combinación de uno o más de los compuestos activos con una base de supositorio. Las bases de supositorios adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible utilizar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación de los compuestos activos con una base. Los posibles materiales de base incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o parafinas.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, por ejemplo, sales hidrosolubles y soluciones alcalinas. Además, se pueden administrar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas adecuadas para la inyección. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo oleato de etilo, o triglicéridos o polietilenglicol 400. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede también contener estabilizantes.

También se describe en la presente memoria un modelo animal de lesión hepática y enfermedad hepática alcohólicas producido por la alimentación prolongada con etanol de ratas Long-Evans. Sorprendentemente, se ha descubierto que las ratas Long-Evans muestran una respuesta robusta a la alimentación con etanol en comparación con otras cepas de rata, lo que hace que las ratas sean idealmente adecuadas para el estudio de los efectos de la ingesta prolongada de alcohol. En una realización, el etanol se incluye en la dieta diaria de las ratas Long-Evans. Por ejemplo, el etanol puede comprender aproximadamente el 0%, 2%, 4,5%, 6,5%, 9,25% (v/v) (equivalente al 0%, 8%, 18%, 26% o 37% del contenido calórico) o más de la dieta diaria. En el modelo, el etanol puede comprender aproximadamente el 37% del contenido calórico de la dieta diaria. La alimentación con etanol puede continuarse

durante tanto tiempo como se desee, p. ej., desde tan solo dos días hasta incluso seis meses o más. Preferiblemente, la alimentación con etanol se continúa hasta que se induce la lesión hepática y/o se reduce la respuesta de regeneración hepática, p. ej., durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas o más, seguido de la administración de fármacos u otros tratamientos para determinar su efecto sobre la lesión hepática o la respuesta de regeneración hepática. Alternativamente, los fármacos o tratamientos se administran antes o a la vez que la alimentación con etanol para determinar si se puede prevenir o enlentecer la lesión hepática, o reducir la respuesta de regeneración hepática.

También describimos un método para escrutar un fármaco que es potencialmente útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica, que comprende administrar un fármaco al modelo de animal producido por la alimentación prolongada con etanol de ratas Long-Evans, y la determinación del nivel de lesión hepática, resistencia a la insulina y/o respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al cual no se le había administrado el fármaco, en donde una mejora en el grado de la lesión hepática, de la resistencia a la insulina y/o de la respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al que no se le había administrado el fármaco indica que el fármaco es potencialmente útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica.

Los fármacos que se pueden escrutar incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, productos naturales, quimiotecas y similares.

Además, describimos un método para comprobar un posible tratamiento para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica, que comprende administrar el posible tratamiento al modelo de animal producido por la alimentación prolongada con etanol de ratas Long-Evans y la determinación del nivel de lesión hepática, de resistencia a la insulina y/o de respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al que no se le había administrado el posible tratamiento, en donde una mejora del nivel de lesión hepática, de resistencia a la insulina y/o de respuesta de regeneración hepática respecto al nivel en un animal de control al cual no se le había administrado el posible tratamiento indica que el tratamiento es potencialmente útil para el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión o enfermedad hepática alcohólica.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos, pero no limitantes, del método y de las composiciones de la presente invención. Se encuentra dentro del espíritu y del alcance de la invención cualquier otra modificación adecuada y adaptación del abanico de condiciones y parámetros normalmente encontrados en el tratamiento clínico y que son obvios para los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos generales

Diseño experimental

En estos estudios, las ratas macho Long-Evans se alimentaron con una dieta líquida con etanol al 37% durante 6 semanas. El animal de control emparejado se alimentó con una dieta isocalórica (la sacarosa sustituye al etanol). Después de tres semanas, ambos grupos de ratas recibieron inyecciones con los agonistas de PPAR-α, -γ o -δ, o con solución salina como control. Los activadores de PPAR-α (GW7647), PPAR-γ (F-L-Leu) y PPAR-δ (L-160043) se obtuvieron de CalBiochem (Carlsbad, CA) y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a la concentración de 25 µg/kg, 20 µg/kg y 2 µg/kg, respectivamente. A los ratones se les dieron inyecciones i.p. dos veces a la semana. A las 6 semanas, los animales se sometieron a una hepatectomía parcial de 2/3. El hígado retirado se utilizó para el análisis anatomopatológico, la medición de la peroxidación lipídica, de los daños en el ADN y de la señalización de insulina/IGF como se describe más adelante. Después de la hepatectomía de 2/3, se recogió lo que quedaba de hígado al cabo de 18, 24, 30 y 48 horas para evaluar la respuesta regenerativa. Para hacerlo, a los animales se les inyectó BrdU por vía i. p. 2 horas antes de la recogida para medir su incorporación en los núcleos de los hepatocitos como índice de la síntesis de ADN. La regeneración del hígado que se midió mediante la incorporación de BrdU o de ^{3}H-timidina es máxima a las 24 horas de la hepatectomía parcial en este modelo de animal [Wands et al., *Gastroenterology* 77: 528 (1979)].

El tejido hepático de las ratas en alimentación prolongada con etanol y de la pareja de control alimentada isocalóricamente se obtuvo después de sacrificarlas 6 semanas después de mantenerlas con esta dieta. Los cortes de las regiones hepáticas se fijaron con formol, se incluyeron en parafina, se tiñeron con los colorantes hematoxilina y eosina, y se examinaron al microscopio óptico. Los cortes histológicos adyacentes se sometieron a tinción inmunohistoquímica. Los bloques generados por fractura tras congelación obtenidos de tejido fresco de la misma región se utilizaron para medir la expresión del ARNm y la fijación al receptor.

Estudios anatomopatológicos:

Los cortes en parafina (8 µm de grosor) se inmunotiñeron con anticuerpos monoclonales contra la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) (Oxis Research) o co el 4-hidroxinonenol (HNE) (Chemicon International,

Temecula, CA) para detectar la lesiones del ADN y la peroxidación lipídica, respectivamente. Antes de la inmunotinción, los cortes rehidratados y desparafinados se trataron con saponina a 0,1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio a 10 mM, NaCl al 0,9%, pH 7,4; PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 minutos para extinguir la actividad peroxidasa endógena, y luego una incubación de 30 minutos en SuperBlock-TBS (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) para bloquear los sitios de fijación inespecíficos. A continuación, los cortes del tejido se incubaron durante una noche a 4 ºC con 0,5-1 µg/ml de anticuerpo primario. La inmunorreactividad se detectó con el anticuerpo secundario biotinilado, reactivos del complejo de la peroxidasa de rábano picante con biotina y avidina (ABC), y diaminobencidina a modo de cromógeno (Vector Laboratories, Burlingame, CA) [Lam et al., *J. Biol. Chem*. 269: 20648 (1994)]. Los cortes de tejido se contratiñeron con hematoxilina, se conservaron con el cubreobjetos y se examinaron al microscopio óptico.

Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa en tiempo real:

Se aisló el ARN total de tejido hepático mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó la concentración de ARN y su pureza a partir de la absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm. El ARN (2 µg) se retrotranscribió con el kit AMV de síntesis de la primera cadena del ADNc (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) y cebadores oligodesoxinucleotídicos al azar. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real se utilizó para medir el nivel del ARNm de la insulina, de los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II, de sus correspondientes receptores, de los tipos de sustrato del receptor de insulina (IRS, por su nombre en inglés) 1, 2 y 4, y de AAH, un gen que responde a IGF-I/insulina vía abajo implicado en la movilidad y en la migración celulares. La cantidad de ARN ribosómico 18S medida en reacciones en paralelo se utilizó para calcular la abundancia relativa de los ARNm transcritos [Myers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10350 (1992); Baltensperger et al., *Science* 260: 1950 (1993); Yeon et al., *Hepatology* 38: 703 (2003); Pares et al., *Hepatology* 12: 1295 (1990)]. Las amplificaciones por PCR se realizaron en reacciones de 25 µl que contenían el ADNc generado a partir de 2,5 ng del molde de ARN original, cada cebador directo e inverso específico del gen a 300 nM (tabla 1), y 12,5 µl de una mezcla para PCR de SYBR Green QuantiTect a 2x (Qiagen Inc, Valencia, CA). Las señales amplificadas se detectaron continuamente con el sistema de detección de PCR en tiempo real de BIO-RAD iCycler iQ Multi-Color (Bio-Rad, Hercules, CA). El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 15 minutos y activación de la enzima a 95 ºC, 45 ciclos de 95 ºC x 15 s, 55 ºC-60 ºC x 30 s, y 72 ºC x 30 s. La temperatura de hibridación se optimizó con el programa de gradiente de temperatura proporcionado con el programa informático del iCycler.

TABLA 1: parejas de cebadores para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real*

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Posición (ARNm)	Tamaño del amplicón (pb)
ARNr 18S	Directo	GGA CAC GGA CAG GAT TGA CA (SEQ ID NO:1)	1278	50
ARNr 18S	Inverso	ACC CAC GGA ATC GAG AAA GA (SEQ ID NO:2)	1327	
Insulina	Directo	TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT C (SEQ ID NO:3)	145	135
Insulina	Inverso	ATC CAC AAT GCC ACG CTT CTG C (SEQ ID NO:4)	279	
Receptor de la insulina	Directo	TGA CAA TGA GGA ATG TGG GGA C (SEQ ID NO:5)	875	129

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Posición (ARNm)	Tamaño del amplicón (pb)
Receptor de la insulina	Inverso	GGG CAA ACT TTC TGA CAA TGA CTG (SEQ ID NO:6)	1003	
IGF-I	Directo	GAC CAA GGG GCT TTT ACT TCA AC (SEQ ID NO:7)	65	127
IGF-I	Inverso	TTT GTA GGC TTC AGC GGA GCA C (SEQ ID NO:8)	191	
Receptor del IGF-I	Directo	GAA GTC TGC GGT GGT GAT AAA GG (SEO ID NO:9)	2138	113
Receptor del IGF-I	Inverso	TCT GGG CAC AAA GAT GGA GTT G (SEQ ID NO:10)	2250	
IGF-II	Directo	CCA AGA AGA AAG GAA GGG GAC C (SEQ ID NO:11)	763	95
IGF-II	Inverso	GGC GGC TAT TGT TGT TCA CAG C (SEQ ID NO:12)	857	
Receptor del IGF-II	Directo	TTG CTA TTG ACC TTA GTC CCT TGG (SEQ ID NO:13)	1066	91
Receptor del IGF-II	Inverso	AGA GTG AGA CCT TTG TGT CCC CAC (SEQ ID NO:14)	1156	

En los estudios preliminares, los productos de la PCR marcados con SYBR Green se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y la autenticidad de cada amplicón se verificó mediante la secuenciación del ácido nucleico. Los ADN complementarios (ADNc) se clonaron en el vector PCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA). Como referencia en las reacciones de PCR se utilizaron diluciones en serie de una cantidad conocida de ADN plasmídico recombinante que contenía las secuencias diana específicas, y las curvas de regresión generadas de los valores C_t de las referencias se utilizaron para calcular la abundancia del ARNm. La abundancia relativa del ARNm se determinó a partir de la proporción de nanogramos de ARNm especifico entre el ARN 18S, medidos en las mismas muestras [Myers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10350 (1992); Baltensperger et al., *Science* 260: 1950 (1993)]. Los resultados se normalizaron al 18S porque el 18S es muy abundante y su cantidad era esencialmente invariante entre las muestras, mientras que los genes de mantenimiento se modulaban según el estado de la enfermedad. Se hicieron comparaciones estadísticas entre grupos con las proporciones calculadas de ARNm/18S. Los estudios de control incluyeron el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de: 1) reacciones sin plantilla; 2) ARN que no se había retrotranscrito; 3) muestras de ARN que se trataron previamente con ADNasa I; 4) muestras tratadas con ARNsa A antes de la reacción de la transcriptasa inversa; y 5) ADN genómico.

Ensayos de fijación al receptor:

El tejido congelado recién recogido (unos 100 mg) se homogeneizó en 5 volúmenes del tampón de lisis con NP-40 (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, NP-40 al 1%, NaCl a 150 mM, EDTA a 1 mM, EGTA a 2 mM) que contenía inhibidores de

proteasas (PMSF a 1 mM, TPCK a 0,1 mM, aprotinina a 1 µg/ml, pepstatina A a 1 µg/ml, leupeptina a 0,5 µg/ml, NaF a 1 mM, $Na_4P_2O_7$ a 1 mM). Se determinaron las concentraciones de proteínas con el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, por su nombre en inglés) (Pierce, Rockford, IL). Los estudios preparatorios determinaron la cantidad de proteína y la concentración del ligando radiomarcado requeridas para conseguir la fijación específica del 20%. Se realizaron ensayos de fijación de la insulina al receptor con 100 µg de proteína. Los ensayos de fijación del IGF-I requirieron 25 µg de proteína por muestra, y los ensayos de fijación de IGF-II al receptor se optimizaron con 10 µg de proteína. Los ensayos competitivos de fijación en equilibrio se utilizaron para valorar la fijación del factor de crecimiento en relación con la exposición al etanol. Para la fijación total, se incubaron muestras de proteína independientes por duplicado en reacciones de 100 µl que contenían el tampón de fijación (HEPES a 100 mM, pH 8,0, NaCl a 118 mM, $MgSO_4$ a 1,2 mM, dextrosa a 8,8 mM, KCl a 5 mM, seroalbúmina bovina al 1%) y 100 nCi/ml de [^{125}I] (2000 Ci/mmol; 50 pM) en insulina, IGF-I o IGF-II. Para medir la fijación inespecífica se prepararon muestras replicadas de manera idéntica, pero con la adición del ligando sin marcar (frío) a 0,1 µM.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 1,5 ml, y las incubaciones se realizaron a 4 ºC durante 16 horas en una plataforma con agitación suave. A continuación, el rastreador radiomarcado fijado se precipitó con la adición de 500 µl de γ-globulina bovina al 0,15% (preparada en Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0) seguido de 400 µl de polietilenglicol 8000 al 37,5% (PEG-8000; preparado en Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0) a cada tubo. Las muestras se mezclaron exhaustivamente con agitación vorticial y luego se incubaron en hielo durante al menos 2 horas. El precipitado se recogió por centrifugación de las muestras a 15000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Toda la fracción de sobrenadante, que contenía el ligando (libre) sin fijar, se transfirió a un tubo de contador de centelleo γ (Sarstedt, Newton, NC). Se cortó la punta del tubo Eppendorf que contenía el sedimento y se añadió directamente a un tubo distinto de contador de centelleo γ. Las muestras se contaron durante 1 minuto en un contador γ LKB CompuGamma CS. Se calculó la fijación específica mediante la sustracción de los femtomoles de la fijación inespecífica, a saber, la cantidad fijada en presencia del ligando frío, de los femtomoles totales fijados (ausencia del ligando competitivo sin marcar). Los resultados se analizaron y se representaron en un gráfico con el programa informático GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Fuente de los reactivos:

La insulina, el IGF-I y el IGF-II recombinantes humanos marcados con [^{125}I] se compraron a Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La insulina humana sin marcar se compró a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El IGF-I y el IGF-II recombinantes se obtuvieron de Bachem (Rey de Prusia, PA). Los anticuerpos monoclonales contra la 8-OHdG y el HNE se compraron a Oxis Scientific. Los demás productos químicos y reactivos de calidad se compraron a CalBiochem (Carlsbad, CA) o a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Análisis estadístico:

Los experimentos se llevaron a cabo con 9 ratas por grupo. Los datos se describen como medias ± E.E.M. en los gráficos. Se realizaron comparaciones entre grupos con los ensayos de la *t* de Student. Se realizaron análisis estadísticos con el sistema estadístico Number Cruncher (Kaysville, UT). Los valores de *P* que corresponden a diferencias y tendencias significativas se indican sobre los gráficos.

Efectos de la alimentación prolongada con alcohol sobre la estructura del hígado y la expresión génica

La alimentación prolongada con etanol produjo alteraciones sorprendentes en la histología del hígado, como se muestra en la figura 1 (paneles superiores). En el grupo alimentado con etanol hay una acumulación de lípidos prominente en los hepatocitos. Más importante, aparecen áreas en las que los hepatocitos están lesionados, con menos células y con necrosis (inserto). La estructura lobular está distorsionada y resultan patentes las áreas de inflamación e infiltrados celulares inflamatorios. Esta imagen es coherente con la lesión hepática observada en los humanos con enfermedad hepática alcohólica. Los paneles centrales de la figura 1 ilustran la peroxidación lipídica inducida por la exposición prolongada al alcohol según se muestra mediante tinción con HNE. Además, hay un alto grado de lesiones en el ADN de los hepatocitos, como se muestra mediante la inmunorreactividad de la 8-OHdG (paneles inferiores). Por consiguiente, la exposición prolongada al etanol genera estrés oxidativo y alteraciones del ADN en el hígado, que son dos mecanismos importantes de lesión celular.

