

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 993**

51 Int. Cl.:

A61K 31/56

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2005** **E 05729394 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 1734970**

54 Título: **Tratamiento de fibrosis usando ligandos de FXR**

30 Prioridad:

12.03.2004 US 552865 P

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

16.04.2015

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
421 HUDSON STREET, SUITE 212
NEW YORK, NY 10014, US**

72 Inventor/es:

**FIORUCCI, STEFANO;
PELLICCIARI, ROBERTO y
PRUZANSKI, MARK**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 533 993 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de fibrosis usando ligandos de FXR

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. provisional N° 60/552.865, presentada el 12 de marzo de 2004.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la prevención, tratamiento y/o inversión de fibrosis. En particular, la presente invención se refiere al novedoso uso de un ligando específico para receptor X farnesiloide (FXR) en pacientes con hígado fibrótico, enfermedades intestinales o renales que tampoco padecen una afección colestásica, con el fin de inhibir el desarrollo y la progresión de fibrosis en aquellos tejidos en los que se expresa FXR.

Antecedentes de la invención

La fibrosis se caracteriza por una excesiva acumulación de colágeno en la matriz extracelular del tejido implicado. Es un problema clínico de toda la vida y exigente para el que actualmente no está disponible tratamiento eficaz. La producción de colágeno es un proceso fisiológico altamente regulado, cuya perturbación puede conducir al desarrollo de fibrosis de tejidos. La formación de tejido fibroso es parte del proceso beneficioso normal de la curación después de una lesión. En algunos casos, sin embargo, una acumulación anormal de material fibroso puede interferir gravemente con la función normal del tejido afectado o incluso produciendo la pérdida completa de función del órgano afectado.

La fibrosis hepática, por ejemplo, representa un problema médico importante con morbilidad y mortalidad significativas. En una variedad de enfermedades del hígado, la lesión crónica conduce a fibrosis progresiva que el hígado puede compensar durante nada menos que 20-30 años; con el tiempo, sin embargo, los pacientes empiezan a experimentar síntomas y signos de insuficiencia hepática debida a fibrosis y cirrosis grave. En el mundo, las infecciones por hepatitis viral crónica, particularmente por el virus de la hepatitis B y C, representan una causa importante de fibrosis hepática; sin embargo, dentro de los Estados Unidos, el consumo de alcohol crónico ha sido tradicionalmente la causa frecuente de fibrosis y cirrosis hepática. Actualmente, con el rápido aumento en la prevalencia de la obesidad en la población general, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA) está convirtiéndose en la afección más prevalente asociada a la fibrosis hepática y puede convertirse en una causa frecuente de fibrosis hepática asociada a morbilidad y mortalidad en los siguientes años. Otras causas conocidas de fibrosis hepática incluyen infección parasítica, enfermedades autoinmunitarias, trastornos del almacenamiento de hierro o cobre, y obstrucción biliar. La fibrosis hepática puede clasificarse como una respuesta de la curación del daño a una variedad de estímulos crónicos que se caracterizan por una excesiva deposición de proteínas de la matriz extracelular, de las que predomina el colágeno tipo I. Este exceso de deposición de proteínas de la matriz extracelular altera la arquitectura normal del hígado produciendo daños estructurales y funcionales al órgano. Si se deja sin tratar, la fibrosis hepática puede progresar a cirrosis hepática, conduciendo por último lugar a insuficiencia orgánica y muerte. Muchas otras enfermedades debilitantes y potencialmente mortales también conducen a fibrosis de órganos tales como el intestino, riñón, corazón y pulmón.

Debido a la función esencial de la producción de colágeno durante la fibrosis, muchos estudios se han basado en la regulación de la expresión de colágeno y proliferación de fibroblastos, el principal tipo de células responsable de la síntesis del colágeno. En el hígado, la célula estrellada hepática (CEH) es el tipo de célula fibrogénica primaria.

Se ha identificado una variedad de compuestos como agentes antifibróticos mediante diferentes mecanismos de acción, que incluyen la supresión de la expresión de colágeno. Por ejemplo, se ha informado que la pantetina (D-bis-(N-pantotenil-β-aminoetil)-disulfuro) es eficaz para la inhibición de fibrosis hepática (patente de EE.UU. N° 4.937.266); se ha mostrado que un derivado de hidracina, hidrazida benzoica, es un poderoso agente antifibrótico (patentes de EE.UU. N° 5.374.660 y 5.571.846); el uso de inhibidores de la angiotensina en combinación con estimulantes de óxido nítrico para inhibir la progresión de fibrosis se desvela en las patentes de EE.UU. N° 5.645.839 y 6.139.847; la patente de EE.UU. N° 6.005.009 describe procedimientos que usan ciertas piridoxalbenzoilhidrazonas o sus análogos para inhibir fibrosis; la patente de EE.UU. N° 6.117.445 describe el uso de antagonistas de receptores de adenosina A₁ y/o antagonistas de purinoceptores P_{2X} para tratar o prevenir fibrosis y esclerosis. Más recientemente, se ha informado de agonistas de somatostatina, factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), inhibidores de quimasa y antagonistas de IL-13 para inhibir eficazmente la fibrosis (patentes de EE.UU. N° 6.268.342, 6.303.126, 6.500.835 y 6.664.227).

El receptor X farnesiloide (FXR), también conocido como el receptor de ácido biliar (BAR) y NR1H4, es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores y formas de transcripción activados por ligando, con receptor de retinoide X (RXR), un receptor heterodímero esencial para la homeostasis del ácido biliar (Forman et al., Cell 81:687-693, 1995; Lu et al., J. Biol. Chem., 17:17, 2001). FXR se expresa en diversos tejidos que incluyen el hígado,

riñón, intestino, colon, ovario y glándula suprarrenal (Forman et al., Cell 81:687-693, 1995).

Conteniendo un dominio de unión de ADN conservado (DBD) y un dominio de unión de ligando del extremo C (LBD), FXR se une y activa mediante una variedad de ácidos biliares que se producen naturalmente, que incluyen el ácido biliar primario ácido quenodesoxicólico (CDCA) y sus conjugados de taurina y glicina (Makishima et al., Science 284:1362-1365, 1999; Parks et al., Science 284:1365-1368, 1999; Wang et al., Mol. Cell., 3:543-553, 1999). Tras la activación, el heterodímero de FXR-RXR se une a la región promotora de genes diana y regula la expresión de varios genes que participan en la homeostasis del ácido biliar. Por ejemplo, la activación de FXR en el hígado conduce, mediante la inducción directa del componente heterodímero corto del receptor nuclear (SHP), a la reducida expresión de CYP7A, un gen que codifica una enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la síntesis de ácidos biliares (Schwartz et al., Curr. Opin. Lipidol., 9:113-119, 1998); mientras que la activación de FXR en el intestino conduce a elevada expresión de una proteína de unión de ácido biliar (I-BABP), que participa en el transporte activo de ácidos biliares en el íleon (Kanda et al., Biochem. J., 330:261-265, 1998). Para una lista más detallada de genes regulados por FXR véase, por ejemplo, el documento WO 03/016288, páginas 22-23.

Debido a la importancia de FXR en la homeostasis de los ácidos biliares, se han propuesto ligandos activantes de FXR para su uso para tratar una variedad de enfermedades y afecciones hepáticas colestásicas en las que el flujo de bilis enterohepática normal es bloqueado o ha sido detenido de otro modo (véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/072598 y WO 03/090745).

Aunque no se pretende quedar ligado a teoría particular alguna, el presente inventor reveló que la activación de FXR puede regular por disminución la síntesis de colágeno y la fibrosis resultante mediante un mecanismo que implica SHP y otros genes diana de FXR. Así, los ligandos activantes de FXR son agentes antifibróticos eficaces en tejidos y órganos en los que FXR está presente, tales como hígado, riñón, intestino, etc. La presente divulgación proporciona la composición para un nuevo procedimiento para prevenir, tratar y/o invertir la fibrosis, basándose en el sorprendente descubrimiento de propiedades previamente desconocidas de ligandos activantes de FXR.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona el compuesto ácido 6-etil-quenodesoxicólico (6-ECDCA) para su uso en un procedimiento para inhibir la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica subyacente. Este procedimiento comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de 6-ECDCA, un ligando específico para el receptor X farnesiloide (FXR), con el fin de inhibir la fibrosis que podría producirse en un órgano en el que se expresa FXR.

En algunas realizaciones, la afección colestásica se define como que tiene niveles en suero anormalmente elevados de fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) y 5'-nucleotidasa. En una realización a modo de ejemplo, el nivel en suero anormalmente elevado es superior a aproximadamente 125 UI/l para fosfatasa alcalina, superior a aproximadamente 65 UI/l para GGT y superior a aproximadamente 17 UI/l para 5'-nucleotidasa. En otras realizaciones, la afección colestásica se define como que se presenta con al menos un síntoma clínico, además de tener niveles en suero anormalmente elevados de fosfatasa alcalina, GGT y 5'-nucleotidasa. En una realización a modo de ejemplo, el síntoma clínico es picor (prurito).

En algunas realizaciones, la fibrosis que va a inhibirse mediante el procedimiento de la presente invención es fibrosis hepática, fibrosis renal o fibrosis intestinal. En otras realizaciones, el sujeto no padece una afección colestásica tal como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria o colestasis intrahepática del embarazo. En todavía otras realizaciones, el sujeto no padece una afección colestásica asociada a una enfermedad o afección tal como cáncer de hígado y biliar primario, cáncer metastásico, septicemia, nutrición parenteral total crónica, fibrosis quística o enfermedad hepática granulomatosa.

El ligando de FXR es 6ECDCA.

En algunas realizaciones, la fibrosis que va a inhibirse es fibrosis hepática asociada a una enfermedad tal como hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante; enfermedad hepática alcohólica (EHA); enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA); esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); enfermedades del hígado inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmunitaria; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de α 1-antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; trastorno vascular asociado a síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva, o trombosis de la vena porta; o fibrosis hepática congénita.

En otras realizaciones, la fibrosis que va a inhibirse es fibrosis intestinal asociada a una enfermedad tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis después de radiación o colitis microscópica.

En algunas otras realizaciones, la fibrosis que va a inhibirse es fibrosis renal asociada a una enfermedad tal como

nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica o enfermedad renal poliquística.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para inhibir fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica. La fibrosis que va a inhibirse se produce en un órgano en el que se expresa el receptor X farnesiloide (FXR). Este kit comprende una cantidad eficaz de 6-ECDCA y un material de instrucciones que enseña las indicaciones, dosificación y programa de administración del ligando al paciente.