Los efectos del etanol sobre la señalización de la insulina en el hígado se determinaron mediante PCR en tiempo real como se muestra en la figura 2. El control no presentó diferencias de expresión del gen de la insulina en comparación con el hígado expuesto al etanol (2A). Sin embargo, se produjo una reducción sorprendente en la expresión del gen de IGF-I (*P* = 0,0004) en el hígado obtenido de las ratas en alimentación prolongada con etanol (2B). Por el contrario, la expresión de IGF-II fue mayor con el etanol que en el hígado de control (2C). Asimismo, la cantidad de receptor de la insulina (INS-R) se parecía a la del control, y la expresión génica del receptor de IGF-I e IGF-II aumentó en los grupos alimentados con alcohol (2D-2F). El principal cambio en la señalización de la insulina implicó una reducción de la fijación de la insulina a su receptor, tal y como se muestra en la figura 3A. Esto crearía resistencia a la insulina en el hígado dado que la cantidad de IRS-1, 2 y 4 con etanol no era diferente a la de los controles, tal y como se muestra en las figura 4A-4C. En apoyo a este concepto se encuentra en el hígado obtenido de las ratas en alimentación prolongada con etanol (4D), en el que está reducida la expresión de AAH, que es un gen vía abajo que responde a la insulina. Así pues, se produce un estado de resistencia a la insulina con una

importante deficiencia en la fijación de la insulina al receptor, lo que afectaría a todos los acontecimientos de señalización de la insulina dado que se altera la etapa inicial (esto es, la interacción entre el receptor y el ligando) al comienzo de las cascadas de transducción de la señal.

Efecto de la alimentación prolongada con alcohol sobre la regeneración del hígado

La figura 5 muestra el efecto sorprendente de la alimentación prolongada con etanol sobre la respuesta regenerativa hepática según se midió mediante la inmunotinción con BrdU a las 24 horas de la hepatectomía de 2/3. Obsérvese la captación robusta de BrdU en el núcleo de los hepatocitos de los animales de control en más del 60% de las células (paneles de la izquierda) en comparación con menos del 10% en el grupo alimentado con etanol (paneles de la derecha). Estos resultados confirman la acción adversa del etanol en el proceso de reparación hepática. Por el contrario, tal y como se muestra en la figura 6, el agonista de PPAR rescata la síntesis del ADN afectada por el etanol. Obsérvese que el PPAR-α (panel inferior izquierdo) y el PPAR-γ (panel inferior derecho) muestran un modesto incremento de la marcación de BrdU de aproximadamente el 20% en comparación con los animales alimentados con etanol. Fue inesperado y sorprendente que, en las ratas en alimentación prolongada con etanol, el tratamiento sobre PPAR-δ restaurase esencialmente la regeneración hepática a un nivel visto en los animales normales de control después de una hepatectomía de 2/3.

En conjunto, estos estudios demuestran que el consumo prolongado de etanol lesiona e inflama los hepatocitos, y también provoca estrés oxidativo y daños del ADN en el hígado. La capacidad de regeneración del hígado se ve afectada sustancialmente. Estos agonistas de PPAR también se han examinado para determinar si rescatan la lesión de la peroxidación lipídica, como se muestra en la figura 7. De hecho, los agonistas de PPAR mejoraron sustancialmente la peroxidación lipídica hepática inducida por el etanol prolongado, según se midió mediante inmunotinción con HNE, que mostró que era igualmente eficaz con las tres clases (α, γ y δ). Además, respecto a los daños en el ADN producidos por el etanol, como se muestra en la figura 8, el PPAR-δ mostró el efecto protector más prominente, seguido de PPAR-α y PPAR-γ. Por consiguiente, estos fármacos atacan las dos características patológicas principales de una enfermedad hepática alcohólica, a saber, la lesión hepática en curso y la inhibición del proceso de reparación. Se anticipa que tales fármacos mejorarán la evolución de los individuos con enfermedad hepática alcohólica al prevenir o enlentecer la lesión hepática producida por el alcoholismo prolongado, al mismo tiempo que estimula o restaura la respuesta regenerativa hepática.

Ejemplo 2

Métodos generales

Modelo de exposición prolongada al etanol:

Las ratas Long-Evans macho adultas (unos 200-250 g) (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana) se alimentaron por parejas con dietas líquidas isocalóricas (BioServ, Frenchtown, NJ) que contenían etanol al 0% (control) o al 37% por contenido calórico (9,2% v/v) durante 8 semanas. Durante la semana anterior al inicio del experimento, las ratas se adaptaron a las dietas con etanol al alimentarlas secuencialmente durante dos días cada una con dietas que contenían el 8%, 17%, 24% y, luego, el 37% de etanol. También se estudiaron las ratas de control alimentadas con pienso. Las ratas se monitorizaron cada día para garantizar el consumo equivalente de comida y el mantenimiento de la masa corporal. Durante las últimas 3 semanas del experimento mientras se mantenían con dietas líquidas que contenían el 0% o el 37% de etanol, a las ratas de ambos grupos se les administraron dos veces a la semana (lunes y jueves) inyecciones intraperitoneales (i. p.) de vehículo (disolución salina), un agonista de PPAR-α (GW7647; 25 µg/kg), de PPAR-δ (L-160043; 2 µg/kg) o de PPAR-γ (F-L-Leu; 20 µg/kg) (CalBiochem, Carlsbad, CA). Al finalizar el experimento, se anestesiaron las ratas con isofluorano vaporizado (SurgiVet, Inc. Waukesha, WI) y el hígado y la sangre se recogieron para analizarlos. Las muestras de tejido hepático se fijaron por inmersión en Histochoice (Amresco Corp., Solon, OH) y se incluyeron en parafina. Los cortes histológicos adyacentes se tiñeron con hematoxilina y eosina o tricromo de Gomori, y examinaron en el código. Además, las muestras de tejido hepático se congelaron y rompieron en un baño con metanol en hielo seco, y luego se conservaron a –80 ºC para los estudios posteriores de proteínas y de ARNm. A lo largo del experimento, las ratas se alojaron en condiciones humanas y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso libre a la comida. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los protocolos que conforman las directrices establecidas por los National Institutes of Health y que fueron aprobadas por el Insitutional Animal Care and Use Committee en el hospital Lifespan-Rhode Island.

Análisis del ARNm:

Se extrajo el ARN total del tejido hepático con el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración del ARN y su pureza se determinaron a partir de la absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm. El ARN (2 µg) se retrotranscribió con el kit AMV de síntesis de la primera cadena de ADNc (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) y cebadores oligodesoxinucleotídicos al azar. Se utilizaron ensayos cuantitativos por reacción de la cadena de la polimerasa acoplados a la transcriptasa inversa (qRT-PCR) para medir la cantidad de transcrito de los ARNm específicos en equilibrio estacionario. Se realizaron amplificaciones por PCR en reacciones de 20 µl que contenían el ADNc generado a partir de 2.5 ng de la plantilla de

ARN original, cada uno de los cebadores directo e inverso específico del gen a 300 nM (tabla 2) y 10 µl de la mezcla para PCR QuantiTect SYBR Green a 2x (Qiagen Inc, Valencia, CA). Las señales amplificadas se detectaron continuamente con el instrumento y el software Mastercycler ep reaplex (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). El protocolo de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial y activación de la enzima durante 15 minutos a 95 ºC, 45 ciclos de 95 ºC x 15 s, 55 ºC-60 ºC x 30 s, y 72 ºC x 30 s. La temperatura de hibridación se optimizó con el programa de gradiente de temperatura proporcionado con el software Mastercycler ep realplex.

Tabla 2: parejas de cebadores para la PCR cuantitativa*

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Posición (ARNm)	Tamaño de los amplicones (pb)
Albúmina	Directa	CTT CAA AGC CTG GGC AGT AG (SEQ ID NO:15)	702	188
Albúmina	Inversa	TGG AGA TAG TGG CCT GGT TC (SEQ ID NO:16)	889	
ASBT	Directa	GCA TTG GCA TTT CTC TGG TT (SEQ ID NO:17)	598	181
ASBT	Inversa	GGT TCA ATG ATC CAG GCA CT (SEQ ID NO:18)	778	
KCR	Directa	TCA CAA ATG CTG TGG ACC AT (SEQ ID NO:19)	1427	161
KCR	Inversa	GTC TTC ACG CTC TCC GTT TC (SEQ ID NO:20)	1587	
GFAP	Directa	GGT GGA GAG GGA CAA TCT CA (SEQ ID NO:21)	433	215
GFAP	Inversa	CTC GAA CTT CCT CCT CAT GG (SEQ ID NO:22)	647	
Desmina	Directa	ACC TGC GAG ATT GAT GCT CT (SEQ ID NO:23)	1069	206
Desmina	Inversa	ACA TCC AAG GCC ATC TTC A (SEQ ID NO:24)	1274	
Col1a2 (colágeno)	Directa	ACC TCA GGG TGT TCA AGG TG (SEQ ID NO:25)	1623	222

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Posición (ARNm)	Tamaño de los amplicones (pb)
Col1a2 (colágeno)	Inversa	CGG ATT CCA ATA GGA CCA GA (SEQ ID NO:26)	1844	
Insulina	Directa	TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT C (SEQ ID NO:3)	145	135
Insulina	Inversa	ATC CAC AAT GCC ACG CTT CTG C (SEQ ID NO:4)	279	
Receptor de la insulina	Directa	TGA CAA TGA GGA ATG TGG GGA C (SEQ ID NO:5)	875	129
Receptor de la insulina	Inversa	GGG CAA ACT TTC TGA CAA TGA CTG (SEQ ID NO:6)	1003	
IGF-I	Directa	GAC CAA GGG GCT TTT ACT TCA AC (SEQ ID NO:7)	65	127
IGF-I	Inversa	TTT GTA GGC TTC AGC GGA GCA C (SEQ ID NO:8)	191	
Receptor de IGF-I	Directa	GAA GTC TGC GGT GGT GAT AAA GG (SEQ ID NO:9)	2138	113
Receptor del IGF-I	Inversa	TCT GGG CAC AAA GAT GGA GTT G (SEQ ID NO:10)	2250	
IGF-II	Directa	CCA AGA AGA AAG GAA GGG GAC C (SEQ ID NO:11)	763	95
IGF-II	Inversa	GGC GGC TAT TGT TGT TCA CAG C (SEQ ID NO:12)	857	
Receptor del IGF-II	Directa	TTG CTA TTG ACC TTA GTC CCT TGG (SEQ ID NO:13)	1066	91
Receptor del IGF-II	Inversa	AGA GTG AGA CCT TTG TGT CCC CAC (SEQ ID NO:14)	1156	

Cebador	Dirección	Secuencia (5'→3')	Posición (ARNm)	Tamaño de los amplicones (pb)
IRS-1	Directa	GAT ACC GAT GGC TTC TCA GAC G (SEQ ID NO:27)	604	134
IRS-1	Inversa	TCG TTC TCA TAA TAC TCC AGG CG (SEQ ID NO:28)	737	
IRS-2	Directa	CAA CAT TGA CTT TGG TGA AGG GG (SEQ ID NO:29)	255	109
IRS-2	Inversa	TGA AGC AGG ACT ACT GGC TGA GAG (SEQ ID NO:30)	363	
IRS-4	Directa	ACC TGA AGA TAA GGG GTC GTC TGC (SEQ ID NO:31)	2409	132
IRS-4	Inversa	TGT GTG GGG TTT AGT GGT CTG G (SEQ ID NO:32)	2540	
GAPDH	Directa	AGT GGG CAT CAA TGG ATT TGG (SEQ ID NO:33)	306	241
GAPDH	Inversa	GGG GAT TTC CTT AGG TTC TTT GC (SEQ ID NO:34)	546	
AAH	Directa	TGC CTG CTC GTC TTG TTT GTG (SEQ ID NO:35)	666	118
AAH	Inversa	ATC CGT TCT GTA ACC CGT TGG (SEQ ID NO:36)	783	

En los estudios preliminares, los productos de PCR marcados con SYBR Green se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se verificó la autenticidad mediante secuenciación del ácido nucleico. Los ADN complementarios (ADNc) se clonaron en vectores PCR-II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Además, los análisis de la curva de fusión mostraron la presencia de un solo producto de PCR sin formación de picos de dímeros de cebadores. Las diluciones en serie del ADN plasmídico recombinante con las secuencias diana se utilizaron como referencia en las reacciones de PCR, y las líneas de regresión generadas con los valores de C_t de las referencias se utilizaron para calcular la abundancia del ARNm. La expresión relativa del ARNm se expresó como la proporción de nanogramos del ARNm específico por ribosómico (ARNr) 18S medido en las mismas muestras, porque el 18S es muy abundante y su cantidad no está modulada por el estado de la enfermedad. Se realizaron comparaciones estadísticas con las proporciones calculadas de ARNm/18S. Los estudios de control incluyeron el análisis de: 1) reacciones sin plantilla; 2) ARN que no se había retrotranscrito; 3) muestras de ARN que se trataron previamente con ADNasa I; 4) muestras tratadas con ARNasa A antes de la reacción de la transcriptasa inversa; y 5) ADN genómico.

Ensayos de fijación al receptor:

Se utilizaron los estudios de fijación a saturación para determinar si los tratamientos con agonistas de PPAR mejoraban la fijación, alterada por el etanol, de la insulina y del IGF al receptor en el hígado. El tejido hepático recién congelado se homogeneizó en 5 volúmenes del tampón de lisis que contenía Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, NP-40 al 1%, NaCl a 150 mM, EDTA a 1 mM, EGTA a 2 mM, más inhibidores de las proteasas (PMSF a 1 mM, TPCK a 0,1 mM, aprotinina a 1 µg/ml, pepstatina A a 1 µg/ml, leupeptina a 0,5 µg/ml, NaF a 1 mM, $Na_4P_2O_7$ a 1 mM) y de las fosfatasas (Na_3VO_4 a 2 mM). La concentración de proteína se determinó con el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, por su nombre en inglés) (Pierce, Rockford, IL). Los estudios preparatorios determinaron la cantidad óptima de proteína y la concentración de ligando radiomarcado que se necesitaban para conseguir la fijación específica del 20%. La fijación de la insulina al receptor se midió con 100 µg de proteína por tubo de ensayo. Los ensayos de fijación del IGF-I requirieron 25 µg de proteína por muestra, y los ensayos de fijación del receptor de IGF-II requirieron 10 µg de proteína por reacción.

Para generar la cinética de la fijación, las muestras de 8 ratas por grupo se agruparon en proporciones equivalentes y la concentración de las proteínas se ajustó para que fuera idéntica en cada grupo. Para la fijación total se incubaron muestras por duplicado en reacciones de 100 µl que contenían el tampón de fijación (HEPES a 100 mM, pH 8,0, NaCl a 118 mM, $MgSO_4$ a 1,2 mM, dextrosa a 8,8 mM, KCl a 5 mM, seroalbúmina bovina al 1%) y de 0,0031 a 1 µCi/ml de [^{125}I] (2000 Ci/mmol) en insulina, IGF-I o IGF-II. Para la fijación inespecífica se prepararon muestras por duplicado idénticas, pero con la adición del ligando sin marcar (frío) a 0,1 µM. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 16 horas a 4 ºC en placas de 96 pocillos que no fijan (Corning Incorporated Life Science, Lowell, MA). Las reacciones se recogieron al vacío (Corning, Lowell, MA) en placas con filtros GF/C de 96 pocillos que se habían empapado previamente durante 30 minutos en una solución de polietilenoimina (PEI) al 0,33%. Los filtros se lavaron 5 veces con tampón que contenía el tamponante ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) a 50 mM, pH 7,4, NaCl a 500 mM y SAB al 0,1%. Después del secado se añadieron 50 µl de Microscint-20 (Packard Instrument Company, Meriden, CT) a cada pocillo y se midió en una máquina TopCount (Packard Instrument Company, Meriden, CT) la cantidad de [^{125}I] en insulina, IGF-I o IGF-II que se había unido. Se calculó la fijación específica mediante la sustracción de los fmol/mg del isótopo fijado inespecíficamente, esto es, la cantidad unida en la presencia del ligando frío, de los fmol/mg de isótopo unido total. Los datos se analizaron y se representaron en un gráfico con el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Estudios de las proteínas:

La expresión de proteínas se examinó mediante análisis de inmunotransferencia (transferencia Western) o ensayo inmunoenzimático (ELISA). El análisis de inmunotransferencia se utilizó para medir la expresión de AAH y de GAPDH. Además, la inmunorreactividad que corresponde a la subunidad p85 de la PI3K se midió como un control negativo (de carga). Para el análisis de inmunotransferencia, el tejido hepático se homogeneizó en 5 volúmenes del tampón de ensayo de radio-inmunoprecipitación (RIPA, por su nombre en inglés: Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25%, NaCl a 150 mM, EDTA a 1 mM, EGTA a 2 mM) que contenía inhibidores de proteasas (PMSF a 1 mM, TPCK a 0,1 mM, aprotinina a 1 mg/ml, pepstatina A a 1 mg/ml, leupeptina a 0,5 mg/ml, NaF a 1 mM, $Na_4P_2O_7$ a 1 mM) y de fosfatasas (Na_3VO_4 a 2 mM). La concentración de proteínas se determinó con el ensayo del BCA (Pierce, Rockford, IL). Las muestras que contenían 20 µg de proteínas se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Los sitios de fijación inespecíficos se bloquearon con SuperBlock-TBS (Pierce, Rockford, IL), y las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (0,5-1 µg/ml) durante una noche a 4 ºC con agitación suave en una plataforma. La inmunorreactividad se detectó con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP, por su nombre en inglés), reactivos de quimioluminiscencia reforzada (ECL, por su nombre en inglés) (Pierce, Rockford, IL) y la Digital Science Imaging Station de Kodak (NEN Life Sciences, Boston, MA).

Los ELISA se utilizaron para medir la inmunorreactividad que correspondía a AAH, GAPDH y β-actina (control negativo). Los ELISA se realizaron en placas de poliestireno opacas de 96 pocillos (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Los extractos de proteína RIPA diluidos en TBS (40 ng/100 µg) se adsorbieron al fondo de los pocillos mediante incubación durante una noche a 4 ºC. Después de enjuagar en TBS, los pocillos se bloquearon durante 4 horas con 250 µl/pocillo de SAB al 2% en TBS. A continuación, las proteínas se incubaron con el anticuerpo primario (0,01-0,1 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunorreactividad se detectó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP (1:10000; Pierce) y el fluoróforo soluble Amplex Red (Molecular Probes). Se midió la fluorescencia de Amplex Red (Ex 530/Em 595) en un equipo M-5 (unidades de luz fluorescente; ULF). La especificidad de fijación se determinó a partir de incubaciones de control negativas en paralelo con anticuerpos irrelevantes, o con la omisión del anticuerpo primario o del secundario. El nivel medio de inmunorreactividad específica de AAH, GAPDH, y β-actina se utilizó para las comparaciones estadísticas entre grupos.

Fuente de los reactivos:

Los agonistas de PPAR, GW7647 (PPAR-α), L165041 (PPAR-δ) y Fmoc-Leu (PPAR-γ) se compraron a Calbiochem (Tecumsula, CA). La insulina, el IGF-I y el IGF-II recombinantes humanos marcados con [^{125}I] se compraron a Amersham Biosciences (Boston, MA). La insulina humana sin marcar, el IGF-I recombinante y el IGF-II recombinante se compraron a Bachem (Torrance, CA). La mezcla QuantiTect SYBR Green para PCR se obtuvo de Qiagen Inc

(Valencia, CA). Los anticuerpos monoclonales contra GAPDH y β-actina se compraron a Chemicon (Tecumsula, CA). El anticuerpo monoclonal de ratón A85G6 utilizado para detectar la AAH se generó con la proteína humana recombinante purificada. Las otras sustancias químicas de calidad se compraron a CalBiochem (Carlsbad, CA) o a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Análisis estadístico:

Los datos representados en los gráficos representan la media ± E.E.M. o la media ± 95% L.I.C. para cada grupo. Se hicieron comparaciones entre grupos con el análisis de la varianza (ANOVA) de mediciones repetidas y la prueba de Tukey-Kramer *post-hoc* para la significación. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Los agonistas de PPAR revierten la enfermedad hepática alcohólica:

El hígado de las ratas de control alimentadas con dieta líquida o con pienso mostraron la estructura lobular bien organizada que se esperaba casi sin indicios de esteatosis, de variación en el tamaño de los núcleos o de disminución del número de hepatocitos (figuras 9A, 9E, 9I). Por el contrario, los hígados expuestos al etanol mostraron una esteatosis microvesicular y macrovesicular con numerosos focos de inflamación de células linfomononucleares intralobulares, y áreas dispersas de apoptosis y/o necrosis (figuras 10A, 10E, 10I). Además, la alimentación prolongada con etanol dio lugar a una desorganización de estructura hepática con pérdida de las cuerdas regulares e incremento de la variabilidad del tamaño de los núcleos de los hepatocitos. En los hígados expuestos a etanol no se observó ningún incremento de la fibrosis, formación de nódulos regeneradores, ni cirrosis. Las ratas de control tratadas con el agonista de PPAR-α no presentaban cambios histológicos detectables en el hígado (figuras 9B, 9F, 9J) respecto a los controles tratados con el vehículo. Por el contrario, las ratas de control tratadas con el agonista de PPAR-δ (figuras 9C, 9G, 9K) o de PPAR-γ (figuras 9D, 9H, 9L) presentaron una estructura hepática peor organizada debido al ensanchamiento sinusoidal y al aparente incremento de hacinamiento de hepatocitos. Además, el tratamiento sobre PPAR-δ o PPAR-γ dio lugar a un incremento de la prominencia nuclear y a una microvacuolación del citoplasma de los hepatocitos. La microvacuolación estaba asociada a un incremento de la tinción PAS (ácido periódico y reactivo de Schiff), coherente con un incremento de la acumulación de glucógeno. En el grupo alimentado con etanol, el tratamiento con un agonista de PPAR tuvo efectos variables, pero bien definidos, en la histología hepática en términos de reducción de la desorganización de la estructura, esteatosis y muerte celular ocasionada por una exposición prolongada al etanol (figura 10). El tratamiento con el agonista de PPAR-α, de PPAR-δ o de PPAR-γ redujo el desordenamiento de la estructura y dio lugar a más disposiciones de tipo cuerda de los hepatocitos, y el alcance de la micro- y la macroesteatosis se redujeron con claridad. Con todo y con eso, se detectaron con facilidad pequeños focos de necrosis (figura 10J, insertos), inflamación (figura 10G, inserto y figura 10H, flecha) y apoptosis (figura 10L, inserto), aunque estas lesiones eran generalmente menos conspicuas que en los hígados expuestos al etanol y tratados con el vehículo. Las mejoras más sorprendentes de la histología hepática se produjeron en las ratas alimentadas con etanol que se habían tratado con el agonista de PPAR-δ (figuras 10C y 10K) o del PPAR-γ (figuras 10D y 10L).

Comentarios generales con respecto a los estudios de qRT-PCR:

La utilización de la qRT-PCR permitió analizar todas las muestras simultáneamente y con suficientes replicas para demostrar la repetitividad de los resultados. Con las técnicas empleadas, la calidad del ADNc generado del tejido se juzgó que era excelente basándose en la similitud de los valores de C_t del 18S y la repetitividad de las proporciones 28S:18S obtenidas para los hígados de las ratas de control alimentadas con etanol, independientemente del tratamiento con el agonista de PPAR. La utilización de la qRT-PCR era especialmente idónea para el análisis riguroso de la expresión génica porque los amplicones eran pequeños (principalmente < 150 pb), lo que eludía los posibles problemas relacionados con la degradación parcial del ARN, p. ej., las mellas, que se producen a menudo con la exposición prolongada al etanol y el estrés oxidativo. La especificidad de los productos amplificados se verificó mediante secuenciación directa del ácido nucleico. Los estudios de control en los que no se incluyó la plantilla de ADNc, no se retrotranscribió el ARN, se trataron las muestras de ARN con ARNsa A antes de la etapa de RT, o se utilizó ADN genómico para las reacciones, produjeron productos amplificados indetectables, como se demostró mediante el análisis por qPCR y la electroforesis en gel de agarosa. El tratamiento de las muestras de ARN con ADNasa antes de la etapa de RT no tuvo ningún efecto sobre el nivel de detección de los productos génicos amplificados.

Los tratamientos con agonistas de PPAR alteran el perfil de las poblaciones celulares del hígado:

Se midieron en el hígado mediante qRT-PCR la cantidad de ARNm de la albúmina, de la proteína apical transportadora de bilis dependiente de sodio (ASBT, por su nombre en inglés), de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por su nombre en inglés), del receptor de las células de Kupffer (KCR, por su nombre en inglés), de la desmina y del colágeno. La expresión de la albúmina se utilizó como índice de la abundancia/funcionamiento de los hepatocitos. La ASBT es reflejo del epitelio del conducto biliar. La GFAP es un marcador precoz de la activación de las células estrelladas y la desmina marca la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos. El KCR es un marcador de las células de Kupffer, y el incremento de su expresión podría deberse a una respuesta intrahepática a lesiones. La expresión del gen del colágeno corresponde al potencial fibrogénico o a

la fibrogénesis activa. Juntas, estas valoraciones de la expresión génica en el hígado, que hemos denominado «perfil celular», nos permitió cuantificar los desplazamientos relativos asociados a los agonistas de PPAR y el etanol en el tipo de hepatocito y su funcionamiento.

El hígado de las ratas de control tratadas con el vehículo tenía una cantidad media del ARNm de la albúmina significativamente más alta que el hígado de las ratas expuestas al etanol y tratadas con el vehículo (figura 11A). El tratamiento con el agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ pero no el de PPAR-α incrementó significativamente la cantidad media del ARNm de la albúmina en los hígados de control. En el grupo alimentado con etanol, el tratamiento con el agonista de PPAR-α o el de PPAR-δ incrementó significativamente la expresión de la albúmina respecto a las ratas alimentadas con etanol y tratadas con el vehículo, pero no respecto a ninguno de los grupos de control. El tratamiento del PPAR-γ no alteró significativamente la expresión de la albúmina en los hígados expuestos al etanol.

La expresión más alta de la ASBT fue en el hígado de control tratado con el vehículo, y cada uno de los hígados de control tratados con los agonistas de PPAR presentaron una cantidad media de ASBT significativamente más baja que los controles tratados con el vehículo (figura 11B). El hígado de las ratas expuestas al etanol y tratadas con el vehículo presentó una expresión media de ASBT significativamente más baja que la del correspondiente grupo de control. En las ratas alimentadas con etanol, el tratamiento con el agonista de PPAR-α incrementó significativamente la expresión de la ASBT hepática respecto al vehículo, pero no respecto a ninguna de las ratas alimentadas con la dieta de control. El tratamiento del PPAR-δ o del PPAR-γ no alteró significativamente la cantidad de ARNm de ASBT en el hígado expuesto al etanol.

La expresión más baja de KCR se dio en los hígados expuestos a etanol y en los controles tratados con el vehículo. El tratamiento con los agonistas de PPAR-α, de PPAR-δ o de PPAR-γ incrementó la cantidad media del ARNm de KCR en los hígados expuestos a etanol y en los de control; sin embargo, las diferencias con respecto al tratamiento correspondiente con el vehículo fueron sólo estadísticamente significativas para las ratas alimentadas con etanol (figura 11C). Los tratamientos sobre PPAR-α, PPAR-δ y PPAR-γ produjeron un grado similar de incremento de la expresión del KCR en los hígados expuestos al etanol. Sin embargo, la expresión del KCR fue significativamente más alta en las ratas expuestas al etanol respecto los controles solo en los grupos donde se trató el PPAR-γ.

La GFAP es un marcador temprano de la activación de las células estrelladas. La cantidad de ARNm de GFAP fue significativamente más alta en el hígado de los controles tratados con el vehículo que en las ratas expuestas al etanol y tratadas con el vehículo. La expresión de GFAP se incrementó significativamente con el tratamiento de PPAR-α en las ratas expuestas al etanol y de control (figura 11D), y, en el grupo alimentado con etanol, el tratamiento del PPAR-γ incrementó significativamente la expresión de GFAP respecto al tratamiento con el vehículo.

La desmina es un filamento intermedio que se expresa en las células estrelladas durante la transdiferenciación en células de tipo miofibroblasto. La cantidad media del ARNm de la desmina era similar en el hígado expuesto al etanol y en el de control tratado con el vehículo (figura 11E). Sin embargo, en el grupo de control, el tratamiento con el agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ redujo significativamente la cantidad de ARNm de la desmina respecto al vehículo. En los hígados expuestos al etanol, el tratamiento con el agonista de PPAR-γ incrementó significativamente la expresión del ARNm de la desmina respecto al tratamiento con el vehículo, mientras que el tratamiento con el agonista de PPAR-α o de PPAR-δ no tuvo ningún efecto significativo sobre la cantidad del ARNm de la desmina.

La expresión del gen del colágeno es reflejo de la fibrogénesis. La expresión más baja del ARNm del colágeno apareció en los hígados de control tratados con el vehículo (figura 11F). Aunque los tratamientos con agonistas de PPAR incrementaron el nivel de expresión medio del gen del colágeno en los controles, las diferencias respecto al vehículo fueron estadísticamente significativas sólo para el grupo tratado con el agonista de PPAR-δ. La exposición prolongada al etanol incrementó significativamente la cantidad media del ARNm del colágeno respecto al control (subgrupos tratados con el vehículo). En las ratas alimentadas con dietas que contienen etanol, el tratamiento con el agonista de PPAR-α incrementó además la expresión del gen del colágeno, mientras que los agonistas de PPAR-δ y de PPAR-γ redujeron significativamente la cantidad media del ARNm del colágeno respecto al tratamiento con el vehículo.

Efectos del etanol y de los agonistas de PPAR sobre la expresión hepática de los polipéptidos de la insulina y de los IGF, de sus receptores y de las moléculas de IRS:

Los estudios por qRT-PCR demostraron que los genes de los polipéptidos de la insulina, de IGF-I y de IGF-II, sus receptores correspondientes, e IRS-1, IRS-2 e IRS-4, se expresaban en el hígado de las ratas alimentadas con etanol y las de control (figura 12), lo que indica que los genes precedentes requeridos para la señalización del IGF y de la insulina se expresan en el hígado de las ratas adultas. Entre los genes de los polipéptidos, la insulina fue menos abundante, seguida de IGF-II, e IGF-I fue el más abundante (figuras 12A-12C). El hígado expuesto al etanol y el de control tratado con el vehículo tenían una cantidad media similar de los ARNm de la insulina, del IGF-I y del IGF-II. En el grupo de control, PPAR-δ y PPAR-γ incrementaron significativamente la expresión del gen de la insulina, mientras que en el grupo expuesto al etanol, la expresión del gen de la insulina se redujo con el tratamiento del PPAR-α o del PPAR-δ. La expresión del gen de la insulina fue significativamente más baja en los hígados expuestos a etanol donde se trataron los PPAR-δ y PPAR-γ respecto a sus correspondientes hígados de control. La

cantidad de ARNm de IGF-I no se moduló significativamente con los los tratamientos de los agonistas de PPAR en las ratas de control, pero en el grupo expuesto al etanol, los tratamientos con agonistas de PPAR redujeron significativamente la expresión de IGF-I respecto al vehículo y a todos los controles correspondientes tratados con agonistas de PPAR (figura 12B). En los controles, la expresión de IGF-II no se moduló significativamente con el tratamiento con agonistas de PPAR, pero con la alimentación prolongada con etanol, el tratamiento de PPAR-α o de PPAR-γ redujo significativamente la cantidad del ARNm de IGF-II respecto al vehículo y a todos los controles correspondientes tratados con agonistas de PPAR (figura 12C).

Los ARNm transcritos del receptor de IGF-II fueron los más abundantes (figura 12F), seguido por el receptor IGF-I (figura 12E) y, luego, el receptor de la insulina (figura 12D). En los controles, el tratamiento con el agonista de PPAR-δ incrementó el nivel de expresión medio del receptor de la insulina respecto al vehículo. La alimentación prolongada con etanol incrementó significativamente el nivel de expresión medio del receptor de la insulina respecto al control, pero a diferencia de su efecto en los controles, el agonista de PPAR-δ redujo significativamente la expresión del receptor de la insulina en el hígado de las ratas alimentadas con etanol (figura 12D). En los controles, la expresión del receptor de IGF-I presentó la misma abundancia independientemente del tratamiento con el agonista de PPAR. La alimentación prolongada con etanol incrementó significativamente el nivel de expresión medio del receptor de IGF-I, pero los tratamientos con agonistas de PPAR redujeron la cantidad de ARNm del receptor de IGF-I a la observada en los controles correspondientes (figura 12E). La expresión del receptor de IGF-III presentó la misma abundancia en los hígados expuestos al etanol y de control, y los tratamientos con agonistas de PPAR redujeron de forma similar el nivel medio del ARNm del receptor de IGF-II en ambos grupos (figura 12F).

En los hígados expuestos al etanol y en los de control, la cantidad de ARNm de IRS-1 fue la más alta (figura 12G), seguido de IRS-2 (figura 12H) y luego IRS-4 (figura 12I). El nivel medio de IRS-1 fue similar en las ratas alimentadas con etanol y en las de control (figura 12G). Los tratamientos con agonistas de PPAR no alteraron significativamente la expresión del gen de IRS-1 en los controles, pero en las ratas alimentadas con etanol el tratamiento sobre PPAR-δ redujo significativamente la cantidad de ARNm de IRS-1 respecto al vehículo y a los controles correspondientes en los que se trató el PPAR-δ. El nivel de expresión medio de IRS-2 fue significativamente más alto en los hígados expuestos al etanol que en los hígados de control (figura 12H). En el grupo de control, la expresión de IRS-2 se incrementó significativamente mediante el tratamiento con el agonista de PPAR-δ, mientras que en las ratas expuestas al etanol, la expresión de IRS-2 se redujo significativamente con el tratamiento con el agonista de PPAR-γ. El nivel medio del ARNm de IRS-4 fue similar para los hígados de control y los expuestos al etanol, y en el grupo de control, el tratamiento con los agonistas de PPAR no alteró significativamente el nivel de expresión medio de IRS-4 (figura 12I). Por el contrario, en el grupo expuesto al etanol, el tratamiento con el agonista de PPAR-δ redujo significativamente el nivel de expresión medio de IRS-4, de modo similar a su efecto sobre IRS-1 (véase más arriba).

Efectos del etanol y de los tratamientos con agonistas de PPAR sobre la fijación del IGF y de la insulina al receptor:

Se utilizaron ensayos de fijación a saturación para demostrar los efectos del etanol y de los tratamientos con agonistas de PPAR sobre la fijación del IGF-I, del IGF-II y de la insulina al receptor. Estos estudios se realizaron con muestras agrupadas de tejido hepático de 8 ratas (proporciones iguales por contenido de proteína) dentro de cada subgrupo. Las curvas de fijación ± 95% L.I.C., cálculos de Kd (constante de disociación; afinidad) y BMAX (fijación máxima) y las comparaciones estadísticas entre los grupos se generaron con el programa informático Prism Graphics 5. En todas las condiciones experimentales, un modelo de sitio único produjo la R^2 más alta, a saber, el mejor ajuste. La alimentación prolongada con etanol redujo significativamente la BMAX, pero no tuvo un efecto significativo sobre la Kd para la fijación de la insulina al receptor (figuras 13A, 13E y tabla 3). En el grupo de control, la BMAX para la fijación de la insulina al receptor se redujo significativamente con el tratamiento con un agonista de PPAR-α, de PPAR-δ o de PPAR-γ (figuras 13A-13D y tabla 3). El tratamiento del PPAR-α tuvo el efecto más pronunciado en términos de reducción de la BMAX de la insulina al receptor. Por el contrario, los tratamientos con agonistas de PPAR no alteraron significativamente la Kd de la fijación de la insulina. En las ratas expuestas al etanol, el tratamiento de PPAR-α no modificó la BMAX e incrementó la Kd respecto al vehículo, mientras que el tratamiento con un agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ incrementó significativamente la BMAX de la insulina al receptor y disminuyó su Kd, lo que indica un nivel más alto de fijación máxima y el incremento de la afinidad de fijación respecto a los hígados de control tratados con los agonistas de PPAR correspondientes y el vehículo (figuras 13E-13H y tabla 3).