En algunas realizaciones, el kit se usa para inhibir la fibrosis hepática, fibrosis renal o fibrosis intestinal. En otras realizaciones, el kit comprende 6ECDCA.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la expresión de FXR en los cultivos primarios de CEH y CEH-T6, al nivel de ARNm por RT-PCR (panel a) y al nivel de proteína por análisis de transferencia Western (panel b). El panel b también demuestra que la cantidad de FXR en CEH aumenta con el tiempo durante el cultivo y su aumento es paralelo a la expresión de α -actina de músculo liso (α SMA), un marcador de la diferenciación de CEH en células similares a miofibroblastos.

La **Figura 2** muestra la expresión de NTCP, BSEP, CYP7A1 y SHP en CEH (panel a) y la expresión de estos genes regulados por ligandos de FXR (panel b). Los resultados de la RT-PCR cuantitativa en la Figura 2b ilustran que la exposición a 6-ECDCA (un ligando de FXR sintético) y a CDCA (un ligando de FXR natural) conduce a un aumento de 2 veces de ARNm de SHP y BSEP y una reducción del 50-70 % de ARNm de NTCP y CYP7A1.

La **Figura 3a** muestra los resultados de RT-PCR y RT-PCR cuantitativa, que indica que la exposición de CEH a ligandos de FXR 6-ECDCA (1 μ M), CDCA (20 μ M) o GW4064 (100 nM) reduce la expresión de colágeno tipo I como medida evaluando la expresión de ARNm de α 1 mediante procedimientos. La **Figura 3b** muestra resultados de análisis de transferencia Northern, que confirman los resultados del panel a.

La **Figura 4** muestra los resultados de ensayos de proliferación de CEH, que indica que 6-ECDCA no previene la proliferación de CEH inducida por trombina, PDGF o TGF β ¹, como se evalúa determinando la incorporación de [³H]-timidina (paneles a y b) o recuento de células (panel c). Además, los ligandos de FXR no conducen las CEH a la apoptosis (panel d).

La **Figura 5** muestra la inhibición mediada por ligandos de FXR de la liberación de colágeno α 1, como se mide determinando concentraciones de hidroxiprolina en sobrenadantes de células (paneles a y b).

La **Figura 6** muestra que la expresión en exceso de SHP en CEH-T6 anula la expresión de α 1 en CEH-T6 en reposo, como se mide por QRT-PCR y análisis de transferencia Northern, y previene la inducción de α 1 producida por trombina, TGF β 1 y PDGF.

La **Figura 7** muestra que la anulación de la expresión de SHP, por ARN interferente pequeño (ARNip) específico, invierte la inhibición de ARNm de α 1 producida por ligandos de FXR. El silenciamiento de SHP también previene la inhibición de la expresión de α 1 inducida por ligandos de FXR sobre CEH tratadas con factores mitogénicos tales como trombina, TGF β y PDGF. Los resultados de los análisis de transferencia Northern que confirman el efecto de SHP sobre el ARNm de α 1 también se muestran en la Figura 7.

La **Figura 8** muestra los niveles de deposición de colágeno, hidroxiprolina y ARNm de colágeno de α 1 en los hígados de ratas BDL tratadas o sin tratar con 6ECDCA.

Definiciones

“**Fibrosis**” se refiere a una afección que implica el desarrollo de excesivo tejido conjuntivo fibroso, por ejemplo, tejido cicatricial, en un tejido u órgano. Tal generación de tejido cicatricial puede producirse en respuesta a infección, inflamación o lesión del órgano debido a una enfermedad, traumatismo, toxicidad química, etc. La fibrosis puede desarrollarse en una variedad de tejidos y órganos diferentes, que incluyen el hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, etc.

El término “**inhibir**” o “**inhibición**”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier efecto positivo detectable sobre el desarrollo o progresión de una enfermedad o afección. Un efecto positivo tal puede incluir el retraso o prevención de la aparición de al menos un síntoma o signo de la enfermedad o afección, alivio o inversión del (de los) síntoma(s) o signo(s), y ralentizamiento o prevención del empeoramiento adicional del (de los) síntoma(s) o signo(s).

Como se usa en el presente documento, una “afección colestásica” se refiere a cualquier enfermedad o afección en la que la secreción de bilis del hígado está alterada o bloqueada, que puede producirse tanto en el hígado como en las vías biliares. La colestasis intrahepática y la colestasis extrahepática son los dos tipos de afecciones colestásicas. La colestasis intrahepática (que se produce dentro del hígado) es la más comúnmente observada en cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, septicemia (infección generalizada), hepatitis alcohólica aguda, toxicidad de fármaco, nutrición parenteral total (que se alimenta intravenosamente), tumor maligno, fibrosis quística y embarazo. La colestasis extrahepática (que se produce fuera del hígado) puede producirse por tumores de las vías biliares, constricciones, quistes, divertículos, formación de cálculos en el conducto colédoco, pancreatitis, tumor pancreático o pseudoquiste, y compresión debido a una masa o tumor en un órgano próximo.

Síntomas y signos clínicos de una afección colestásica incluyen: picor (prurito), fatiga, piel u ojos ictericos, incapacidad para digerir ciertos alimentos, náuseas, vómitos, heces pálidas, orina oscura y dolor abdominal del cuadrante superior derecho. Un paciente con una afección colestásica puede diagnosticarse y seguirse clínicamente basándose en un conjunto de pruebas de laboratorio clínico convencionales, que incluyen medición de niveles de fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), 5'-nucleotidasa, bilirrubina, ácidos biliares y colesterol en el suero de la sangre de un paciente. Generalmente, se diagnostica que un paciente tiene una afección colestásica si los niveles en suero de tres de los marcadores de diagnóstico fosfatasa alcalina, GGT y 5'-nucleotidasa se consideran anormalmente elevados. El nivel en suero normal de estos marcadores puede variar algún grado de laboratorio a laboratorio y de procedimiento a procedimiento, dependiendo del protocolo de prueba. Así, un médico podrá determinar, basándose en el laboratorio específico y procedimiento de prueba, qué es un nivel en sangre anormalmente elevado para cada uno de los marcadores. Por ejemplo, un paciente que padece una afección colestásica generalmente tiene más de aproximadamente 125 UI/l de fosfatasa alcalina, más de aproximadamente 65 UI/l de GGT y más de aproximadamente 17 UI/l de 5'-nucleotidasa en la sangre. Debido a la variabilidad en el nivel de marcadores del suero, una afección colestásica puede diagnosticarse basándose en niveles anormales de estos tres marcadores, además de al menos uno de los síntomas mencionados anteriormente, tal como picor (prurito).

Un “**ligando**” específico para FXR se refiere a un compuesto natural o sintético que se une a FXR y así puede estimular específicamente la actividad transcripcional de FXR dependiente de ligando diferenciada del nivel inicial determinada en ausencia de cualquier ligando. En la presente solicitud, el término “un ligando de FXR” es intercambiable con “un ligando activante de FXR”.

El término “**cantidad eficaz**”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de compuesto (por ejemplo, un ligando activante de FXR) que produce un efecto terapéutico agudo o crónico tras la administración de dosis apropiada. El efecto incluye la prevención, corrección, inhibición o inversión de los síntomas, signos y patología subyacente de una enfermedad/afección (por ejemplo, fibrosis del hígado, riñón o intestino) y complicaciones relacionadas a cualquier grado detectable. La cantidad y programa de dosificación exacto dependerá del fin del tratamiento, y podrá determinarse por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); y Pickar, Dosage Calculations (1999)).

El término “**órgano**” se refiere a una estructura diferenciada (como en un corazón, pulmón, riñón, hígado, etc.) que consiste en células y tejidos y que realizan alguna función específica en un organismo. Este término también engloba partes corporales que realizan una función o que cooperan en una actividad (por ejemplo, un ojo y estructuras relacionadas que constituyen los órganos visuales). El término “**órgano**” engloba adicionalmente cualquier estructura parcial de células y tejidos diferenciados que es potencialmente capaz de desarrollarse en una estructura completa (por ejemplo, un lóbulo o una sección de un hígado).

Descripción detallada de la invención

Por primera vez, se muestra que el ligando 6-ECDCA, específico para el receptor X farnesoide (FXR), es eficaz en el tratamiento o prevención de fibrosis en tejidos u órganos tales como hígado, riñón e intestino, en pacientes que no padecen una afección colestásica.

Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, el presente inventor descubrió que FXR desempeña una función importante en la regulación de la síntesis de colágeno, principalmente mediante las acciones de SHP que regula directamente FXR en un modo dependiente de ligando. Por tanto, este descubrimiento permite el uso de ligandos activantes de FXR para la prevención, tratamiento y/o inversión eficaz de fibrosis en tejidos en la que FXR se expresa, particularmente en pacientes que no padecen ninguna afección para la que se haya sugerido previamente el uso de ligandos de FXR, por ejemplo, en afecciones colestásicas en las que el efecto terapéutico antiolestático de un ligando de FXR puede también inhibir indirectamente la fibrosis.

I. Identificación de la población de pacientes

La presente invención se refiere al uso profiláctico y terapéutico de 6-ECDCA en pacientes que: (1) padecen fibrosis o ciertas enfermedades/afecciones que son conocidas por conducir a fibrosis en un tejido u órgano en el que se

expresa FXR; y (2) no padecen una afección colestásica que pueda producir secundariamente fibrosis hepática, en el que tales pacientes se tratan con un ligando de FXR para inhibir la fibrosis hepática en curso o prevenir el desarrollo de fibrosis hepática. La descripción a continuación permite determinar si un paciente se encuentra dentro de la población adecuada para el tratamiento de acuerdo con la presente invención.

A. Expresión de FXR en un órgano

Primero debe determinarse el estado de expresión de FXR en un órgano o un tejido antes de determinar si un ligando de FXR puede usarse para inhibir eficazmente la fibrosis en este órgano. La detección de la expresión de FXR puede llevarse a cabo a dos niveles diferentes: nivel de ácido nucleico y nivel de polipéptido.

1. Expresión de FXR al nivel de ácido nucleico

La secuencia de polinucleótidos que codifica FXR humano se ha identificado por Forman et al. (Cell 81:687-93, 1995) y disponible como N° de acceso de GenBank NM_005123. Basándose en esta información, la expresión del gen FXR puede detectarse al nivel de ácido nucleico en una muestra de paciente humano. Comúnmente se usa una variedad de procedimientos de medición específica de ADN y ARN usando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed.) 2001). Algunos procedimientos implican una separación electroforética (por ejemplo, transferencia Southern para detectar ADN y transferencia Northern para detectar ARN), pero la detección de ADN o ARN también puede llevarse a cabo sin electroforesis (tal como por transferencia puntual, o hibridación *in situ* si la detección se hace dentro de un tejido diana). La presencia de ácido nucleico que codifica FXR en las células de un órgano particular también puede detectarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o procedimientos basados en PCR, por ejemplo, PCR en tiempo real y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), usando cebadores específicos de secuencia.

2. Expresión de FXR al nivel de proteína

La expresión de FXR en un órgano puede confirmarse detectando proteína FXR en una muestra de tejido de este órgano. La secuencia de aminoácidos de FXR humano puede determinarse basándose en su secuencia codificante, por ejemplo, N° de acceso de GenBank NM_51023, y se expone en publicaciones tales como el documento WO 00/76523. Pueden usarse diversos ensayos inmunológicos (tales como el ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA), transferencia Western e inmunohistoquímica) por aquellos expertos en la materia para medir el nivel de producto del gen FXR, particularmente usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan específicamente con el polipéptido FXR (por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Capítulo 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, Nature, 256:495-497, 1975). Tales técnicas requieren preparación de anticuerpos seleccionando anticuerpos con alta especificidad contra el polipéptido FXR o una porción antigénica del mismo. Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales están muy establecidos y sus descripciones pueden encontrarse en la bibliografía, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, arriba; Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.

Producción de anticuerpos contra FXR

Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con un inmunógeno de interés son conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY, 1991; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Stites et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en su interior; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed.) Academic Press, New York, NY, 1986; y Kohler y Milstein Nature 256: 495-497, 1975). Tales técnicas incluyen preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fago o vectores similares (véase, Huse et al., Science 246: 1275-1281, 1989; y Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989).

Con el fin de producir antiseros que contengan anticuerpos con especificidad deseada, el polipéptido de interés (por ejemplo, FXR humano) o un fragmento antigénico del mismo, puede usarse para inmunizar animales adecuados, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cabras, caballos o monos. Un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, puede usarse según un protocolo de inmunización convencional. Alternativamente, un péptido antigénico sintético derivado de ese polipéptido particular puede conjugarse con una proteína transportadora y posteriormente usarse como inmunógeno.

La respuesta inmunitaria del animal a la preparación de inmunógenos se monitoriza tomando sangrados de prueba y determinando el título de reactividad con el antígeno de interés. Cuando convenga, se obtienen altos títulos de anticuerpo para el antígeno, se recoge sangre del animal y se preparan antiseros. El fraccionamiento adicional de los antiseros para enriquecer los anticuerpos específicamente reactivos para el antígeno y la purificación de los anticuerpos pueden realizarse posteriormente, véase, Harlow y Lane, arriba, y las descripciones generales de purificación de proteínas proporcionadas anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen usando diversas técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Normalmente, se immortalizan células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente por fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976). Procedimientos alternativos de immortalización incluyen, por ejemplo, transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Colonias que se producen a partir de células immortalizadas individuales se criban para la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producido por tales células puede potenciarse por diversas técnicas, que incluyen inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado.

Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales también pueden producirse recombinantemente tras la identificación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo con especificidad deseada (por ejemplo, que reconocen específicamente FXR humano) o un fragmento de unión de tal anticuerpo cribando una biblioteca de ADNc de linfocitos B humanos según el protocolo general brevemente explicado por Huse et al., arriba. Los principios y procedimientos generales de la producción de polipéptidos recombinantes tratados anteriormente son aplicables para la producción de anticuerpos mediante procedimientos recombinantes.

Inmunoensayos para detectar la expresión de FXR

Una vez están disponibles anticuerpos específicos para FXR, la presencia y cantidad de FXR en una muestra, por ejemplo, una pequeña sección de tejido, puede medirse mediante una variedad de procedimientos de inmunoensayo (tales como ELISA o transferencia Western) proporcionando resultados cualitativos y cuantitativos a un experto. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general véase, por ejemplo, Stites, arriba; las patentes de EE.UU. N° 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168.

(a) Marcado en inmunoensayos

Los inmunoensayos utilizan frecuentemente un agente de marcado para unirse específicamente a y marcar el complejo de unión formado por el anticuerpo y la proteína diana (por ejemplo, FXR humano). El agente de marcado puede ser por sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo de anticuerpo/proteína diana, o puede ser un tercer resto, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo de anticuerpo/proteína diana. Una marca puede ser detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, Texas red, rodamina y similares), radiomarcas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, y otras comúnmente usados en un ELISA) y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio coloreado o de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

En algunos casos, el agente de marcado es un segundo anticuerpo que lleva una marca detectable. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede carecer de una marca, pero puede, a su vez, unirse por un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de las especies de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, a la que una tercera molécula marcada puede unirse específicamente, tal como estreptavidina marcada con enzima.

También pueden usarse otras proteínas que pueden unirse específicamente a las regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G, como agente de marca. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de bacterias estreptocócicas. Presentan una fuerte reactividad no inmunogénica con regiones constantes de inmunoglobulina de una variedad de especies (véase, generalmente, Kronval, et al. J. Immunol., 111:1401-1406 (1973); y Akerstrom, et al., J. Immunol., 135:2589-2542 (1985)).

(b) Formatos de inmunoensayo

Los inmunoensayos para detectar una proteína diana de interés (por ejemplo, FXR) de muestras pueden ser tanto competitivos como no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de proteína diana capturada se mide directamente. En un ensayo "sándwich" preferido, por ejemplo, el anticuerpo específico para la proteína diana puede unirse directamente a un sustrato sólido en el que el anticuerpo se inmoviliza. Entonces captura la proteína diana en muestras de prueba. El complejo de anticuerpo/proteína diana así inmovilizado se une entonces por un agente de marcado, tal como un segundo o tercer anticuerpo que lleva una marca, como se ha descrito anteriormente.

En ensayos competitivos, la cantidad de proteína diana en una muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de una proteína diana añadida (exógena) desplazada (o eliminada por competición) de un anticuerpo específico para la proteína diana por la proteína diana presente en la muestra. En un ejemplo típico de un ensayo tal, el anticuerpo se inmoviliza y se marca la proteína diana exógena. Como la cantidad de la proteína diana exógena unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de la proteína diana presente en la muestra, el nivel de proteína diana en la muestra puede así determinarse basándose en la cantidad de proteína diana exógena unida al anticuerpo y así inmovilizada. Véase, por ejemplo, Karlson et al., Lab. Invest., 70:705-710 (1994).

En algunos casos, se usa análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia de FXR en las muestras. La técnica generalmente comprende separar proteínas de muestra por electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivatizado) e incubar las muestras con los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína diana. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o alternativamente pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos de oveja anti-ratón marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos contra FXR. Véanse, por ejemplo, Pineda et al., J. Neurotrauma, 18:625-634 (2001); Bowler et al., J. Biol. Chem., 277:16505-16511 (2002).

También son útiles diversos procedimientos de tinción inmunoquímica *in situ* usando anticuerpos contra FXR para demostrar la presencia de FXR en una muestra de tejido.

Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberan reactivos o marcadores encapsulados. Entonces, los productos químicos liberados se detectan según técnicas convencionales (véase, Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev., 5: 34-41 (1986)).

Además, también pueden realizarse ensayos funcionales para detectar la presencia de FXR en una muestra de tejido. Ensayos para detectar la actividad biológica de FXR se describen generalmente en una sección posterior.

B. Diagnóstico de fibrosis

La fibrosis es un proceso patofisiológico en respuesta a lesión de tejido debido a infección viral o bacteriana, inflamación, enfermedad autoinmunitaria, traumatismo, toxicidad a fármaco, etc. Durante este proceso, una cantidad en exceso de colágeno se expresa y se forma material fibroso en el espacio extracelular del tejido afectado. Así, la fibrosis puede reconocerse generalmente basándose en la distinta morfología del tejido fibroso en una biopsia del órgano en el que se sospecha la fibrosis. Otros medios para detectar la presencia de fibrosis o desarrollar fibrosis incluyen tomografía axial computerizada (TAC o TC), ultrasonidos, imagen por resonancia magnética (IRM) y monitorizar el nivel de uno o más marcadores del suero conocidos por ser indicativos de fibrosis (por ejemplo, diversos tipos de colágenos).

El modo preciso de diagnóstico de fibrosis también varía dependiendo del órgano en el que tiene lugar el proceso fibrótico. Por ejemplo, las biopsias son generalmente eficaces para diagnosticar fibrosis de la mayoría de los órganos, mientras que la endoscopia que implica un instrumento de fibra óptica (por ejemplo, un sigmoidoscopio o un colonoscopio) puede ser una alternativa menos traumática para detectar fibrosis de ciertos órganos tales como el intestino.

1. Biopsia para detectar fibrosis hepática

Se han establecido procedimientos convencionales para obtener biopsia de un órgano dado. Por ejemplo, puede obtenerse un espécimen de hígado durante la cirugía exploratoria, pero se obtiene más frecuentemente insertando una aguja de biopsia a través de la piel y en el hígado. Antes de realizar este procedimiento, llamado biopsia percutánea del hígado, la persona recibe un anestésico local. Pueden usarse ultrasonidos o TC para localizar el área anormal de la que va a tomarse el espécimen.

En la biopsia transvenosa del hígado, se inserta un catéter en una vena del cuello, se bobina en el corazón, y se coloca en una de las venas hepáticas que drenan el hígado. Entonces se inserta la aguja del catéter a través de la pared de la vena en el hígado. Este procedimiento es menos probable que dañe el hígado que la biopsia percutánea del hígado. Es especialmente útil en personas que sangran fácilmente, que es una complicación de la enfermedad hepática grave.

Tras obtener una biopsia del hígado, la muestra se examina y se le da una puntuación para indicar la presencia y nivel de fibrosis en la muestra. La mayoría de los sistemas de puntuación frecuentemente usados incluyen el sistema de puntuación METAVIR o HAI modificado (ISHAK). También puede usarse el sistema de puntuación Knodell para analizar la muestra de hígado. Los criterios usados en la puntuación de las muestras de hígado están bien establecidos y son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, el sistema METAVIR proporciona cinco clasificaciones: F0 indica la ausencia de fibrosis; F1 indica fibrosis portal y periportal sin septos; F2 indica fibrosis portal y algunos septos; F3 indica fibrosis septal sin cirrosis; y F5 indica la presencia de cirrosis. Véase, por ejemplo, Bedossa y Poynard, Hepatology 24:289-293, 1996.