TABLA 3A: Fijación de la insulina al receptor

Grupo	BMAX ± E.E.M.	95% I.C.- BMAX	Kd ± E.E.M.	95% I.C.- Kd	R^2
Control + vehículo	7,23 ± 2,66	1,83-12,63	165,5 ± 73	16,6-314,5	0,929
Control + PPAR-α	1,03 ± 0,16***	0,69-1,36	34,0 ± 9,4***	14,93-53,14	0,884

Grupo	BMAX ± E.E.M.	95% I.C.- BMAX	Kd ± E.E.M.	95% I.C.- Kd	R^2
Control + PPAR-δ	4,93 ± 1,99	0,89-8,97	165,7 ± 80,7	2,23-329,1	0,920
Control + PPAR-γ	8,06 ± 10,73	-13,78-29,91	300,6 ± 448,5	-612,4-1214	0,778
Etanol + vehículo	2,59 ± 0,61**	1,36-3,82	51,38 ± 18,63***	13,62-89,15	0,84
Etanol + PPAR-α	2,04 ± 0,35***	1,33-2,75	8,45 ± 4,06***	0,21-16,69	0,57
Etanol + PPAR-δ	3,21 ± 0,45**	2,29-4,12	43,85 ± 9,91**	23,76-63,94	0,92
Etanol + PPAR-γ	2,08 ± 0,42***	1,22-2,93	23,26 ± 9,33**	4,3-42,22	0,746
* *P* < 0,05; ** *P* < 0,001; *** *P* < 0,0001 respecto a control + vehículo					

TABLA 3B: Fijación de IGF-I al receptor

Grupo	BMAX ± E.E.M.	95% I.C.-BMAX	Kd ± E.E.M.	95% I.C.-Kd	R^2
Control + vehículo	3,62 ± 0,77	2,04-5,21	131,9 ± 49,7	30,64-233,1	0,79
Control + PPAR-α	2,52 ± 0,31**	1,87-3,16	63,3 ± 16,2**	30,2-95,4	0,84
Control + PPAR-δ	1,64 ± 0,37**	0,88-2,39	57,2 ± 27,1	0,88-2,4	0,48
Control + PPAR-γ	6,43 ± 2,00*	2,32-10,63	425,7 ± 178,1**	80,9-790,4	0,91
Etanol + vehículo	2,66 ± 0,38*	1,88-3,45	43,57 ± 13,71**	15,49-71,68	0,78
Etanol + PPAR-α	4,21 ± 0,88	2,42-6,00	127,3 ± 45,86	32,2-222,4	0,76
Etanol + PPAR-δ	3,81 ± 0,89	1,99-5,62	120,6 ± 52,1	14,4-226,8	0,71
Etanol + PPAR-γ	2,74 ± 0,91	0,87-4,60	100,1 ± 63,2	-28,9-229,0	0,48
* *P* < 0,05; ** *P* < 0,001; *** *P* < 0,0001 respecto a control + vehículo					

TABLA 3C: Fijación de IGF-II al receptor

Grupo	BMAX ± E.E.M.	95% I.C.-BMAX	Kd ± E.E.M.	95% I.C.-Kd	R^2
Control + vehículo	40,12 ± 3,04	33,96-46,27	29,3 ± 5,8	17,6-40,9	0,92
Control + PPAR-α	40,27 ± 3,28	33,62-46,9	31,4 ± 6,4	18,3-44,5	0,91
Control + PPAR-δ	29,01 ± 1,99***	24,99-33,04	21,5 ± 4,3	12,6-29,9	0,91
Control + PPAR-γ	25,20 ± 2,04***	21,06-29,34	14,6 ± 3,9**	6,6-22,6	0,83
Etanol + vehículo	22,63 ± 5,25*	12,00-33,25	32,4 ± 18,7	-5,5-70,4	0,53

Grupo	BMAX ± E.E.M.	95% I.C.-BMAX	Kd ± E.E.M.	95% I.C.-Kd	R^2
Etanol + PPAR-α	28,88 ± 6,20	16,31-41,44	40,5 ± 20,0	16,3-41,4	0,59
Etanol + PPAR-δ	51,50 ± 13,53	24,11-78,90	75,6 ± 37,1	0,52-150,8	0,60
Etanol + PPAR-γ	22,56 ± 4,43*	13,60-31,53	32,3 ± 15,8	0,26-64,38	0,60
* *P* < 0,05; ** *P* < 0,001; *** *P* < 0,0001 respecto a control + vehículo					

La alimentación prolongada con etanol redujo significativamente la BMAX y la Kd de IGF-I. En las ratas con la alimentación de control, el tratamiento del PPAR-α redujo la BMAX de IGF-I, mientras que los tratamientos de PPAR-δ y de PPAR-γ incrementaron significativamente la BMAX de IGF-I (figura 14). Los tratamientos con agonistas de PPAR no alteraron significativamente la Kd de IGF-I en las ratas con la alimentación de control (figuras 14A-14D). En las ratas alimentadas con etanol, el tratamiento de PPAR-α o de PPAR-δ incrementó significativamente la BMAX y la Kd, mientras que el tratamiento del PPAR-γ incrementó la Kd para la fijación de IGF-I al receptor, pero redujo su BMAX (figuras 14E-14H). La alimentación prolongada con etanol también redujo significativamente la BMAX de la fijación de IGF-II al receptor, pero incrementó su Kd, y los tratamientos con agonistas de PPAR no tuvieron un efecto significativo sobre la BMAX ni la Kd en los grupos de control o expuesto a etanol (figura 15 y tabla 3).

Efectos del etanol y de los tratamientos con agonistas de PPAR sobre la expresión de genes que responden a insulina/IGF relacionados con el metabolismo energético y la remodelación del tejido:

La expresión de AAH se incrementa con la estimulación de insulina, IGF-I o IGF-II y tiene efectos positivos sobre el crecimiento y la movilidad hepatocelulares [Cantarini et al., *Hepatology*, 44: 446 (2006); de la Monte et al., *J. Hepatol*. 44: 971 (2006)]. La GAPDH es un gen que responde a la insulina que tiene una función importante en el metabolismo de la glucosa. El análisis por inmunotransferencia detectó inmunorreactividad de AAH y de GAPDH en todas las muestras de hígado (figura 16A). Al volver a hibridar las transferencias con el anticuerpo monoclonal contra la β-actina se mostró que la carga de proteína era casi igual en todos los carriles. La cuantificación de la imagen digital de las señales del análisis de inmunotransferencia reveló que el nivel de AAH y de GAPDH era más bajo en los hígados tratados con el vehículo y expuestos al etanol. En los controles, los tratamientos con agonistas de PPAR no tuvieron ningún efecto detectable sobre el nivel medio de AAH (figura 16B), pero modularon ligeramente (aunque no significativamente) el nivel medio de GAPDH (figura 16C) y de β-actina (figura 16D). Los tratamientos con agonistas de PPAR también modularon ligeramente, pero no significativamente, la expresión hepática de AAH y de GAPDH en el grupo alimentado con etanol. Los cambios netos en el nivel medio de las proteínas AAH y GAPDH hicieron desaparecer las diferencias significativas entre grupos respecto a la expresión de las proteínas AAH y/o GAPDH. Sin embargo, para examinar con mayor detalle los efectos del tratamiento con agonistas de PPAR, se utilizó un ensayo ELISA directo muy sensible con reactivos indicadores fluorescentes.

Los ELISA también mostraron niveles de expresión medios más bajos de AAH (figura 17A) y de GAPDH (figura 17B) en los hígados expuestos al etanol que en los hígados de control (tratados con el vehículo). El tratamiento con el agonista PPAR-α no tuvo un efecto significativo ni sobre la expresión de AAH ni la de GAPDH en los hígados de control ni en los hígados expuestos al etanol. Por el contrario, el tratamiento con el agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ incrementó la expresión de GAPDH en los hígados expuestos al etanol, lo que dio lugar a niveles medios similares a los del control. El tratamiento con el agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ redujo ligeramente la expresión de AAH en los hígados de control, lo que dio lugar a niveles de AAH que eran similares a los obtenidos en los correspondientes grupos alimentados con etanol. La inmunorreactividad de la β-actina no estaba modulada significativamente por la exposición al etanol ni por el tratamiento con agonistas de PPAR y, por consiguiente, no se observaron diferencias significativas entre los grupos respecto al nivel medio de la β-actina (figura 17C).

Este estudio se diseñó para determinar si la enfermedad hepática alcohólica crónica producida en el modelo de rata Long Evans estaba asociada a la resistencia hepática a la insulina y, al mismo tiempo, exploró la hipótesis de que se podrían utilizar los sensibilizadores a la insulina para restaurar la histología hepática en el cuadro clínico de consumo continuo de etanol. Para llevar a cabo estos estudios, se trataron las ratas con un agonista de PPAR-α, de PPAR-δ o de PPAR-γ. Se siguió esta estrategia porque los estudios preliminares demostraron que los tres receptores se expresan en el hígado, aunque no había datos definitivos que indicasen qué clase de agonista de PPAR sería más adecuado para restaurar la estructura y el funcionamiento hepáticos de una enfermedad hepática alcohólica.

La alimentación prolongada con etanol produjo cambios histopatológicos que se parecen a la enfermedad hepática alcohólica en los humanos, entre ellos la prominente desorganización de la estructura con variabilidad en el tamaño nuclear y disminución del número de hepatocitos, aunque no hubiera indicios de fibrosis interlobular o en puentes, cirrosis, formación de nódulos regenerativos o transformación neoplásica. El tratamiento con un agonista de PPAR-α, de PPAR-δ o de PPAR-γ no produjo efectos detectables sobre la histología hepática en los controles, pero redujo sorprendentemente la desorganización estructural asociada al etanol y la esteatosis, a pesar de la exposición continua al etanol. Los agonistas de PPAR-δ y de PPAR-γ fueron más eficaces que el agonista de PPAR-α a la hora

de restaurar la estructura hepática. Estos efectos de los agonistas de PPAR se corresponden con sus acciones antiinflamatorias conocidas, además de sus propiedades sensibilizadoras de la insulina.

Para cuantificar más objetivamente los efectos de los tratamientos con agonistas de PPAR sobre la histología hepática, se utilizó un método para evaluar la expresión relativa de genes específicos que corresponden a diferentes tipos celulares, a saber, el perfil de los hepatocitos. Estos análisis demostraron que la exposición prolongada al etanol reducía significativamente la expresión de la albúmina y del ASBT, lo que sugiere que la alimentación prolongada con etanol reducía significativamente la abundancia y/o funcionalidad de los hepatocitos y de las células epiteliales del conducto biliar. En conjunto, los tratamientos con agonistas de PPAR incrementaron la expresión de la albúmina y del ASBT en los hígados de control y en los expuestos al etanol; no obstante, los efectos diferían con respecto a qué subtipo de agonista de PPAR era el más eficaz y con respecto a la magnitud de las respuestas. En este sentido, los agonistas de PPAR-α y de PPAR-δ vuelven aceptable la expresión de la albúmina y del ASBT en los hígados expuestos al etanol, mientras que los agonistas de PPAR-δ y de PPAR-γ incrementaron la albúmina y disminuyeron la expresión de ASBT significativamente en los hígados de control. Estos hallazgos sugieren que los tratamientos con agonistas de PPAR pueden tener efectos beneficiosos sobre la supervivencia y el funcionamiento de los hepatocitos y de las células epiteliales biliares. El incremento de la expresión de KCR observada en los hígados tratados con agonistas de PPAR y expuestos a etanol es de una importancia incierta. Una posible interpretación es que, en correlación con las mejoras en la histología hepática, se necesita incrementar la actividad de las células de Kupffer para dar cuenta del proceso de reparación.

La GFAP y la desmina son marcadores de la activación de las células estrelladas y de la propensión a una respuesta fibrogénica. La expresión del gen del colágeno se utilizó como índice de la fibrogénesis activa. Los resultados demostraron que los niveles de expresión de GFAP y del colágeno se incrementaron por el tratamiento de PPAR-α en las ratas alimentadas con etanol y de control, lo que apunta a que los agonistas de PPAR-α pueden activar las células estrelladas y finalmente favorecer la fibrogénesis, un efecto que puede ser peor en el contexto de una enfermedad hepática alcohólica. Por el contrario, el tratamiento con el agonista de PPAR-δ redujo la expresión del gen del colágeno en las ratas alimentadas con etanol, pero la incrementó en las ratas de control, y el tratamiento con el agonista de PPAR-γ sólo incrementó la expresión de la desmina en los hígados expuestos al etanol. Aunque estos resultados son complejos, una interpretación posible es que se podrían necesitar determinado nivel de células estrelladas y de respuesta fibrogénica para la reparación hepática en el contexto de la lesión hepática inducida por el etanol prolongado.

El análisis por qRT-PCR se utilizó para evaluar la integridad de la «maquinaria» requerida para la señalización de la insulina y de los IGF. Los estudios demostraron que los niveles de expresión de los polipéptidos de insulina, IGF-I e IGF-II, de los correspondientes receptores y de las moléculas IRS estaban relativamente conservados en los hígados con exposición prolongada al etanol, lo que indica que las alteraciones de la señalización de insulina e IGF ocasionadas por la exposición prolongada al etanol no se podían atribuir a deficiencias locales de factores de crecimiento, ni a la disminución o pérdida de los receptores, ni a la alteración de la expresión de las moléculas de acoplamiento principales que transmiten las señales vía abajo. Cabe destacar que el tratamiento con el agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ incrementó significativamente la expresión de la insulina y del IGF-I en los hígados de control, pero o bien inhibió o bien no tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión génica de los factores tróficos en los hígados expuestos al etanol. De igual forma, el nivel de expresión de los receptores de insulina, IGF-I e IGF-II, y el nivel de expresión de IRS-1, IRS-2 e IRS-4 no se modularon con los tratamientos con agonistas de PPAR. Por lo tanto, cualquier mejora en la histología hepática asociada al tratamiento con agonistas de PPAR en las ratas alimentadas con etanol no se debió a un incremento en la expresión local de los factores de crecimiento, ni de los receptores de factores de crecimiento ni de los genes de IRS.

La fijación eficaz del ligando es decisiva para la cascada de señalización, y muchos de los efectos vía abajo de la alteración de la señalización de la insulina que se han descrito en los hígados expuestos al etanol, que incluyen la reducción de la supervivencia celular, se podrían deber a la inhibición de la fijación de la insulina a su receptor. Dado el hecho de que la señalización a través de IGF-I o IGF-II activa las vías de IRS tanto directamente como a través de una interferencia, también resultaba interesante medir la fijación de IGF-I e IGF-II al receptor en estos modelos. Los estudios que utilizan ensayos competitivos de fijación en saturación demostraron que la exposición prolongada al etanol altera significativamente la fijación del ligando a los receptores de insulina, IGF-I e IGF-II, como se puso de manifiesto con la reducción de la BMAX (fijación máxima) y el incremento de la Kd (reducción de la afinidad). Los tratamientos con el agonista de PPAR-δ y, en algunos casos, con el agonista de PPAR-γ, incrementaron significativamente la fijación de la insulina, del IGF-I y/o del IGF-II al receptor, lo que da lugar a unos valores más altos, a saber, normalizados, de BMAX en los hígados expuestos al etanol. Aunque todavía no se ha determinado el mecanismo por el que se incrementa la fijación al receptor, este efecto podría haber sido mediado por correcciones en la composición lipídica de la membrana, dado que en estudios previos se había demostrado que la fijación del ligando a los receptores de la insulina y de los IGF estaba afectada debido al agotamiento del colesterol de la membrana, y se restauró mediante la reposición del colesterol de la membrana. Independientemente del mecanismo, es probable que los incrementos, asociados a los agonistas de PPAR ,relacionados con la fijación de la insulina y de los IGF al receptor tuvieran una importancia decisiva a la hora de restaurar la estructura y el funcionamiento hepáticos, que incluyen la expresión génica en respuesta a insulina/IGF, a pesar de la exposición continua al etanol.