La biopsia no solo es útil para el diagnóstico de fibrosis hepática, también puede ayudar a los médicos a evaluar la eficacia de los procedimientos de tratamiento/prevenición de fibrosis de la presente invención monitorizando la progresión de fibrosis usando metodologías conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Poynard et al., Lancet 349:825, 1997.

2. Marcadores del suero para fibrosis hepática

Hay numerosos marcadores del suero conocidos cuyo nivel puede ser indicativo de la presencia y/o gravedad de la fibrosis hepática. Los análisis de sangre que miden marcadores, por ejemplo, ácido hialurónico, laminina, pro-péptidos de undulina (colágeno tipo IV) de los tipos I, II y IV, colágenos, lisil oxidasa, prolil hidroxilasa, lisil hidroxilasa, PIIINP, PICP, colágeno VI, tenascina, colágeno XIV, laminina P1, TIMP-1, MMP-2, $\alpha 2$ macroglobulina, haptoglobina, gamma glutamil transpeptidasa, γ -globulina, bilirrubina total, apolipoproteína AI, etc., según los procedimientos establecidos pueden así ser útiles para tanto el diagnóstico de fibrosis como la monitorización de la progresión de fibrosis en el hígado.

3. Otros marcadores

Puede usarse marcadores adicionales, tales como marcadores de ácido nucleico, para detectar y/o monitorizar la fibrosis. Por ejemplo, se ha indicado recientemente en experimentos de laboratorio *Wnt-4* como un gen que desempeña una función importante en fibrosis renal, en la que su expresión de ARNm aumenta significativamente en el tejido fibrótico en el riñón (véase, por ejemplo, Surendran et al., 1 *Pediatr.* 140:119-24, 2002). La detección cuantitativa de la expresión génica de este tipo de marcadores puede ser útil en el diagnóstico y monitorización de fibrosis.

C. Identificar pacientes con elevado riesgo de desarrollar fibrosis

Debido a que el compuesto para su uso en el procedimiento de la presente invención también es eficaz para la prevención de la aparición de fibrosis o el ralentizamiento de su progresión después de la aparición, pacientes con elevado riesgo de fibrosis se encuentran dentro de la población de pacientes adecuada para el tratamiento usando el procedimiento de la presente invención. Tales pacientes se identifican basándose en el diagnóstico previo de ciertas enfermedades y afecciones que se sabe que conducen a fibrosis. Las siguientes secciones describen los medios para diagnosticar algunas de estas enfermedades y afecciones. Hay, sin embargo, enfermedades/afecciones adicionales que son conocidas por elevar el riesgo de un paciente de desarrollar fibrosis después en la vida y que pueden diagnosticarse fácilmente por un médico. El tratamiento de pacientes que padece cualquiera de estas enfermedades/afecciones con un ligando de FXR para prevenir, inhibir o invertir la fibrosis está dentro de la contemplación del presente inventor y dentro del alcance de la presente invención. Tal tratamiento puede garantizarse durante un corto transcurso de la vida, como se garantiza para un paciente dado con una enfermedad/afección dada y como se ha determinado por un experto en la materia para tratar tales pacientes.

1. Fibrosis hepática

Lo siguiente son algunos ejemplos de enfermedades conocidas por aumentar significativamente el riesgo de un paciente de desarrollar fibrosis hepática: (i) infecciones crónicas del hígado (incluyendo infección viral crónica por hepatitis B y hepatitis C; esquistosomiasis y otras enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante); (ii) enfermedad hepática alcohólica; (iii) enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA) o esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); (iv) enfermedades del hígado inducidas por fármacos y sustancias químicas (incluyendo metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida y amiodarona); (v) enfermedad autoinmunitaria (incluyendo hepatitis autoinmunitaria, sarcoidosis y hepatitis lupoides); (vi) enfermedades del almacenamiento resultantes de enzimopatías congénitas (incluyendo enfermedad de Wilson, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, enfermedades de almacenamiento de glucógeno tipos III, IV, VI, IX y X, deficiencia de $\alpha 1$ -antitripsina, síndrome de Zellweger, tirosinemia, fructosemia, y galactosemia); (vii) trastornos vasculares (que incluyen síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva y trombosis de la vena porta); y (viii) fibrosis hepática congénita.

Hepatitis B

La hepatitis B produce inflamación del hígado debido a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB, un virus de ADN que pertenece a la familia de Hepadnaviridae). Una infección aguda por el VHB normalmente conduce a recuperación, pero raramente también puede conducir a insuficiencia hepática aguda, y algunas veces a infección crónica. La infección crónica puede producir un estado de portador sano o progreso mediante fibrosis a cirrosis y sus complicaciones, que incluyen cáncer de hígado.

La hepatitis B aguda es una enfermedad de corta duración de aparición rápida inicial que resulta de infección por el VHB. Aproximadamente el 70 % de los adultos con hepatitis B aguda tienen pocos o ningún síntoma, mientras que el 30 % restante desarrollan síntomas significativos dos a cuatro meses tras la exposición al VHB. Los síntomas más comunes de la hepatitis B aguda son fatiga, pérdida del apetito, náuseas, vómitos, orina oscura, heces claras y dolor abdominal sobre la región del hígado. La ictericia frecuentemente acompaña a estos otros síntomas.

El diagnóstico de la hepatitis B crónica puede hacerse, por definición, solo después de seis meses desde la aparición de la hepatitis B aguda. La mayoría de los individuos con infección crónica por hepatitis B siguen asintomáticos durante muchos años, incluso hasta dos o tres décadas. Durante este tiempo, los análisis de sangre

del hígado del paciente normalmente son a lo sumo levemente anormales y la inflamación y cicatrización (es decir, fibrosis) del hígado progresa lentamente. Ocasionalmente, sin embargo, estos individuos con la hepatitis B crónica de otro modo inactiva pueden desarrollar exacerbaciones (reactivación) de síntomas agudos, elevados análisis de sangre del hígado e inflamación del hígado. Estas exacerbaciones se parecen a la hepatitis aguda y pueden producir progresión más rápida de la fibrosis hepática.

Además de los síntomas anteriormente descritos, el diagnóstico de la hepatitis B se confirma por análisis de sangre que detecta anticuerpos contra el VHB.

10 Hepatitis C

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC, un virus de ARN y un miembro de la familia de Flaviviridae) es uno de los problemas de salud más significativos que afectan al hígado. Más de 4 millones de estadounidenses (1,3 % de la población de los EE.UU.) y un cálculo estimado de 170 millones de individuos en el mundo (3 % en el mundo) están infectados por el VHC. Aproximadamente el 85 % de los individuos inicialmente infectados por este virus se infectarán crónicamente, normalmente durante décadas. El otro 15 % de los individuos infectados por el VHC simplemente tienen una infección aguda.

Al principio de una infección por el VHC, solo aproximadamente el 25 % de los pacientes presentan los síntomas característicos de hepatitis aguda. Estos síntomas incluyen fatiga, dolores musculares, poco apetito y febrícula. Raramente, también se produce amarilleamiento de la piel y/u ojos (ictericia).

A medida que la hepatitis se vuelve crónica, la mayoría de los individuos siguen siendo asintomáticos y solo pueden diagnosticarse mediante análisis de sangre rutinario cuando se detectan anticuerpos para el VHC. En enfermedad bien compensada, los individuos infectados pueden no presentar síntomas a pesar de la progresiva inflamación del hígado, necrosis y fibrosis que es una característica ubicua del procedimiento infeccioso crónico. Otros pacientes pueden experimentar fatiga crónica o intermitente y un sentido reducido del bienestar como resultado del avance de la enfermedad. Por otra parte, se ha descrito fatiga en algunos individuos con enfermedad relativamente leve.

Actualmente están disponibles varias pruebas de diagnóstico para la infección por el VHC. Se han hecho pruebas de cribado para determinar la presencia de anticuerpos para el VHC en la sangre. El ensayo inmunosorbente de enzimas (EIA) es la prueba de cribado inicial convencional para diagnosticar infección por el VHC midiendo anticuerpos específicos para antígenos del VHC. Esta prueba, por tanto, se denomina la prueba de anticuerpos anti-VHC. Puede diagnosticarse que los pacientes que tienen elevadas enzimas hepáticas (ALT/AST) y/o cualquiera de los factores de riesgo para el VHC tienen VHC con más del 95 % de certeza cuando el EIA es positivo.

Si un individuo con bajo riesgo de infección por el VHC dio positivo por EIA, se realiza prueba confirmatoria usando un ensayo especializado que asimismo prueba anticuerpos contra las proteínas del VHC. Este ensayo se llama el ensayo de inmunotransferencia recombinante (RIBA).

Como el VHC es un virus de ARN, varios ensayos de diagnóstico se basan en la detección del ARN del VHC en la sangre de una persona. Estas pruebas se denominan pruebas moleculares debido a que examinan el virus al nivel molecular. Los dos sistemas más comunes para medir el ARN del VHC son el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y el ensayo de ADN de cadena ramificada (ADNr). Recientemente, está disponible un tercer tipo de ensayo, llamado amplificación mediada por transcripción (TMA).

Enfermedad hepática alcohólica

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) es una enfermedad hepática crónica producida por el consumo excesivo de alcohol. Los síntomas de la EHA son normalmente no específicos, y no indican necesariamente la gravedad del daño hepático subyacente. Los síntomas de EHA generales incluyen fatiga, náuseas y vómitos, diarrea o dolores abdominales. Muchos pacientes, incluso con EHA avanzada marcada por fibrosis hepática progresiva y toxicidad, pueden no tener síntomas y su afección solo se diagnostica por análisis de sangre del hígado. Solo en las etapas más avanzadas de EHA descompensada (hepatitis o cirrosis alcohólica grave) el enfermo presentará síntomas relacionados con el hígado más específicos tales como ictericia, ascitis, hematemesis o encefalopatía.

El diagnóstico de EHA se establece basándose en una historia de alcoholismo, análisis de sangre que muestra la presencia y gravedad de daño del hígado. La ecografía del hígado puede ayudar a evaluar la gravedad de la enfermedad y excluir otras afecciones con síntomas similares. La biopsia del hígado es el medio más fidedigno para determinar la presente y etapa de EHA.

Enfermedad del hígado graso no alcohólico

Enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA) se refiere a un amplio espectro de enfermedades del hígado que oscilan de esteatosis simple (esteatosis), a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), a cirrosis. Todas las etapas de HGNA tienen en común la acumulación de grasa en los hepatocitos. En EHNA, la acumulación de grasa está

asociada con grados variables de inflamación (hepatitis) y cicatrización (fibrosis) del hígado. HGNA y EHNA se producen en individuos que no consumen excesivas cantidades de alcohol. Todavía, en muchos aspectos, el cuadro histológico de una biopsia de HGNA es similar al que puede observarse en la enfermedad hepática producida por el alcoholismo. HGNA y EHNA se consideran las enfermedades del hígado graso primarias. Las enfermedades del hígado graso secundarias incluyen aquellas que se producen en otros tipos de enfermedad del hígado. Así, la enfermedad hepática alcohólica (EHA) es la enfermedad del hígado graso secundaria más frecuente. La del hígado graso secundaria también puede producirse en hepatitis C viral crónica (VHC), hepatitis B viral crónica (VHB), hepatitis autoinmunitaria crónica (HAC) y enfermedad de Wilson.

Los síntomas de HGNA y EHNA son idénticos. Normalmente no son espectaculares y tienden a ser no específicos (como también puede observarse en otras enfermedades). Los síntomas son mínimos en la mayoría de los pacientes, que pueden, sin embargo, experimentar dolor abdominal del cuadrante superior derecho vago ocasional. Este dolor es característicamente sordo y persistente, sin un patrón de manifestación predecible. No es un dolor intenso, repentino y agudo, como podría producirse con, por ejemplo, cálculos biliares. Se cree que el dolor abdominal en HGNA y EHNA es debido al estiramiento de la cubierta del hígado (cápsula) cuando el hígado se agranda y/o cuando hay inflamación en el hígado. A diferencia de EHA, hepatitis B, o hepatitis C, los síntomas de la insuficiencia hepática aguda grave (por ejemplo, ictericia, fatiga intensa, pérdida del apetito, náuseas, vómitos y confusión) no se observan en HGNA o EHNA. La obesidad y afecciones relacionadas (por ejemplo, diabetes, hipertensión) se observan frecuentemente entre aquellos que padecen HGNA o EHNA, y los signos clásicos de resistencia a la insulina frecuentemente dominan la exploración física HGNA y EHNA. La acantosis pigmentaria, una pigmentación oscura de la piel de las axilas y el cuello, puede ser un signo de resistencia a la insulina y se observa frecuentemente en niños con EHNA. Si se palpa el hígado, normalmente se siente normal. Sin embargo, si se acumulan grandes cantidades de grasa en el hígado, puede alargarse bastante con un borde redondeado suave que puede ser fácilmente palpado por el doctor.

Además de los síntomas descritos anteriormente, se hace un diagnóstico de HGNA o EHNA basándose en los siguientes criterios: signos clínicos y/o bioquímicos de resistencia a insulina; ALT crónicamente elevada; signos de hígado graso con ultrasonidos; exclusión de otras causas de elevada ALT e hígado graso. Solo una biopsia de hígado, sin embargo, puede establecer un diagnóstico definitivo y determinar la gravedad de HGNA o EHNA.

Enfermedades parasíticas del hígado

Se conocen diversas enfermedades parasíticas que dañan el hígado y conducen a fibrosis o incluso cirrosis. La clonorchiasis, por ejemplo, es una infección por el trematodo del hígado *Clonorchis sinensis*. Pacientes inicialmente infectados con este parásito no tienen normalmente síntomas hasta que la carga de gusanos alcanza más de 500. Síntomas comunes son escalofríos, diarrea, fiebre, dolor abdominal inferior, ictericia e hinchazón del hígado. Para diagnosticar la enfermedad, deben tomarse antecedentes médicos que incluyen cuestiones sobre la dieta, viajes, regiones en las que se ha residido previamente. Una exploración física debe incluir una leve palpación del hígado. Pruebas adicionales incluyen endoscopia y examen de muestra de heces para huevos.

O. tenuicollis (*O. felineus*) y *O. viverrini* son otros dos parásitos que están estrechamente relacionados con *Clonorchis sinensis* y pueden conducir a daño hepático permanente. Los procedimientos de diagnóstico son similares a los descritos anteriormente. La estrecha comparación de la morfología de los huevos y gusanos adultos es necesaria para distinguir las infecciones por estos parásitos.

La esquistosomiasis es otra enfermedad parasítica del hígado, tubo gastrointestinal y vejiga producida por esquistosomas, gusanos trematodos que parasitan las personas que se ponen en contacto con agua contaminada.

Hay tres especies principales de estos gusanos trematodos (trematodos) -- *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, y *S. mansoni* -- que producen enfermedad en seres humanos. En el plazo de días después de la infección, un paciente puede desarrollar una urticaria o piel pruriginosa. Fiebre, escalofríos, tos y dolores musculares pueden empezar en el plazo de 1-2 meses desde la infección, aún cuando la mayoría de las personas no tienen síntomas en la fase temprana de la infección. Los huevos de los parásitos viajan al hígado o pasan al intestino o vejiga. Raramente, los huevos se encuentran en el cerebro o médula espinal y pueden producir convulsiones, parálisis o inflamación de la médula espinal. Para personas que están repetidamente infectadas durante muchos años, el parásito puede dañar el hígado, intestinos, pulmones y vejiga.

El diagnóstico de la esquistosomiasis implica el examen de las heces de un paciente o muestras de orina para los huevos y/o el parásito adulto. Se ha desarrollado un análisis de sangre para detectar anticuerpos contra este parásito. Antecedentes médicos que reflejan la posible exposición a agua contaminada también son útiles para hacer un diagnóstico apropiado.

Hepatitis autoinmunitaria

La hepatitis autoinmunitaria, también conocida como hepatitis lupoide, implica la inflamación del hígado producida por células inmunitarias que confunden las células normales del hígado con un tejido o patógeno extraño. Una

persona con hepatitis autoinmunitaria tiene autoanticuerpos que circulan en la circulación sanguínea que hacen que el sistema inmunitario ataque al hígado. Esta enfermedad está asociada con otras enfermedades autoinmunitarias, que incluye: tiroiditis, diabetes tipo 1, colitis ulcerosa, anemia hemolítica y glomerulonefritis proliferativa.

- 5 Los síntomas de la hepatitis autoinmunitaria pueden incluir orina oscura, pérdida del apetito, fatiga, malestar general, ansiedad o encontrarse mal (decaimiento), distensión abdominal, picor generalizado, heces pálidas o de color arcilla, náuseas y vómitos.

- 10 El diagnóstico puede hacerse basándose en varios criterios tales como biopsia del hígado que muestra hepatitis y fibrosis crónica, pruebas anormales de la función hepática, además de pruebas asociadas a hepatitis autoinmunitaria, por ejemplo, anticuerpos anti-nucleares positivos, anticuerpo anti-músculo liso positivo, anticuerpo microsómico renal anti-hígado positivo, anticuerpo anti-mitocondrial positivo, elevada velocidad de sedimentación, elevadas IgG en suero.

15 Sarcoidosis

- Otra enfermedad autoinmunitaria que afecta el hígado es la sarcoidosis. La sarcoidosis es una enfermedad que produce pequeños nódulos, o granulomas, debido a inflamación crónica que se desarrolla en un gran intervalo de tejidos del cuerpo. La sarcoidosis puede aparecer en casi cualquier órgano del cuerpo, pero casi siempre empieza en los pulmones o ganglios linfáticos. También afecta los ojos, hígado y piel; y menos frecuentemente el bazo, huesos, articulaciones, músculos esqueléticos, corazón y sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro y médula espinal). En la mayoría de los casos, los granulomas desaparecen con o sin tratamiento. En casos en los que los granulomas no se curan y desaparecen, los tejidos tienden a seguir inflamados y se vuelven fibróticos.

25 Enfermedades del hígado neonatales

- Las enfermedades del hígado neonatales se refieren a trastornos hepáticos graves que se producen en recién nacidos en el periodo neonatal (es decir, los 60 primeros días de vida). Las posibles causas de estos trastornos pueden incluir infección viral, enfermedades metabólicas hereditarias, neoplasia y problemas vasculares. Los lactantes afectados frecuentemente tienen ictericia, no cogen peso y crecen normalmente, y tienen hígado y bazo agrandados. Los lactantes no pueden absorber vitaminas para el crecimiento apropiado.

- Además de los síntomas anteriores, el diagnóstico de las enfermedades neonatales del hígado está ayudado por biopsia del hígado, especialmente en los casos en los que la afección no se produce por infección viral.

35 Enfermedad de Wilson

- La enfermedad de Wilson es un trastorno recesivo autosómico heredado en el que se acumula demasiado cobre en el cuerpo. Aunque la acumulación de cobre empieza al nacer, los síntomas del trastorno aparecen después en la vida, entre las edades de 6 y 40. Una característica del diagnóstico de la enfermedad de Wilson es lo que se llama un anillo de Kayser-Fleischer, un anillo de color cobre intenso alrededor del borde de la córnea. Representa depósitos de cobre en el ojo.

- La consecuencia clínica más significativa para aproximadamente el 40 por ciento de los pacientes con enfermedad de Wilson es la enfermedad del hígado. En otros pacientes, los primeros síntomas son neurológicos o psiquiátricos o ambos, e incluyen temblor, rigidez, sialorrea, dificultad al hablar, cambio repentino de la personalidad, comportamiento groseramente inapropiado y deterioro inexplicable del rendimiento en la escuela o trabajo, neurosis o psicosis.

- 50 La enfermedad de Wilson también puede diagnosticarse por pruebas genéticas para identificar ambas copias del gen mutado, que se ha localizado en el cromosoma 13 entre 13q14.3-q21.1.

Hemocromatosis

- 55 La hemocromatosis es un trastorno heredado de excesiva acumulación de hierro en el cuerpo. Es común entre la población blanca, afectando a aproximadamente 1 de cada 400 individuos de ascendencia europea. Se cree que los pacientes con hemocromatosis absorben de su dieta excesivas cantidades de hierro, que se acumulan con el tiempo en el hígado, médula ósea, páncreas, piel y testículos.

- 60 Los pacientes con hemocromatosis temprana no tienen síntomas, y la enfermedad puede descubrirse cuando se observan niveles elevados de hierro en sangre por análisis de sangre rutinario. En los hombres, los síntomas pueden no aparecer hasta los 40-50 años de edad. Los depósitos de hierro en la piel producen el oscurecimiento de la piel. Como las mujeres pierden hierro mediante la pérdida de sangre menstrual, desarrollan daño del órgano de la acumulación de hierro 15- 20 años después que los hombres en promedio.

- 65 Los depósitos de hierro en la glándula pituitaria y los testículos producen el encogimiento de los testículos e

impotencia. Los depósitos de hierro en el páncreas producen una disminución en la producción de insulina produciendo diabetes mellitus. Los depósitos de hierro en el músculo del corazón pueden producir insuficiencia cardíaca, además de ritmos anormales del corazón. La acumulación de hierro en el hígado produce cicatrización del hígado (fibrosis y cirrosis) y un elevado riesgo de desarrollar cáncer de hígado.