Para examinar las consecuencias de los incrementos provocados por los agonistas de PPAR sobre la fijación de la insulina y de los IGF al receptor en los hígados expuestos al etanol, se valoró la expresión génica en respuesta a la insulina y a los IGF mediante análisis de inmunotransferencia y ELISA. Tal y como se esperaba, los hígados expuestos al etanol de las ratas tratadas con el vehículo presentaron niveles significativamente reducidos de GAPDH y de AAH, que intervienen respectivamente en el metabolismo energético y en la movilidad celular requeridos para la regeneración y la remodelación del tejido. El tratamiento con un agonista de PPAR-δ o de PPAR-γ incrementó significativamente la expresión de la GAPDH, lo que dio lugar a la normalización de los niveles respecto a los controles tratados con el vehículo. Por consiguiente, las consecuencias que el incremento de la fijación del ligando al receptor tiene vía abajo fueron el incremento de la expresión génica que responde a insulina/IGF y/o la mejora de la histología hepática, a pesar de la exposición continua al etanol. Es importante señalar que el incremento de la cantidad de GAPDH puede ser un factor importante para la reducción de la esteatosis debido a la mejora del metabolismo energético y a la producción de ATP, mientras que el incremento en la expresión de AAH podría haber ayudado a la remodelación del hígado y a su reparación, por lo tanto ayudando a mantener la histología del hígado relativamente normal. En conjunto, los resultados sugieren que los tratamientos con agonistas de PPAR pueden ser útiles para revertir algunos de los efectos adversos de una enfermedad hepática alcohólica crónica, en particular con respecto a la restauración de la estructura del hígado y su funcionamiento.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Hospital de Rhode Island

<120> Tratamiento, prevención y reversión de una enfermedad hepática alcohólica

<130> 2306.003PC01

<150> US 60/842.983
<151> 2006-09-08

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del ARNr 18S

<400> 1

ggacacggac aggattgaca 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del ARNr 18S

<400> 2

acccacggaa tcgagaaaga 20

<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de la insulina

<400> 3

ttctacacac ccaagtcccg tc 22

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de la insulina

<400> 4

atccacaatg ccacgcttct gc 22

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del receptor de la insulina

<400> 5

tgacaatgag gaatgtgggg ac 22

<210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del receptor de la insulina

<400> 6

gggcaaactt tctgacaatg actg 24

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del IGF-I

<400> 7

gaccaagggg cttttacttc aac 23

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del IGF-I

<400> 8

tttgtaggct tcagcggagc ac 22

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del receptor de IGF-I

<400> 9

gaagtctgcg gtggtgataa agg 23

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del receptor de IGF-I

<400> 10

tctgggcaca aagatggagt tg 22

<210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético del IGF-II

<400> 11

ccaagaagaa aggaagggga cc 22

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del IGF-II

<400> 12

ggcggctatt gttgttcaca gc 22

<210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del receptor de IGF-II

<400> 13

ttgctattga ccttagtccc ttgg 24

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético del receptor de IGF-II

<400> 14

agagtgagac ctttgtgtcc ccac 24

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de la albúmina

<400> 15

cttcaaagcc tgggcagtag 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de la albúmina

<400> 16

tggagatagt ggcctggttc 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de ASBT

<400> 17

gcattggcat ttctctggtt 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de ASBT

<400> 18

ggttcaatga tccaggcact 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de KCR

<400> 19

tcacaaatgc tgtggaccat 20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de KCR

<400> 20

gtcttcacgc tctccgtttc 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de GFAP

<400> 21

ggtggagagg gacaatctca 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de GFAP

<400> 22

ctcgaacttc ctcctcatgg 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de la desmina

<400> 23

acctgcgaga ttgatgctct 20

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de la desmina

<400> 24

acatccaagg ccatcttca 19

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de colla2

<400> 25

acctcagggt gttcaaggtg 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de colla2

<400> 26

cggattccaa taggaccaga 20

<210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de IRS-1

<400> 27

gataccgatg gcttctcaga cg 22

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de IRS-1

<400> 28

tcgttctcat aatactccag gcg 23

<210> 29

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de IRS-2

<400> 29

caacattgac tttggtgaag ggg 23

<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de IRS-2

<400> 30

tgaagcagga ctactggctg agag 24

<210> 31
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de IRS-4

<400> 31

acctgaagat aaggggtcgt ctgc 24

<210> 32
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de IRS-4

<400> 32

tgtgtggggt ttagtggtct gg 22

<210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213.>Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de GAPDH

<400> 33

agtgggcatc aatggatttg g 21

<210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de GAPDH

<400> 34

ggggatttcc ttaggttctt tgc 23

<210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de AAH

<400> 35

tgcctgctcg tcttgtttgt g 21

<210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético de AAH

<400> 36

atccgttctg taacccgttg g 21

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista selectivo del receptor δ activado por los inductores de la proliferación de los peroxisomas (PPAR-δ) en la fabricación de un medicamento para:

(i) el tratamiento, la prevención o la reversión de una enfermedad hepática alcohólica; o (ii) el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal.

2. Agonista selectivo de PPAR-δ para la utilización en el tratamiento, la prevención o la reversión de una enfermedad hepática alcohólica, o para la utilización en el tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal.

3. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 1 cuando el medicamento está destinado al tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal, o un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 2 cuando el agonista de PPAR está destinado al tratamiento, la prevención o la reversión de la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol en un animal,

en donde dicha lesión hepática está asociada a:

i) estrés oxidativo;

ii) peroxidación lipídica, o

iii) daños en el ADN.

4. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la reversión de la resistencia a la insulina en el hígado de un animal producida por la ingesta prolongada de alcohol, en donde dicha resistencia a la insulina puede opcionalmente ser el resultado de la disminución de la fijación de la insulina al receptor de la insulina.

5. Agonista selectivo de PPAR-δ para la utilización en el tratamiento, la prevención o la reversión de la resistencia a la insulina en el hígado de un animal producida por la ingesta prolongada de alcohol, en donde dicha resistencia a la insulina puede opcionalmente ser el resultado de una disminución de la fijación de la insulina al receptor de la insulina.

6. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ en la fabricación de un medicamento para la estimulación o la restauración de la respuesta regenerativa hepática en un animal con una ingesta prolongada de alcohol.

7. Agonista selectivo de PPAR-δ para la utilización en la estimulación o la restauración de la respuesta regenerativa hepática en un animal con una ingesta prolongada de alcohol.

8. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 6, o el agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 5 o 7, en donde dicho tratamiento, dicha prevención o dicha reversión comprende además la administración de:

i) un agonista selectivo de PPAR-α; o

ii) un agonista selectivo de PPAR-γ

9. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 6, o un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 5 o 7, en donde dicho tratamiento, dicha prevención o dicha reversión comprende la administración de dos o más agonistas de PPAR que opcionalmente se fijan a al menos dos subtipos diferentes de receptores PPAR.

10. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 1 cuando el medicamento está destinado al tratamiento, a la prevención o a la reversión de una enfermedad hepática alcohólica en un animal, o un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 2 cuando el agonista de PPAR está destinado al tratamiento, a la prevención o a la reversión de una enfermedad hepática alcohólica en un animal, en donde dicha enfermedad hepática es esteatosis, hepatitis alcohólica o cirrosis alcohólica.

11. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 1 cuando el tratamiento, la prevención o la reversión es con respecto a la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol, la utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 4 o 6, el agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 2 cuando el tratamiento, la prevención o la reversión es con respecto a la lesión hepática producida por la ingesta prolongada de alcohol, o el agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 5 o 7,

en donde dicha ingesta prolongada de alcohol es al menos de aproximadamente 0,1 g de alcohol puro/kg masa

corporal y día de media; preferiblemente de aproximadamente 0,5 g de alcohol puro/kg masa corporal y día de media; y más preferiblemente de aproximadamente 1 g de alcohol puro/kg masa corporal y día de media.

12. Utilización de un agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 6, o el agonista selectivo de PPAR-δ de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha respuesta de regeneración hepática está estimulada a un nivel un 10% mayor que la respuesta en ausencia de administración de dicho agonista selectivo de PPAR-δ, preferiblemente a un nivel un 50% mayor que la respuesta en ausencia de la administración de dicho agonista selectivo de PPAR-δ.

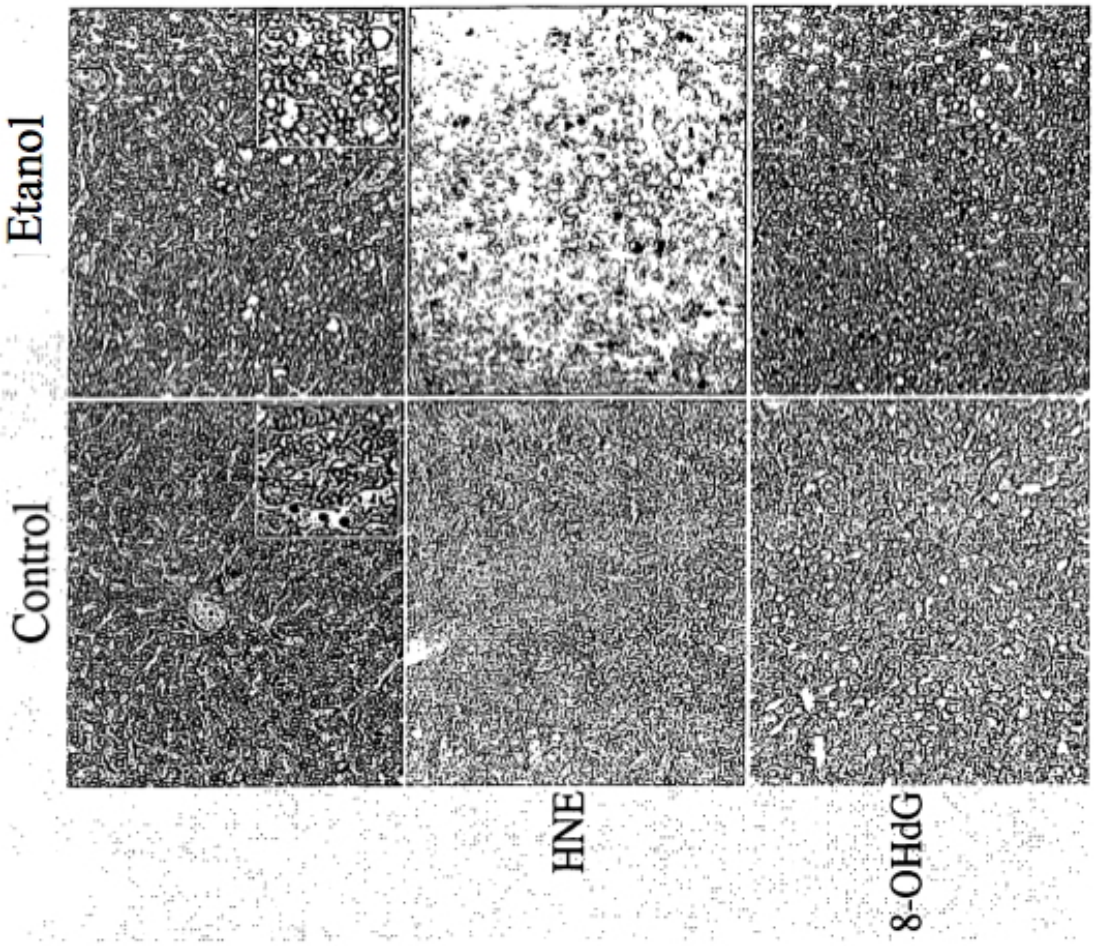
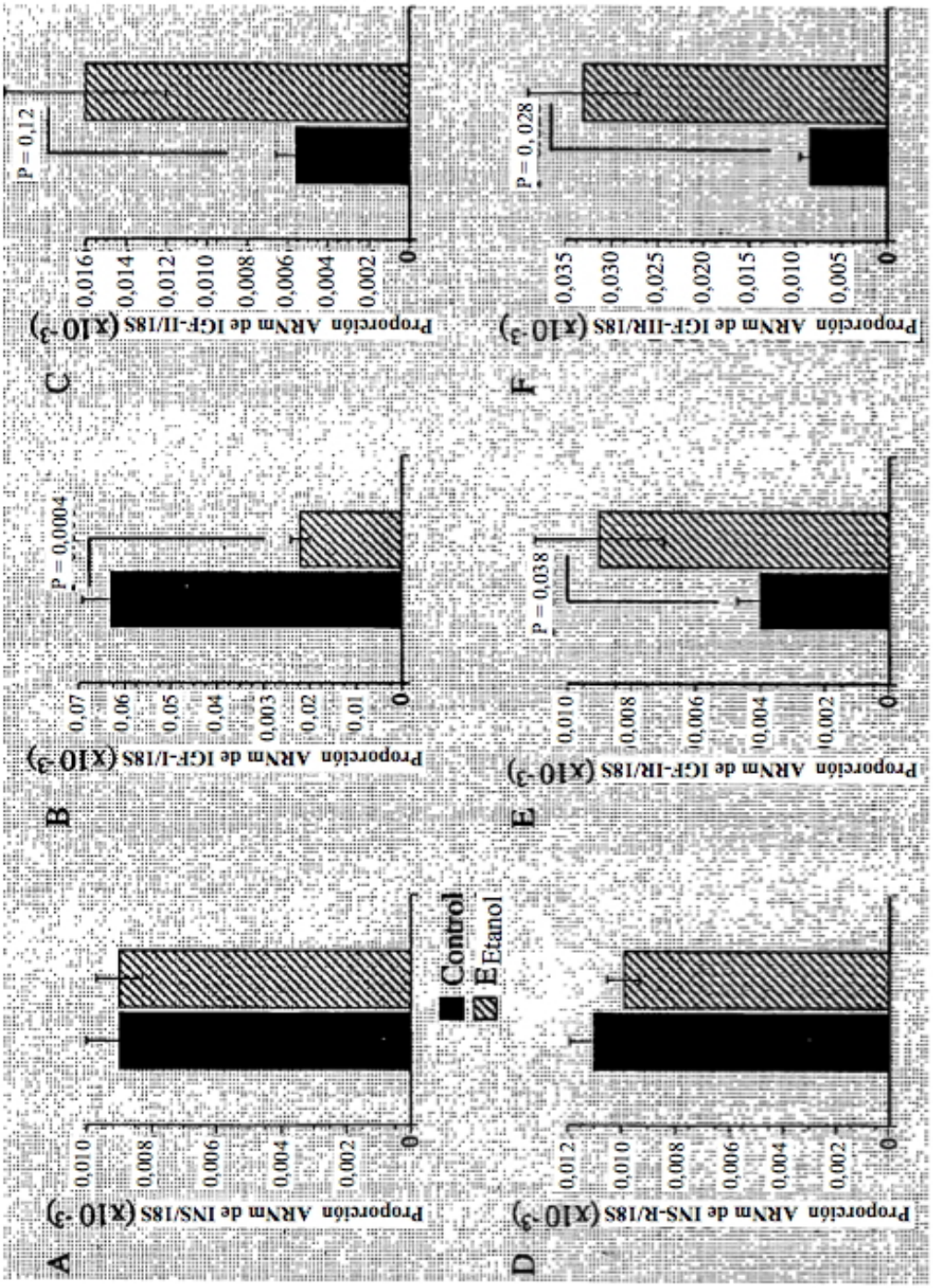


Fig. 1

Fig. 2


A
Proporción ARNm de INS/18S (x10-3)
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0
B
Proporción ARNm de IGF-I/18S (x10-3)
0,07
0,06
0,05
0,04
0,003
0,02
0,01
0
P = 0,0004
C
Proporción ARNm de IGF-II/18S (x10-3)
0,016
0,014
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0
P = 0,12
Control
Etanol
D
Proporción ARNm de INS-R/18S (x10-3)
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0
E
Proporción ARNm de IGF-IR/18S (x10-3)
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0
P = 0,038
F
Proporción ARNm de IGF-IIR/18S (x10-3)
0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0
P = 0, 028

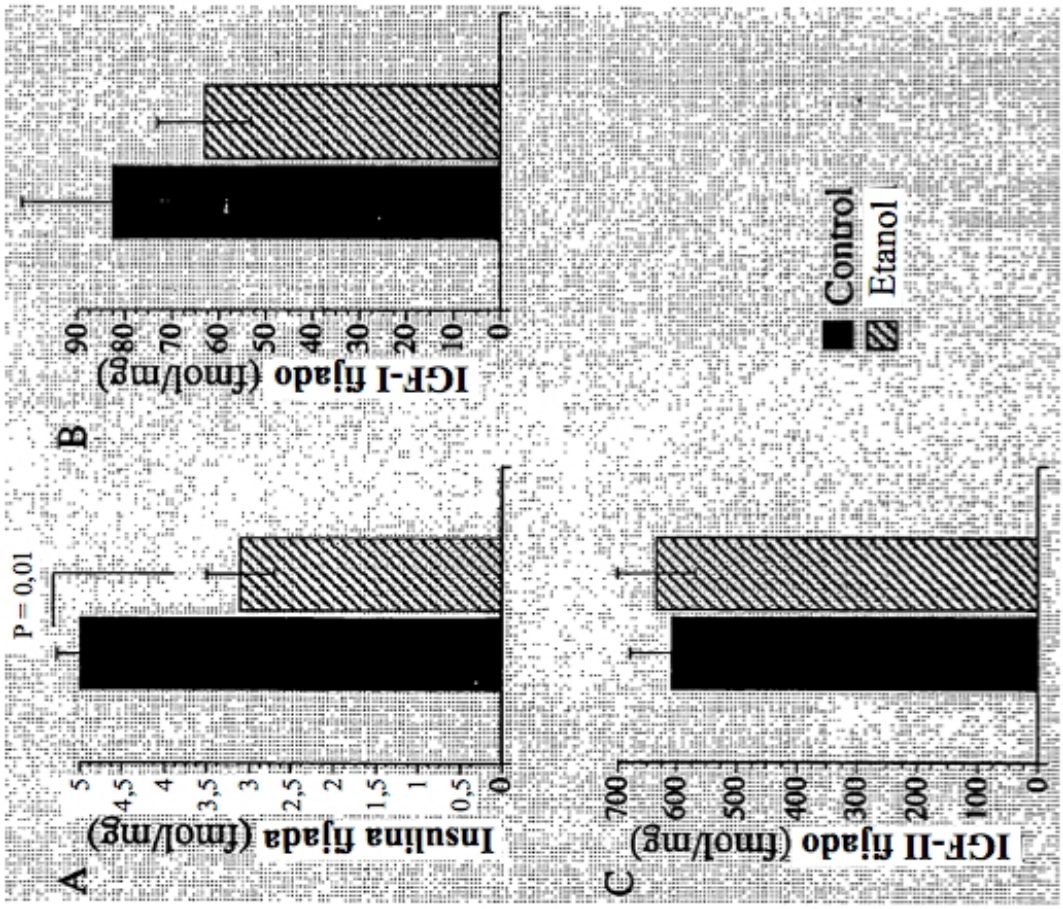

A
Insulina ayuno (fmol/mg)
P = 0,01
B
IGF-I ayuno (fmol/mg)
C
IGF-II ayuno (fmol/mg)
Control
Etanol

Fig. 3

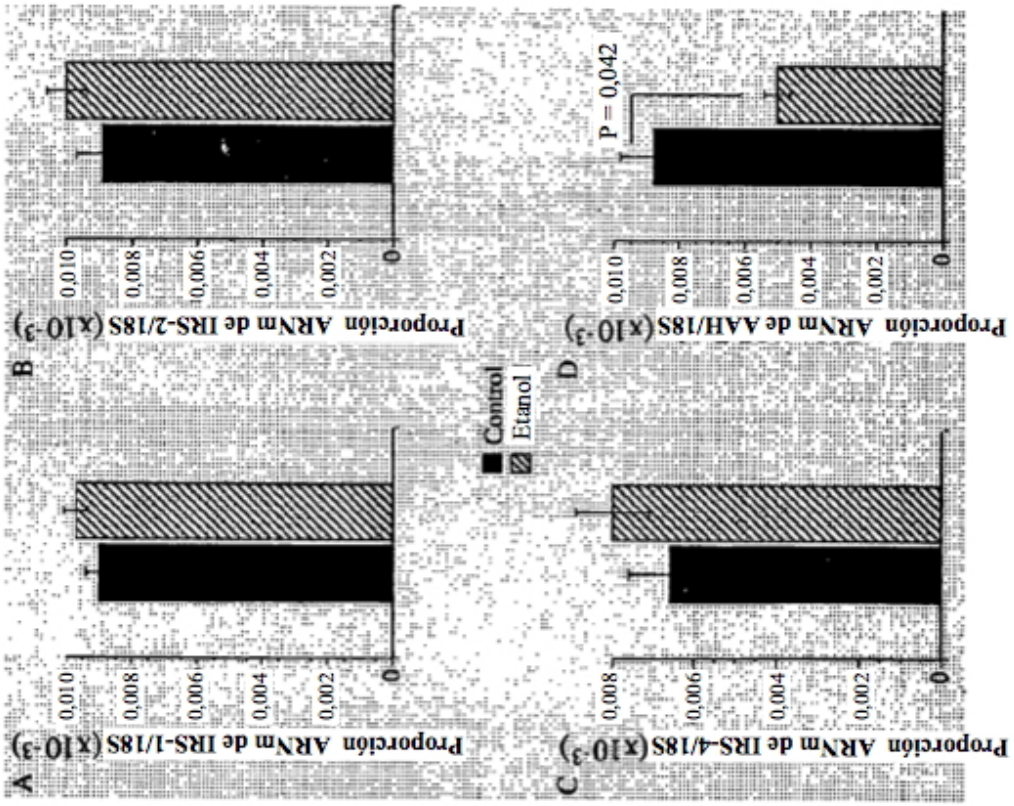

A
Proporción ARNm de IRS-1/18S (x10-3)
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0
B
Proporción ARNm de IRS-2/18S (x10-3)
C
Proporción ARNm de IRS-4/18S (x10-3)
D
Proporción ARNm de AAH/18S (x10-3)
P = 0,042
Control
Etanol

Fig. 4

Fig. 5

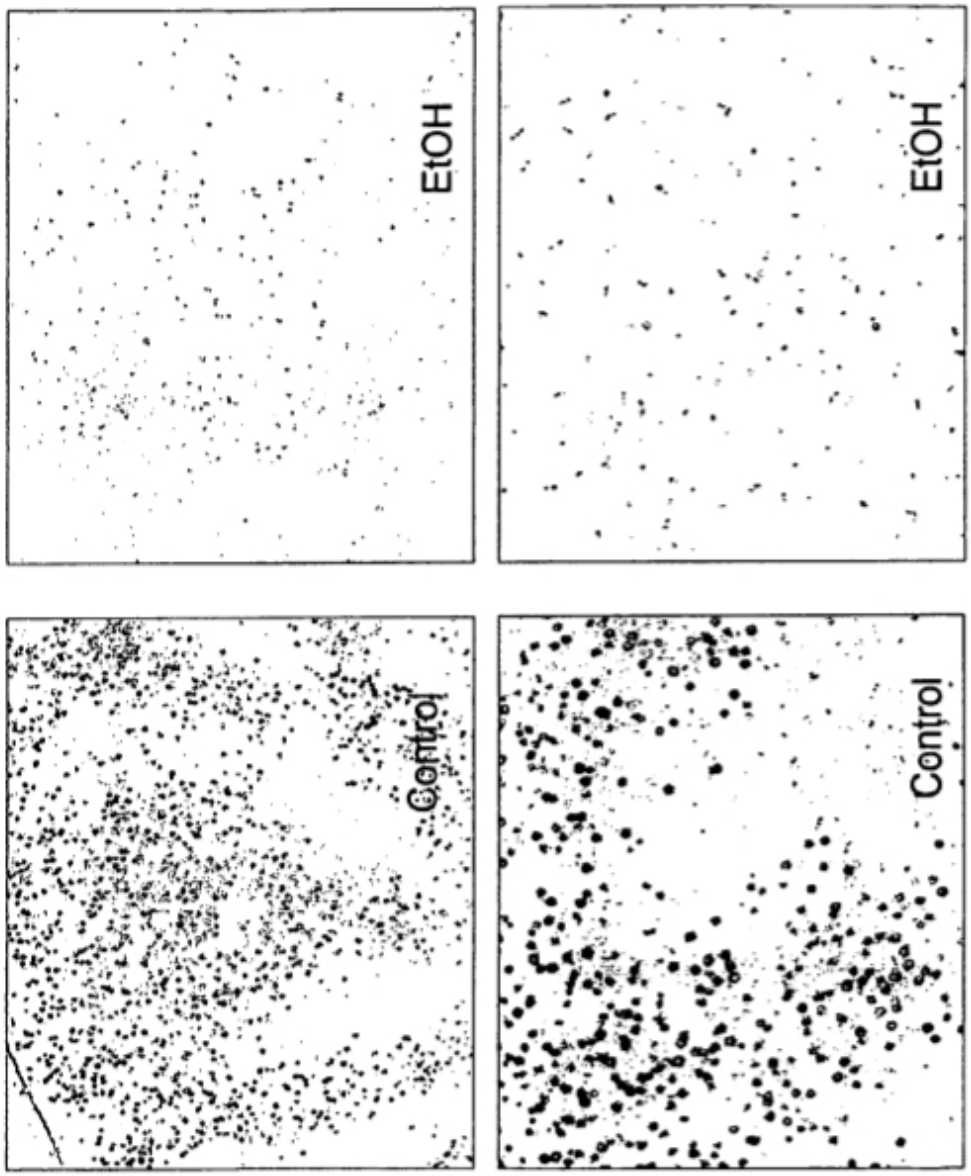


Fig. 6

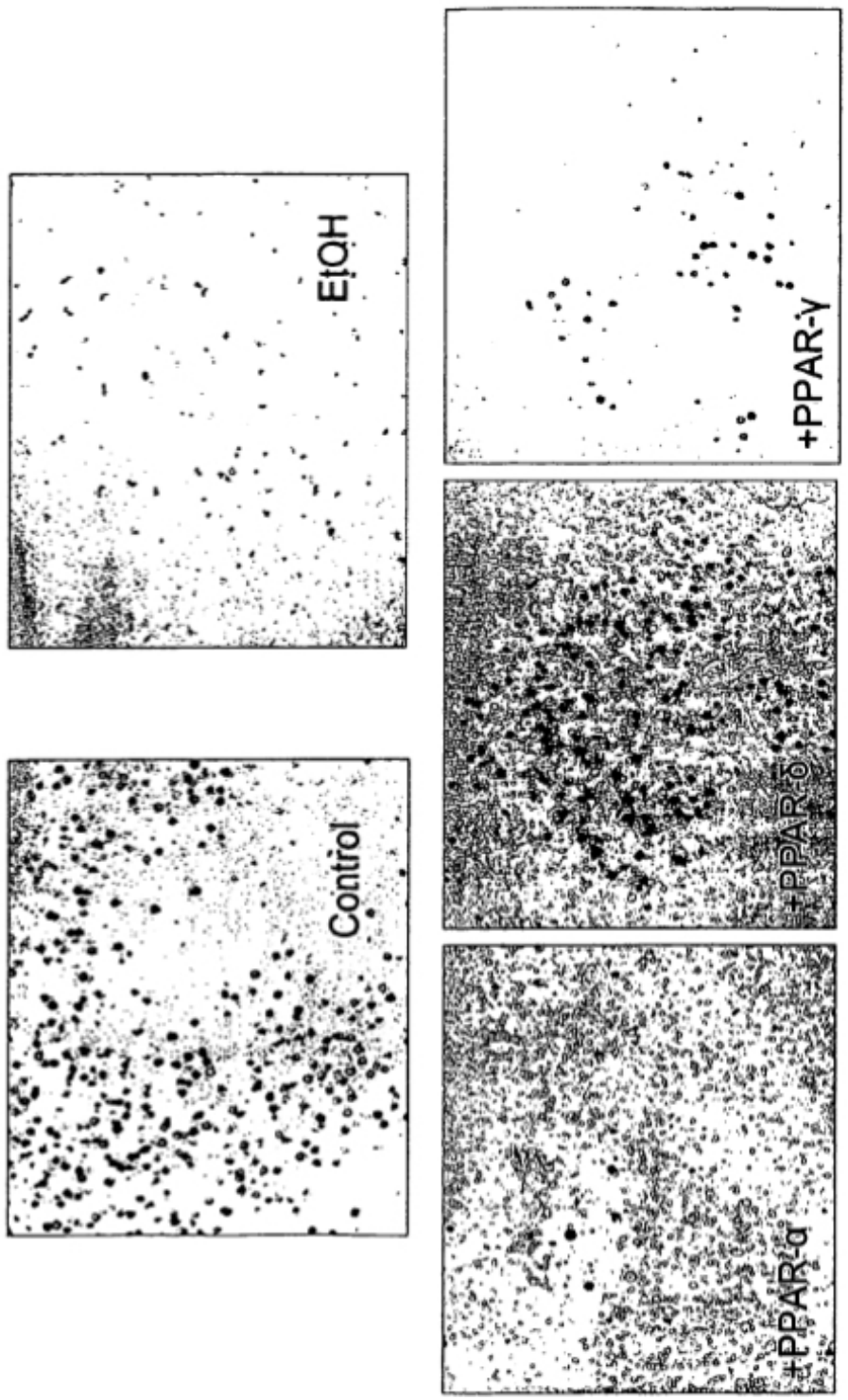


Fig. 7

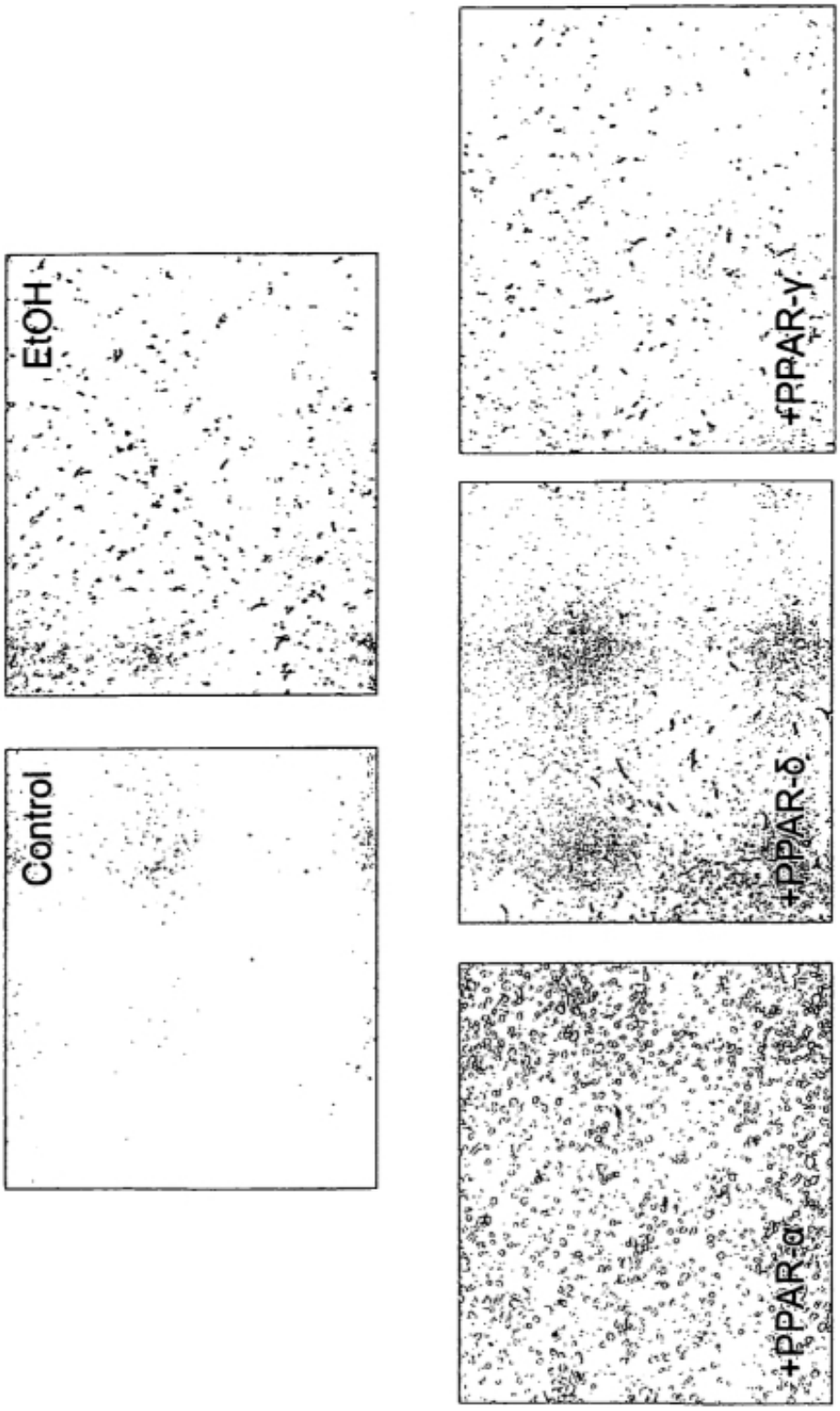
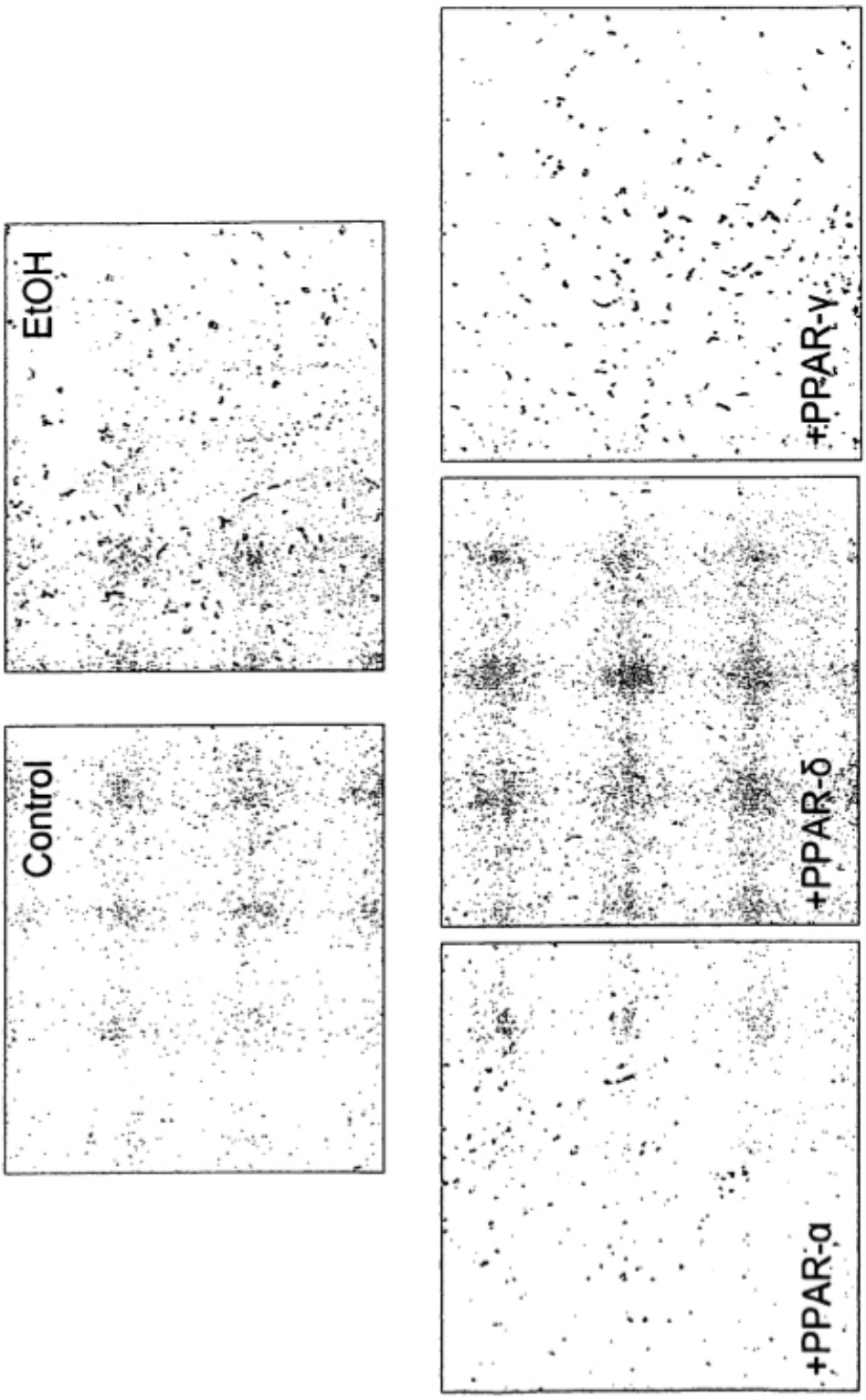