El cribado inicial para la hemocromatosis implica pruebas de niveles de hierro y ferritina en sangre, siendo la última una proteína de la sangre que sirve de indicador de la cantidad de hierro guardada en el cuerpo. Los niveles de hierro y ferritina en sangre son altos en pacientes con. Como la ferritina también puede elevarse en ciertas infecciones, tales como hepatitis viral y otras inflamaciones en el cuerpo, el aumento de ferritina solo no es suficiente para diagnosticar con exactitud la hemocromatosis.

La prueba más precisa para la hemocromatosis es medir el contenido de hierro de tejido del hígado obtenido por una biopsia. Una biopsia implica la eliminación de una muestra de tejido del hígado para el análisis y se realiza normalmente con una aguja bajo anestesia local. Después de adormecer la piel y los tejidos subyacentes, el doctor inserta una aguja en el hígado a través de la jaula torácica inferior derecha, algunas veces bajo orientación ultrasónica. El tejido obtenido por la aguja se estudia bajo un microscopio para daño del hígado o cirrosis. La cantidad de hierro en el hígado es normalmente significativamente elevada en hemocromatosis.

Finalmente, la prueba genética puede confirmar eficazmente un diagnóstico de hemocromatosis. El gen para la hemocromatosis hereditaria, HFE, se identificó en 1996 y puede identificarse en el análisis de sangre del 90 por ciento de los pacientes con ascendencia de Europa del norte.

Enfermedades de almacenamiento de glucógeno

Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno (EAG), también conocidas como glucogenosis, son trastornos metabólicos genéticamente ligados en los que participan las enzimas que regulan el metabolismo del glucógeno y se caracterizan por deposición de un tipo anormal de cantidad de glucógeno en los tejidos. Las EAG frecuentemente manifiestan los síntomas tempranos en la infancia o niñez en un paciente. En algunos casos, sin embargo, las condiciones pueden seguir sin detectarse hasta la adultez o incluso la vejez. Variable por tipo, hay cuatro síntomas principales que normalmente conducen al doctor a sospechar de EAG; bajo azúcar en sangre, hígado agrandado, crecimiento retardado y un perfil bioquímico de la sangre anormal. Se obtiene un diagnóstico definitivo por biopsia del órgano u órganos afectados, si la muestra de biopsia se prueba para su contenido de glucógeno y se ensaya para actividad enzimática. Hay técnicas basadas en ADN para diagnosticar algunas EAG a partir de muestras más fácilmente disponibles, tales como sangre o piel. Estas técnicas de ADN también pueden usarse para pruebas prenatales.

En ciertos tipos de EAG, la alteración del metabolismo del glucógeno frecuentemente conduce a la acumulación de subproductos metabólicos anormales, que pueden dañar órganos tales como el hígado y los riñones. Entre todas las EAG, los tipos III, IV, VI, IX y X son los más relevantes para la aparición de fibrosis hepática.

La **enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III** (enfermedad de Cori) se caracteriza por la ausencia de la enzima desramificadora, amilo-1,6-glucosidasa, que produce la acumulación de un polisacárido del tipo dextrina límite. La estructura de glucógeno guardada en el hígado y el músculo es anormal y la cantidad es notablemente elevada. Lo más perceptible es la corta rama externa del glucógeno, así solo una pequeña porción de este glucógeno anormal es funcionalmente activo como fuente de glucosa accesible. Los síntomas de este trastorno incluyen agrandamiento del hígado, hipoglucemia, cetosis, hiperuricemia, hiperlipemia, etc. En jóvenes afectados por esta enfermedad, el crecimiento está alterado, la pubertad está frecuentemente retrasada, y los huesos pueden estar debilitados por osteoporosis. Las plaquetas de la sangre también están afectadas y son comunes hemorragias nasales frecuentes y moratones fáciles. Los síntomas primarios mejoran con la edad, pero después de la edad de 20-30, pueden aparecer tumores hepáticos, enfermedad renal crónica y gota. El diagnóstico de esta afección se basa en los síntomas anteriores y se confirma examinando la estructura del glucógeno.

La **enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo IV** (enfermedad de Andersen) se caracteriza por la ausencia de enzima ramificadora (α -1,4 a α -1,6), con el resultado de que el glucógeno construido en EAG de tipo IV tiene ramas externas muy largas y es insoluble. Como el glucógeno anormal se acumula en las células, la muerte celular conduce al daño del órgano. Lactantes nacidos con EAG IV parecen normales al nacer, pero son diagnosticados con hígados agrandados y retraso del crecimiento dentro de su primer año. Los lactantes que sobreviven más allá de su primer cumpleaños desarrollan cirrosis del hígado a la edad 3-5 y mueren como resultado de insuficiencia hepática crónica. El diagnóstico de esta enfermedad está ayudado por la detección de la estructura de glucógeno anormal característica.

La **enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo VI** (enfermedad de Hers) se produce por deficiencia de fosforilasa del hígado, que bloquea la primera etapa de la glucogenólisis. A diferencia de la mayoría de las otras EAG, que implican mutaciones autosómicas, la EAG tipo VI está ligada al cromosoma X. En esta enfermedad, la deficiencia de fosforilasa produce elevada cantidad de glucógeno en el hígado. Los síntomas incluyen agrandamiento del hígado, hipoglucemia, cetosis, hiperuricemia, hiperlipemia, etc. La baja azúcar en sangre es uno

de los síntomas clave. Puede producirse crecimiento levemente retardado en jóvenes afectados.

La **enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo IX** se produce por deficiencia de fosforilasa cinasa (PhK) de glucógeno del hígado y, con respecto a los síntomas, es muy similar a la EAG tipo VI. Las principales diferencias son que los síntomas pueden no ser tan graves y también pueden incluir problemas relacionados con el ejercicio en los músculos, tales como dolor y calambres. Los síntomas disminuyen después de la pubertad con tratamiento apropiado. La mayoría de los casos de EAG IX están ligados al cromosoma X y, por tanto, afectan a los hombres. Las pruebas enzimáticas y la medición del contenido de glucógeno proporcionan un diagnóstico definitivo.

Una enzima que activa la glucógeno fosforilasa para estimular la rotura de glucógeno en diversos tejidos, PhK, es una enzima tetrámera constituida de cuatro subunidades diferentes ($\alpha\beta\gamma\delta$) que son responsables de diversos subtipos de EAG IX, que se diferencian tanto en el tejido afectado (hígado/músculo/RBC/tejido cardíaco) como en el modo de herencia. Se han clonado genes para las subunidades α , β y γ y mapeado con el cromosoma X (α), cromosoma 16q12 (β) y cromosoma 7p12 (γ).

La forma más común de deficiencia de PhK es la forma ligada a X, y afecta principalmente al hígado. Clínicamente, pacientes con esta forma de deficiencia de PhK presentan en la infancia hepatomegalia, hipoglucemia leve, retraso del crecimiento, hiperlipidemia, hipercetosis y desarrollo motor retrasado. Los síntomas mejoran con la edad, y los pacientes adultos tienen estatura normal e hígado normal.

La forma recesiva autosómica de la deficiencia de PhK afecta tanto al hígado como al músculo dependiendo de si la mutación se ha producido en la subunidad α o P de la enzima. Los síntomas podrían oscilar de miopatía leve con calambre muscular a forma miopática grave.

La **enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo X** es una enfermedad recesiva autosómica producida por una deficiencia de una fosfoglicerato mutasa dependiente de adenosina monofosfato cíclica (AMP) y presenta síntomas similares a EAG VI y IX. El gen que participa en esta afección se ha mapeado al cromosoma 7p12-p13.

Deficiencia de α 1-antitripsina

La deficiencia de α 1-antitripsina es una enfermedad hereditaria en la que un nivel inferior al normal de α 1-antitripsina está presente en los pulmones. La α 1-antitripsina es una proteína que se produce en el hígado y a continuación se libera en la circulación sanguínea. En pulmones normales, la α 1-antitripsina protege los pulmones de los efectos perjudiciales de la elastasa de neutrófilos. En un paciente que padece deficiencia de α 1-antitripsina, el daño a los tejidos pulmonares por elastasa de neutrófilos puede conducir a enfisema y dificultad respiratoria. El síntoma más perceptible de este trastorno es la falta de aliento durante las actividades diarias. Las enfermedades del hígado asociadas a esta enfermedad incluyen aquellas con aparición temprana, tales como hepatitis o ictericia neonatal, o aquellas con aparición tardía, tales como cirrosis y cáncer primario del hígado (hepatoma).

La deficiencia de α 1-antitripsina puede diagnosticarse basándose en síntomas tales como falta de aliento y tos crónica. El análisis de sangre para el nivel de α 1-antitripsina y la prueba de la función pulmonar también pueden ayudar en el diagnóstico. Como esta enfermedad se produce por una mutación recesiva autosómica, el diagnóstico más definitivo se basa en resultados de pruebas genéticas.

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher se produce por un defecto genético en una enzima glucocerebrosidasa. Esta enzima ayuda al cuerpo a degradar el glucocerebrósido químico. La enzima defectuosa en pacientes con enfermedad de Gaucher conduce a la acumulación de glucocerebrósido en el bazo, hígado y ganglios linfáticos. La enfermedad de Gaucher es más común en judíos ashkenazíes (aquellos de origen europeo), sin embargo, se han descrito variantes en todos los grupos étnicos. Dependiendo del tipo preciso de la enfermedad, los pacientes afectados pueden tener grados variables de síntomas. El signo temprano más frecuente de la enfermedad de Gaucher es el agrandamiento del bazo. Puede asociarse a fatiga, anemia y un número bajo de plaquetas. La participación ósea grave puede conducir a dolor y colapso (necrosis aséptica) del hueso de las caderas, hombros y columna vertebral. Puede producirse mala función pulmonar y cerebral, e incluso convulsiones.

El diagnóstico de la enfermedad de Gaucher se confirma por una prueba especial en la que se mide la actividad de β -glucocerebrosidasa de la actividad de fibroblastos. Los pacientes con enfermedad de Gaucher tienen menos del 15 % del nivel normal de glucocerebrosidasa. Debido a la naturaleza genética de la enfermedad, también es posible el diagnóstico basado en la prueba genética.