Fig. 8



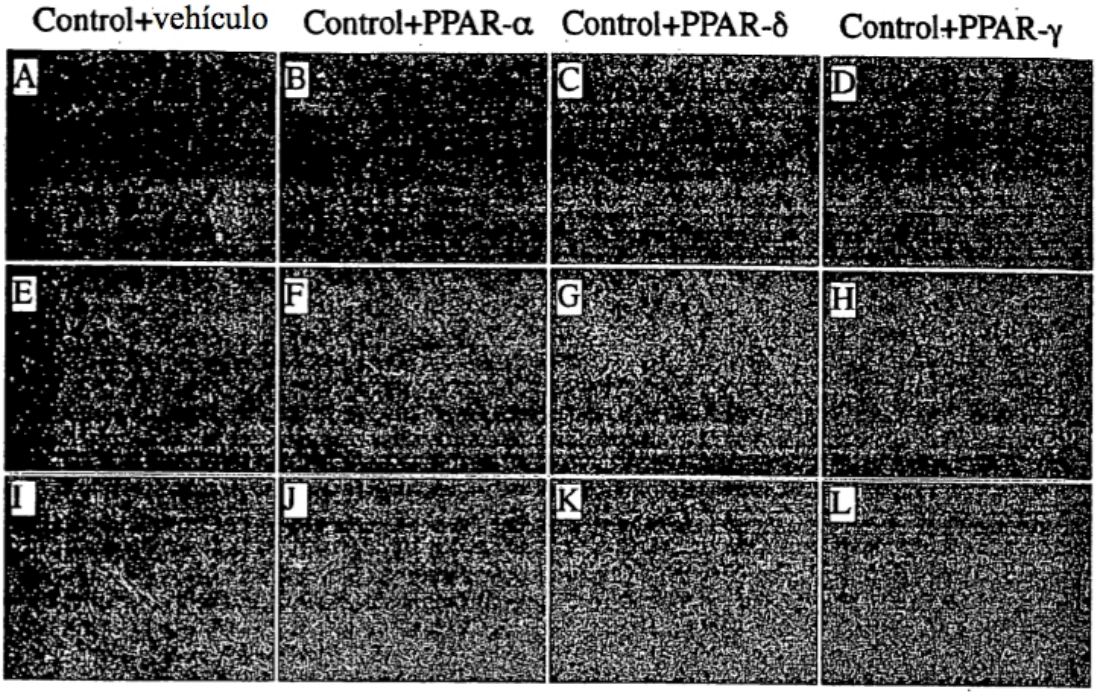

Control+vehículo
Control+PPAR-α
Control+PPAR-δ
Control+PPAR-γ
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

FIG. 9

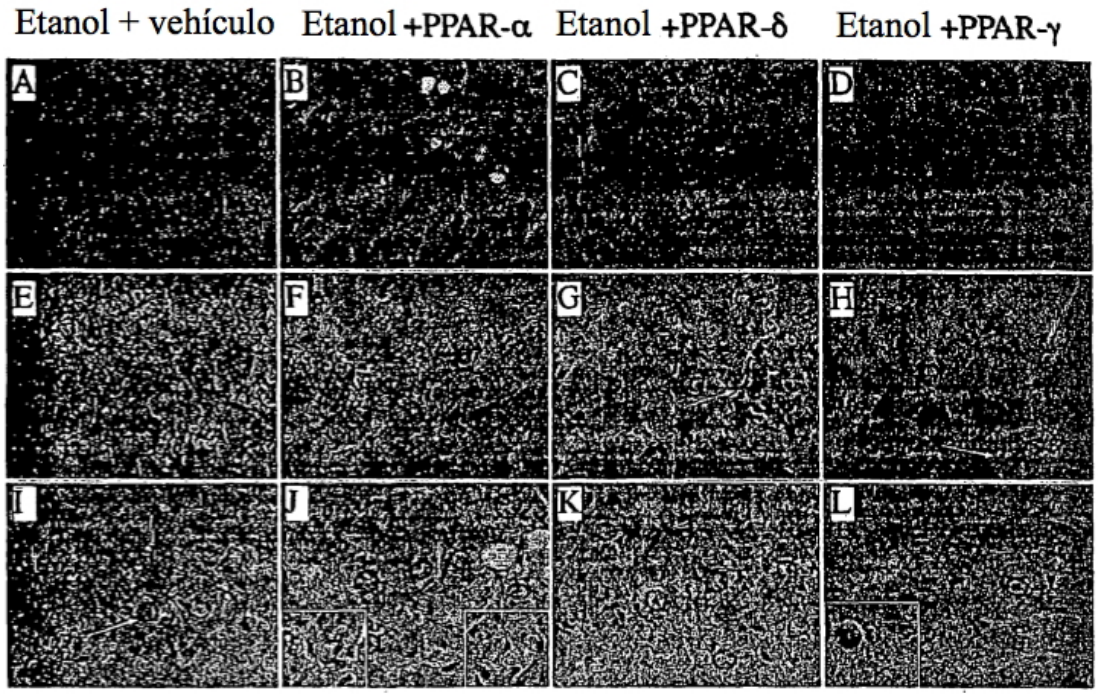

Etanol + vehículo
Etanol +PPAR-α
Etanol +PPAR-δ
Etanol +PPAR-γ
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

FIG. 10

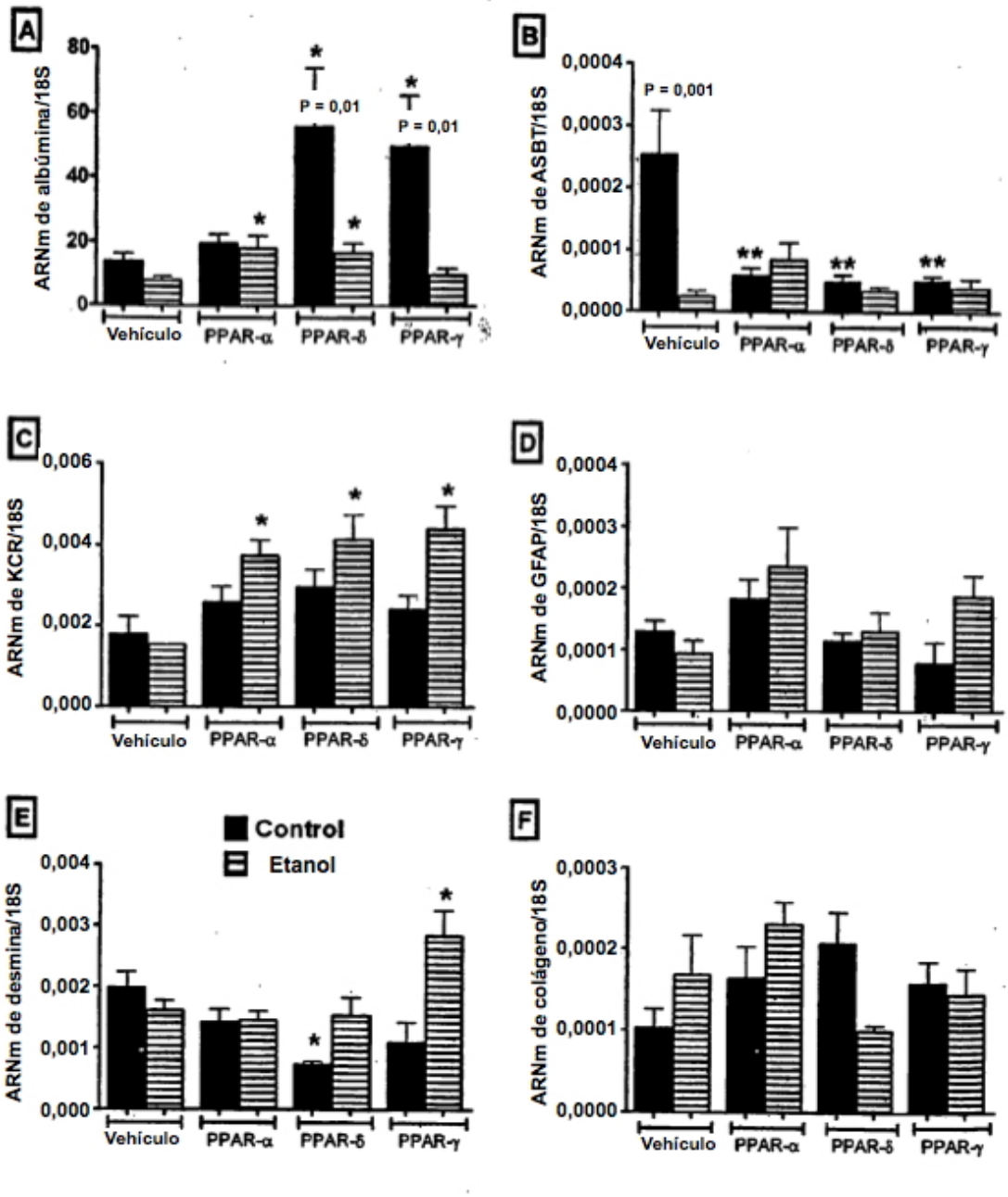

A
ARNm de albúmina/18S
80
60
40
20
0
P = 0,01
P = 0,01
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
B
ARNm de ASBT/18S
0,0004
0,0003
0,0002
0,0001
0,0000
P = 0,001
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
C
ARNm de KCR/18S
0,006
0,004
0,002
0,000
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
D
ARNm de GFAP/18S
0,0004
0,0003
0,0002
0,0001
0,0000
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
E
Control
Etanol
ARNm de desmina/18S
0,004
0,003
0,002
0,001
0,000
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
F
ARNm de colágeno/18S
0,0003
0,0002
0,0001
0,0000
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ

FIG. 11

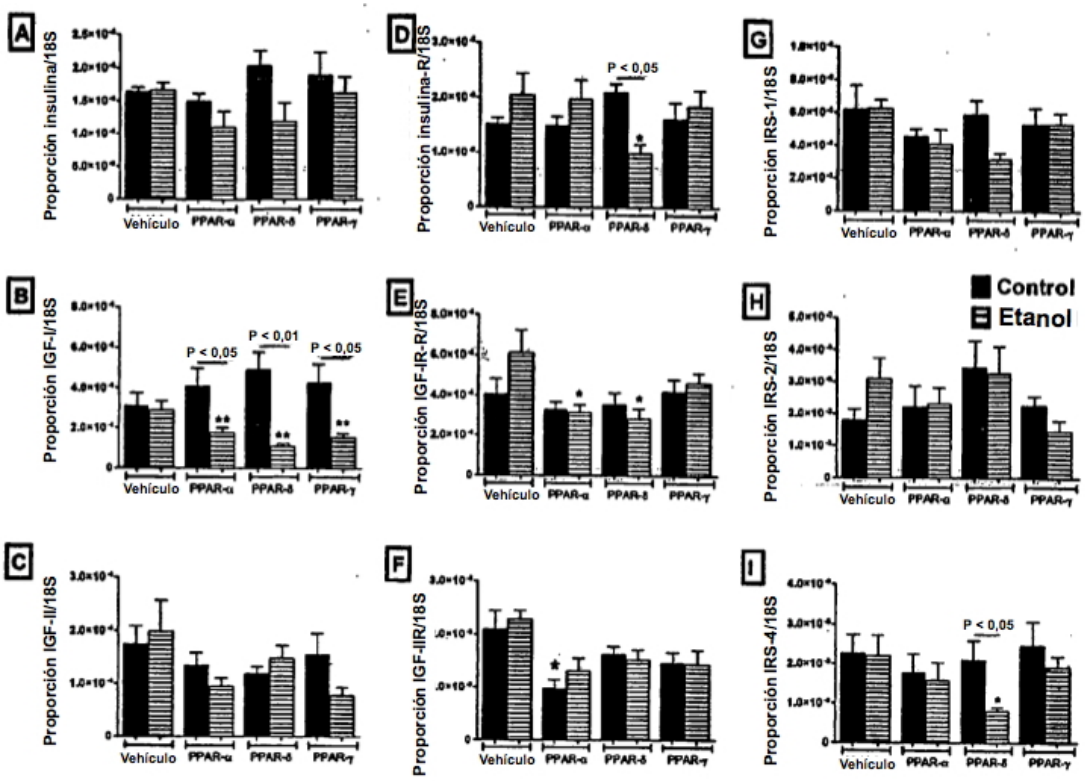

A
Proporción insulina/18S
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
D
Proporción insulina-R/18S
P < 0,05
G
Proporción IRS-1/18S
B
Proporción IGF-I/18S
P < 0,05
P < 0,01
P < 0,05
E
Proporción IGF-IR-R/18S
H
Proporción IRS-2/18S
Control
Etanol
C
Proporción IGF-II/18S
F
Proporción IGF-IIR/18S
I
Proporción IRS-4/18S
P < 0,05

FIG. 12

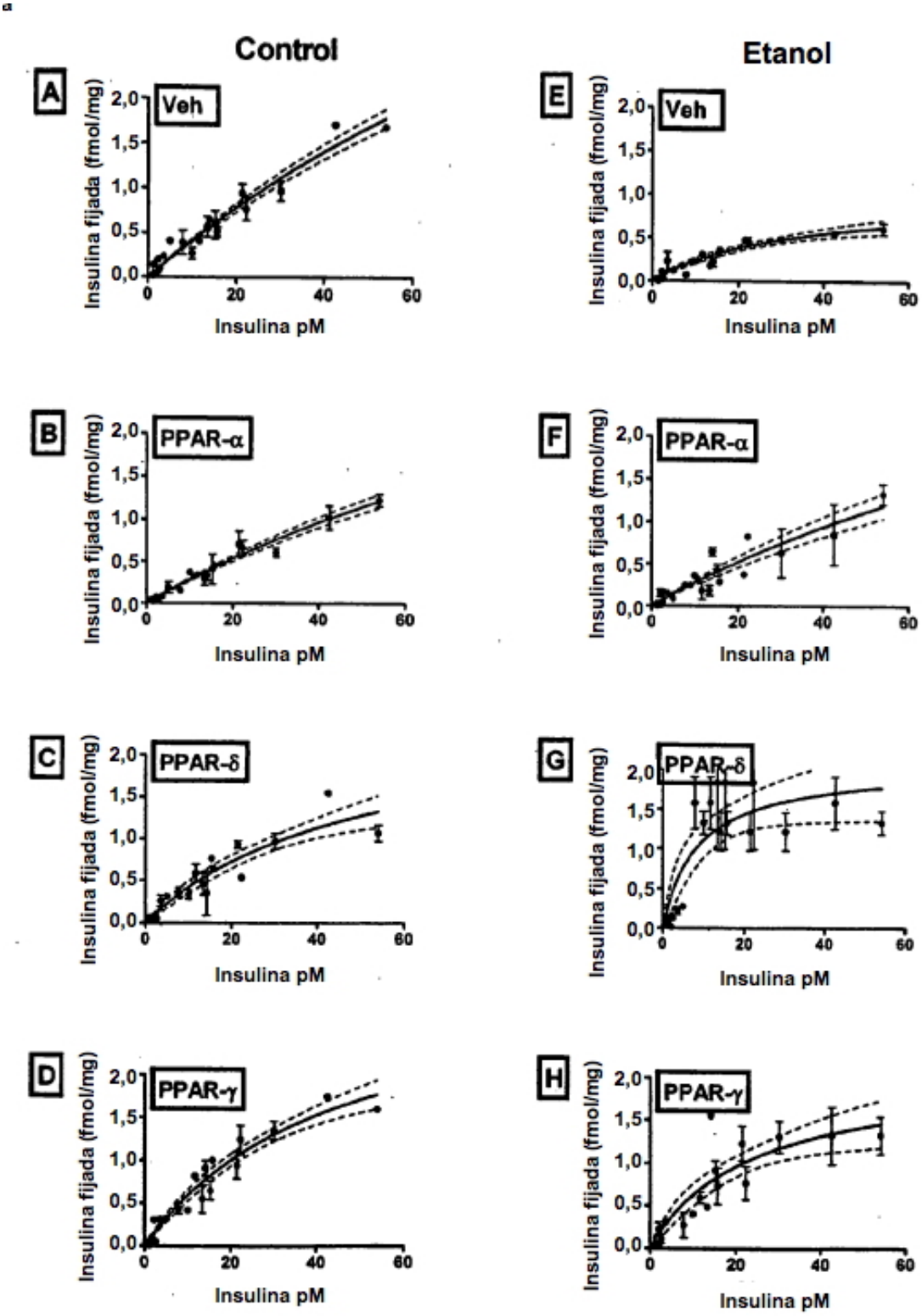

Control
Etanol
A
Veh
E
Veh
B
PPAR-α
F
PPAR-α
C
PPAR-δ
G
PPAR-δ
D
PPAR-γ
H
PPAR-γ
Insulina fijada (fmol/mg)
Insulina pM
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
0
20
40
60