Síndrome de Zellweger

El síndrome de Zellweger es un trastorno genético, también llamado el síndrome cerebrohepatorrenal, caracterizado por la reducción o ausencia de peroxisomas en las células del hígado, riñones y cerebro. El síndrome de Zellweger

es uno de un grupo de trastornos llamado las leucodistrofias, que afectan todas la vaina de mielina, la cubierta grasa que actúa de aislante sobre las fibras nerviosas en el cerebro. Las características más comunes del síndrome de Zellweger incluyen un hígado agrandado, altos niveles de hierro y cobre en la sangre, y alteraciones de la visión. Algunos lactantes afectados pueden mostrar retraso del crecimiento prenatal. Los síntomas al nacer pueden incluir

5 falta de tono muscular y una incapacidad para moverse. Otros síntomas pueden incluir características faciales inusuales, retraso mental, convulsiones, y una incapacidad para succionar y/o tragar. También pueden producirse ictericia y hemorragia gastrointestinal.

Esta enfermedad se produce por mutaciones en cualquiera de varios genes diferentes que participan en la formación de los peroxisomas. Estos genes se encuentran sobre al menos dos localizaciones del cromosoma diferentes que incluyen el cromosoma 2 (región 2p15) y el cromosoma 7 (región 7q21-q22). Así, su diagnóstico puede confirmarse por prueba genética.

Tirosinemia

La tirosinemia hereditaria es un enzimopatía congénita genética asociada a grave enfermedad del hígado en la infancia. La enfermedad se hereda de un modo recesivo autosómico. Las características clínicas de la enfermedad tienden a clasificarse en dos categorías: en la forma aguda de la enfermedad, las anomalías aparecen en el primer mes de vida. Los bebés pueden mostrar poco aumento de peso, hígado y bazo agrandados, abdomen distendido,

20 hinchazón de las piernas y elevada tendencia a sangrar, particularmente hemorragias nasales. La ictericia puede o puede no ser importante. En una forma más crónica de la tirosinemia, el agrandamiento del hígado y el bazo son importantes, el abdomen está distendido con líquido, el aumento de peso puede ser escaso, y se producen vómitos y diarrea frecuentemente. Los pacientes afectados normalmente desarrollan cirrosis y sus complicaciones. En pacientes mayores, hay un aumento del riesgo de cáncer de hígado.

En el diagnóstico de esta enfermedad, frecuentemente se usan pruebas del hígado. Frecuentemente se encuentran baja albúmina y factores de coagulación en suero. Las enzimas transaminasas del hígado pueden ser de levemente a moderadamente elevadas, pero la bilirrubina aumenta a un grado variable. Debido al defecto bioquímico, pueden medirse productos anormales en la orina que confirman el diagnóstico. Éstos son ácido parahidroxifenil-láctico y

30 ácido parahidroxifenilpirúvico. Además, se encuentran succinilacetona y succinilacetoacetato en la orina. Puede haber hipoglucemia y muestras de pérdida de ciertas sustancias en la orina que incluyen azúcar, proteína y aminoácidos. El defecto bioquímico básico es una anomalía en una enzima clave en el metabolismo de un aminoácido esencial, la fenilalanina. La enzima es fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH), que se reduce sustancialmente en pacientes afectados. Es posible el diagnóstico prenatal y puede realizarse midiendo succinilacetona en el líquido amniótico o fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) en células del líquido amniótico.

Fructosemia

La fructosemia, también conocida como intolerancia a la fructosa o deficiencia de fructosa aldolasa B, es una enfermedad metabólica producida por la ausencia de una enzima, 1-fosfofructaldolasa (es decir, fructosa aldolasa B). La intolerancia a la fructosa hereditaria se hereda como una enfermedad recesiva autosómica. Puede ser tan común como 1 en 20.000 en algunos países europeos. En personas intolerantes a la fructosa, la ingestión de fructosa (azúcar de la fruta) y sacarosa (azúcar de caña o de remolacha, azúcar de mesa) produce cambios químicos complicados que no pueden corregirse debido a la ausencia de la enzima 1-fosfofructaldolasa. La ingestión

45 de fructosa produce hipoglucemia profunda y daño hepático progresivo. El diagnóstico de esta afección se basa en los síntomas intolerantes a la fructosa, resultados de pruebas que miden el nivel de fructosa aldolasa B y análisis genéticos para identificar mutación (mutaciones) en el gen.

Galactosemia

La galactosemia es una rara enfermedad hereditaria que conduce no solo a cirrosis en lactantes, sino más gravemente, a una enfermedad devastadora precoz si no se diagnostica rápidamente. Esta enfermedad se produce por niveles elevados de galactosa en sangre resultante de una deficiencia de la enzima hepática, GALT (galactosa-1-fosfato uridil transferasa), requerida para su metabolismo. La galactosemia se hereda como un rasgo recesivo autosómico. Hay dos formas de la enfermedad, deficiencia de GALT (galactosemia clásica) y deficiencia de galactosa cinasa. De las dos, la deficiencia de GALT es la más grave. El gen GALT está en el cromosoma 9p13.

Las personas con galactosemia son incapaces de metabolizar el azúcar simple galactosa. Si a un lactante con galactosemia se le da leche, se forma galactosa en el sistema del lactante causando daño hepático, cerebro, riñones y ojos. Los individuos con galactosemia no pueden tolerar ninguna forma de leche (humana o de otro modo) o cualquier otro alimento que contenga galactosa. La exposición a productos lácteos producirá daño hepático, retraso mental, formación de cataratas e insuficiencia renal. Normalmente, un lactante recién nacido con galactosemia, tras ser alimentado con leche, desarrollará ictericia, vómitos, letargo, irritabilidad y convulsiones. El hígado se agranda y la azúcar en sangre puede ser baja. La alimentación continuada de productos lácteos al lactante conduce a cirrosis del hígado, formación de cataratas en el ojo produciendo ceguera parcial, y retraso mental.

Los síntomas de la galactosemia incluyen ictericia, vómitos, mala alimentación, escaso aumento de peso, letargo, irritabilidad, convulsiones y opacidades en los cristalinios de los ojos. Los signos detectados incluyen hepatomegalia, hipoglucemia, aminoaciduria, cirrosis, ascitis, cataratas y retraso mental.

- 5 El diagnóstico se basa normalmente en la demostración de una falta de actividad de la enzima GALT en eritrocitos. El diagnóstico prenatal también es factible por medición directa de la enzima. También es posible la prueba basada en ADN para diagnosticar la afección.

Afección inflamatoria crónica

- 10 La afección hepática inflamatoria crónica es una enfermedad progresiva del hígado y puede conducir a fibrosis o muerte si se produce insuficiencia hepática completa. La causa de esta condición puede ser infección bacteriana o viral, exposición a agentes tóxicos, o en algunos casos, desconocida.

- 15 Los signos clínicos de esta enfermedad pueden oscilar de leves a graves. Los síntomas típicos pueden incluir fatiga, pérdida de peso, náuseas, vómitos, aumento de la micción y defecación, líquido que se acumula en el abdomen (ascitis), ictericia, sangre en las heces, y comportamiento neurológico anormal. Se hace un diagnóstico definitivo de la enfermedad hepática inflamatoria crónica por examen de un espécimen de biopsia.

Desequilibrio vascular

- 20 Los trastornos vasculares también pueden contribuir al elevado riesgo de fibrosis hepática. La anomalía más frecuente de la circulación que afecta el hígado es la insuficiencia cardíaca congestiva, que conduce a pérdida reducida de sangre del hígado. Otras causas de la congestión hepática incluyen pericarditis constrictiva, obstrucción de la vena cava inferior y venas hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), oclusión de las venas hepáticas pequeñas (enfermedad veno-oclusiva) y trombosis de la vena porta. La elevada resistencia a la pérdida venosa hepática produce hepatomegalia congestiva, dilatación de las vénulas hepáticas y sinusoides, e hipoxia. La hipoxia conduce a su vez al daño de hepatocitos con posible fibrosis y cirrosis.

Toxicidad al fármaco

- 30 Toxinas tales como alcohol, fármacos o venenos pueden producir hepatitis directamente (dañando el tejido del hígado) o indirectamente (reduciendo las defensas o estimulando una respuesta autoinmunitaria); ambos pueden conducir a fibrosis hepática.

- 35 El alcohol se metaboliza principalmente por el hígado, produciendo diversos metabolitos que pueden producir daño hepático. El riesgo de toxicidad hepática aumenta si se consumen más de 40 gramos de alcohol, o aproximadamente cuatro bebidas, por día.

- 40 Numerosas medicaciones pueden dañar el hígado, que oscilan de alteración asintomática leve, en químicas del hígado a insuficiencia hepática y muerte. La toxicidad hepática puede o puede no estar relacionada con la dosis. La dilantina (un anticonvulsivo), metotrexato (un fármaco usado para tratar diversas enfermedades neoplásicas, psoriasis y artritis reumatoide), clorpromazina (un fármaco antipsicótico) e isoniazida (un agente antituberculoso) son ejemplos de fármacos que pueden producir hepatitis "similar a viral".

- 45 Tanto las toxinas medioambientales como industriales pueden producir una amplia variedad de cambios en el hígado. El daño hepático no es necesariamente dependiente de la dosis y puede oscilar de inflamación asintomática leve a insuficiencia fulminante o fibrosis y cirrosis progresiva.

- 50 Los pacientes con riesgo de desarrollar fibrosis hepática debido a su exposición a fármacos o toxinas se identifican generalmente por revisión de sus antecedentes médicos y monitorización continuada en su función hepática.

Fibrosis hepática congénita

- 55 La fibrosis hepática congénita (FHC) es un trastorno hereditario raro caracterizado por fibrosis periportal con vías biliares proliferantes irregularmente formadas, hipertensión portal intrahepática y varices esofágicas. La FHC está asociada a una alteración de las funciones renales, normalmente producida por una enfermedad renal poliquística recesiva autosómica (ERPRA). La enfermedad se hereda de un modo recesivo autosómico, pero se producen casos autosómicos. Las anomalías hepáticas típicas incluyen hepatomegalia, hipertensión portal y fibrosis hepática.
- 60 Muchos pacientes con FHC también muestran hemorragias del tubo gastrointestinal (por ejemplo, del estómago e intestinos). El diagnóstico de FHC se hace basándose en estos síntomas, especialmente la asociación con ERPRA. La prueba genética también es un posible medio para diagnosticar la afección.

2. Fibrosis intestinal

- 65 Se conocen varias enfermedades que aumentan el riesgo de un paciente a desarrollar fibrosis intestinal, que

incluyen: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis después de radiación y colitis microscópica.