FIG. 13

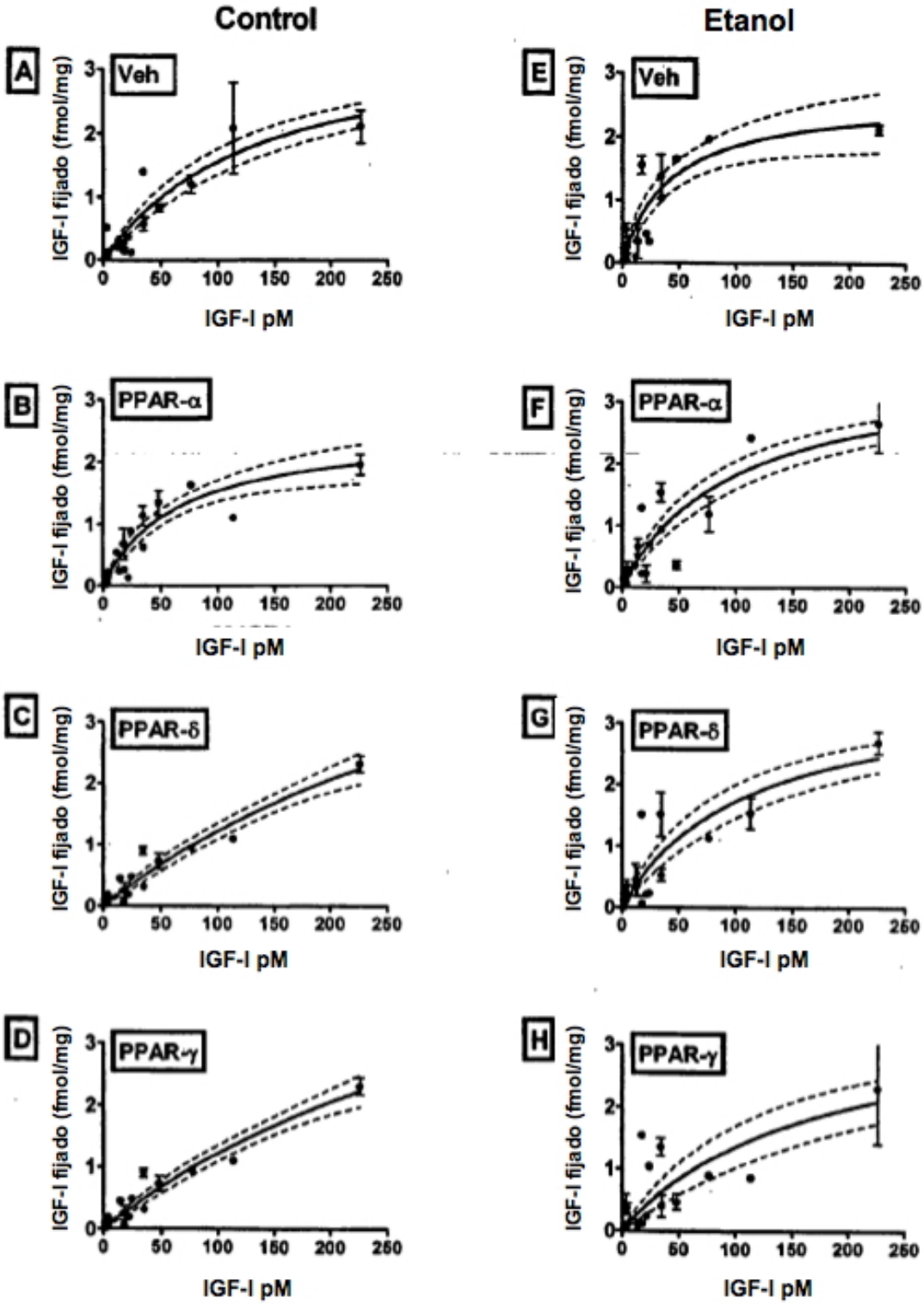

Control
Etanol
A
Veh
E
Veh
B
PPAR-α
F
PPAR-α
C
PPAR-δ
G
PPAR-δ
D
PPAR-γ
H
PPAR-γ
IGF-I fijado (fmol/mg)
IGF-I pM
0
1
2
3
0
50
100
150
200
250

FIG. 14

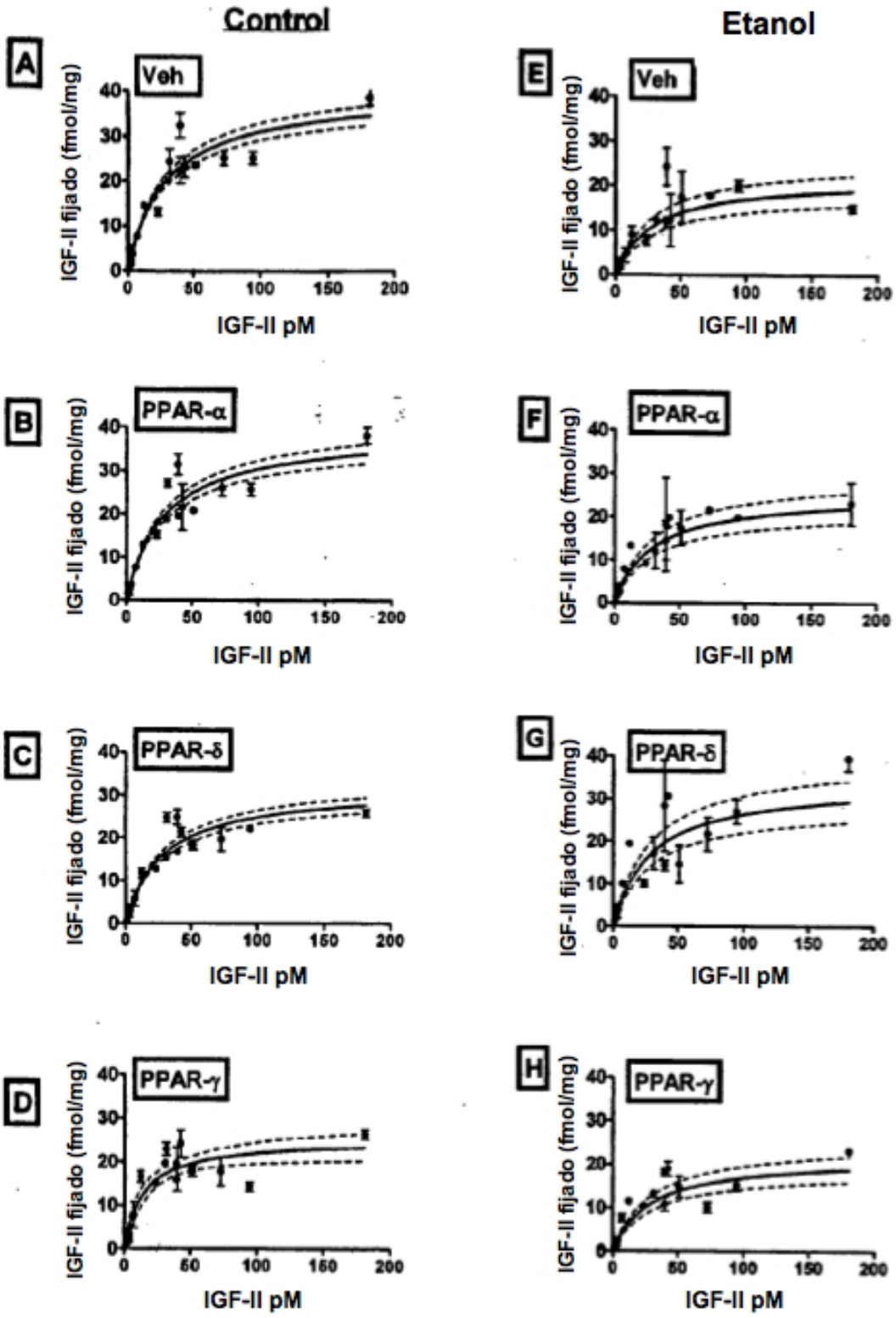

Control
Etanol
A
Veh
E
Veh
B
PPAR-α
F
PPAR-α
C
PPAR-δ
G
PPAR-δ
D
PPAR-γ
H
PPAR-γ
IGF-II fijado (fmol/mg)
IGF-II pM
0
10
20
30
40
50
100
150
200

FIG. 15

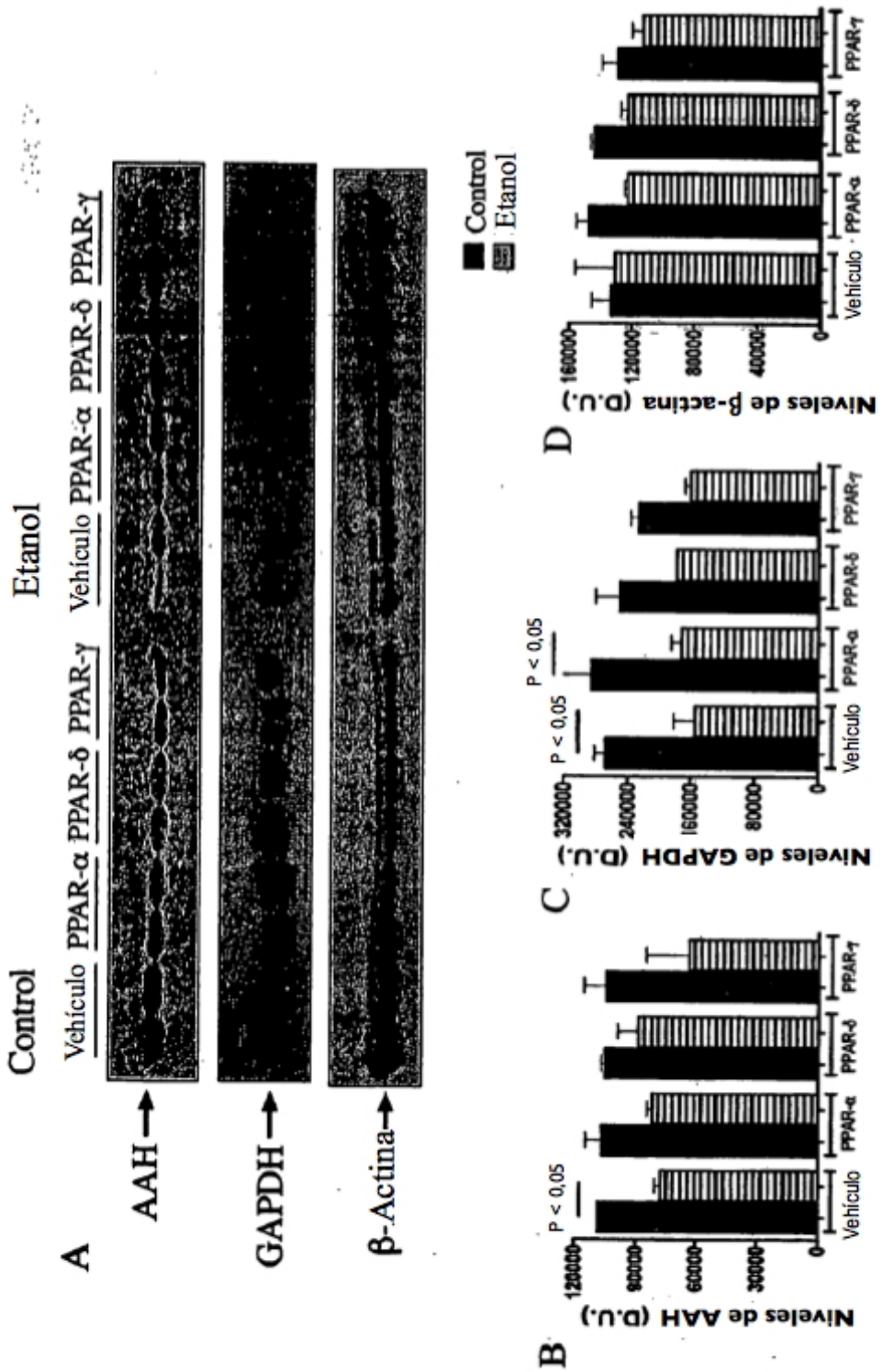

A
Control
Etanol
Vehículo PPAR-α PPAR-δ PPAR-γ Vehículo PPAR-α PPAR-δ PPAR-γ
AAH
GAPDH
β-Actina
B
Niveles de AAH (D.U.)
P < 0,05
C
Niveles de GAPDH (D.U.)
P < 0,05
P < 0,05
D
Niveles de β-actina (D.U.)
Control
Etanol
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ

FIG. 16

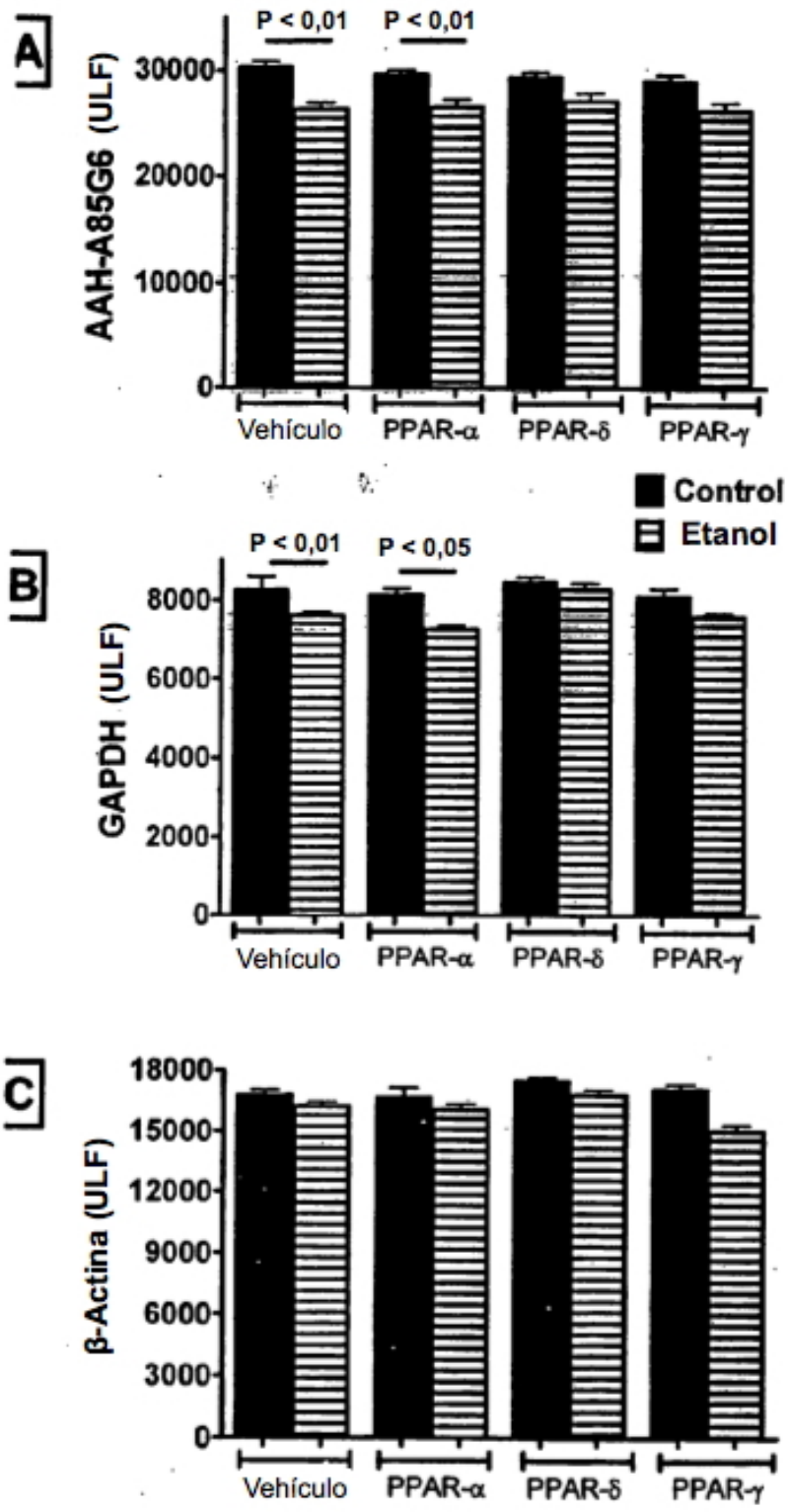

A
P < 0,01
P < 0,01
AAH-A85G6 (ULF)
30000
20000
10000
0
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
Control
Etanol
B
P < 0,01
P < 0,05
GAPDH (ULF)
8000
6000
4000
2000
0
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ
C
β-Actina (ULF)
18000
15000
12000
9000
6000
3000
0
Vehículo
PPAR-α
PPAR-δ
PPAR-γ

FIG. 17