Enfermedad de Crohn

5 La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica de los intestinos. Produce principalmente ulceraciones (roturas en el revestimiento) de los intestinos delgado y grueso, pero puede afectar el aparato digestivo en cualquier parte desde la boca hasta el ano. También se llama enteritis granulomatosa o colitis, enteritis regional, ileítis, o ileítis terminal. Todavía no se ha entendido la causa de la enfermedad de Crohn. Se ha clasificado tradicionalmente como una enfermedad autoinmunitaria y algunos científicos sospechan ahora que la infección por
10 ciertas bacterias, tales como cepas de *Mycobacterium*, puede ser la causa de esta enfermedad.

Síntomas comunes de la enfermedad de Crohn incluyen dolor abdominal, diarrea y pérdida de peso. Síntomas menos comunes incluyen poco apetito, fiebre, sudores nocturnos, dolor rectal y hemorragia rectal. Los síntomas de la enfermedad de Crohn dependen de la localización, el grado y la gravedad de la inflamación. Los diferentes
15 subtipos de la enfermedad de Crohn y sus síntomas son:

- (1) La colitis de Crohn es inflamación que está confinada al colon. El dolor abdominal y la diarrea hemorrágica son los síntomas comunes. También pueden producirse fístulas anales y abscesos perirrectales.
- 20 (2) La enteritis de Crohn se refiere a inflamación confinada al intestino delgado (la primera parte, llamada el yeyuno o la segunda parte, llamada el íleon). La participación del íleon solo se denomina ileítis de Crohn. El dolor abdominal y la diarrea son los síntomas comunes. También puede producirse obstrucción del intestino delgado.
- 25 (3) La ileítis terminal de Crohn es la inflamación que afecta solo al extremo del intestino delgado (íleon terminal), la parte del intestino delgado más próxima al colon. El dolor abdominal y la diarrea son los síntomas comunes. También puede producirse obstrucción del intestino delgado.
- (4) Enterocolitis e ileocolitis de Crohn son términos para describir la inflamación que implica tanto el intestino delgado como el colon. La diarrea hemorrágica y el dolor abdominal son los síntomas comunes. También puede producirse obstrucción del intestino delgado.

30 La ileítis terminal de Crohn e ileocolitis son los tipos más comunes de enfermedad de Crohn. Hasta un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn pueden tener una o más de las siguientes afecciones que implican el área anal:

- (1) Hinchazón del tejido del esfínter anal, el músculo al final del colon que controla la defecación.
- 35 (2) Desarrollo de úlceras y fisuras (úlceras largas) dentro del esfínter anal. Estas úlceras y fisuras pueden producir sangrado y dolor con la defecación.
- (3) Desarrollo de fístulas anales (túneles anormales) entre el ano y el recto y la piel que rodea el ano). Puede drenar moco y pus de las aberturas de las fístulas sobre la piel.
- 40 (4) Desarrollo de abscesos perirrectales (colecciones de pus en el área anal y rectal). Los abscesos perirrectales pueden producir fiebre, dolor y dolor con la palpación alrededor del ano.

El diagnóstico de la enfermedad de Crohn se sospecha en pacientes con fiebre, dolor abdominal y dolor con la palpación, diarrea con o sin hemorragia, y enfermedades anales. Los análisis de sangre de laboratorio pueden mostrar elevadas cifras de glóbulos blancos y velocidades de sedimentación, ambos de los cuales sugieren infección
45 o inflamación. Otros análisis de sangre pueden mostrar bajos números de eritrocitos (anemia), bajas proteínas en sangre, y bajos minerales en el cuerpo, reflejando pérdida de estos elementos debido a diarrea crónica.

Pueden usarse estudios de rayos X con bario para definir la distribución, naturaleza y gravedad de la enfermedad. El bario es un material blanquecino que es visible por rayos X y aparece blanco sobre películas de rayos X. Cuando el bario se ingiere por vía oral (serie gastrointestinal superior), llena el intestino y pueden tomarse imágenes (rayos X) del estómago y los intestinos delgados. Cuando el bario se administra a través del recto (enema de bario), pueden obtenerse imágenes del colon y el íleon terminal. Los rayos X con bario pueden mostrar ulceraciones, estrechamiento y, algunas veces, fístulas del intestino.

55 La visualización directa del recto y el intestino grueso puede llevarse a cabo con tubos de visualización flexibles (colonoscopios). La colonoscopia es más precisa que los rayos X con bario en detectar pequeñas úlceras o pequeñas áreas de inflamación del colon y el íleon terminal. La colonoscopia también permite tomar pequeñas muestras de tejido (biopsias) y enviarlas para examen bajo el microscopio para confirmar el diagnóstico de enfermedad de Crohn. La colonoscopia también es más precisa que los rayos X con bario en evaluar el grado
60 (actividad) de inflamación.

La tomografía axial computerizada (TAC o TC) es una técnica de rayos X computerizada que permite la obtención de imágenes del abdomen entero y la pelvis. Puede ser especialmente útil en detectar abscesos.

65 Lo más recientemente, la endoscopia con cápsula de vídeo se ha añadido a la lista de pruebas de diagnóstico para diagnosticar enfermedad de Crohn. Para la endoscopia con cápsula de vídeo, se traga una cápsula que contiene

una cámara de vídeo en miniatura. A medida que la cápsula se desplaza a través del intestino delgado, envía imágenes de vídeo del revestimiento del intestino delgado a un receptor llevado en un cinturón en la cintura. Las imágenes se descargan y a continuación se revisan en un ordenador. El valor de la endoscopia con cápsula de vídeo es tal que puede identificar las anomalías leves tempranas de la enfermedad de Crohn. La endoscopia con cápsula de vídeo puede ser particularmente útil cuando hay una fuerte sospecha de enfermedad de Crohn, pero los rayos X con bario son normales (los rayos X con bario no son tan buenos en identificar enfermedad de Crohn leve temprana).

Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa es otra afección inflamatoria crónica que está estrechamente relacionada con la enfermedad de Crohn, pero normalmente implica solo al recto, o recto y colon sigmoide en el extremo distal del colon. Éstos se llaman proctitis ulcerativa y procto-sigmoiditis, respectivamente. Conjuntamente, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se denominan frecuentemente enfermedad inflamatoria del intestino (EII).

Síntomas comunes de la colitis ulcerosa incluyen hemorragia rectal y diarrea, pero hay un amplio intervalo de síntomas entre pacientes con esta enfermedad. La variabilidad de síntomas refleja diferencias en el grado de enfermedad (es decir, la cantidad de colon y recto que están inflamados) y la intensidad de la inflamación. Generalmente, los pacientes con inflamación confinada al recto y un segmento corto del colon adyacente al recto tienen síntomas más leves y un mejor pronóstico que los pacientes con inflamación más extendida del colon. Los diferentes tipos de colitis ulcerosa se clasifican según la localización y el grado de inflamación:

(1) Proctitis ulcerativa se refiere a la inflamación que está limitada al recto. En muchos pacientes con proctitis ulcerativa, la hemorragia rectal intermitente leve puede ser el único síntoma. Otros pacientes con inflamación rectal más grave pueden, además, experimentar dolor rectal, necesidad imperiosa de defecar (sensación repentina de tener que defecar y una necesidad de correr al baño por temor a mancharse) y tenesmo (urgencia dolorosa e ineficaz de hacer de vientre).

(2) La proctosigmoiditis implica inflamación del recto y el colon sigmoide (un segmento corto del colon contiguo al recto). Los síntomas de la proctosigmoiditis, como aquellos de la proctitis, incluyen hemorragia rectal, necesidad imperiosa de defecar y tenesmo. Algunos pacientes con proctosigmoiditis también desarrollan diarrea hemorrágica y calambres.

(3) La colitis del lado izquierdo implica inflamación que empieza en el recto y se extiende hasta el colon izquierdo (colon sigmoide y el colon descendente). Los síntomas de la colitis del lado izquierdo incluyen diarrea hemorrágica, calambres abdominales, pérdida de peso y dolor abdominal del lado izquierdo.

(4) La pancolitis o colitis universal se refiere a inflamación que afecta al colon entero (colon derecho, colon izquierdo, colon transversal y el recto). Los síntomas de la pancolitis incluyen diarrea hemorrágica, dolor abdominal y calambres, pérdida de peso, fatiga, fiebre y sudores nocturnos. Algunos pacientes con pancolitis tienen inflamación leve y síntomas leves que responden fácilmente a las medicaciones. Generalmente, sin embargo, los pacientes con pancolitis sufren enfermedad más grave y son más difíciles de tratar que aquellos con formas más limitadas de colitis ulcerosa.

(5) La colitis fulminante es una forma rara, pero grave, de la pancolitis. Los pacientes con colitis fulminante están extremadamente enfermos con deshidratación, dolor abdominal grave, diarrea prolongada con hemorragia, e incluso choque. Están en riesgo de desarrollar megacolon tóxico (marcada dilatación del colon debido a inflamación grave) y rotura del colon (perforación). Los pacientes con colitis fulminante y megacolon tóxico se tratan en el hospital con potentes medicaciones intravenosas. A menos que respondan al tratamiento rápidamente, la eliminación quirúrgica del colon enfermo es necesaria para prevenir la rotura del colon.

El diagnóstico de la colitis ulcerosa se sugiere por los síntomas de dolor abdominal, hemorragia rectal y diarrea. Como primera etapa, se recogen especímenes de heces para el análisis para excluir infección y parásitos, ya que estas afecciones pueden producir colitis que imita a la colitis ulcerosa. Entonces pueden realizarse análisis de sangre y mostrar anemia y un número elevado de leucocitos o velocidad de sedimentación (comúnmente denominada velocidad de SED). Un elevado número de leucocitos y velocidad de SED reflejan ambos inflamación en curso en el colon. La confirmación de la colitis ulcerosa requiere una prueba para visualizar el intestino grueso.

Tubos flexibles insertados a través del recto (sigmoidoscopios y colonoscopios) permiten la visualización directa del interior del colon para establecer el diagnóstico y para medir el grado de la colitis. Pueden obtenerse pequeñas muestras de tejido (es decir, biopsias) durante el procedimiento para determinar la gravedad de la colitis. El conocimiento del grado y gravedad de la colitis es importante en elegir entre las opciones de tratamiento. Los rayos X con enema de bario también pueden indicar el diagnóstico de colitis ulcerosa. Durante un enema con bario, se administra una sustancia blanquecina en el recto y se inyecta en el colon. El bario es radio-opaco y puede delinear el colon sobre imágenes de rayos X. Un enema de bario es menos preciso y útil que las técnicas de visualización directas en el diagnóstico de colitis ulcerosa.

Colitis después de radiación

La colitis después de radiación es un tipo de irritación del colon persistente que se produce en pacientes que se han

expuesto previamente a una cantidad significativa de irradiación, tales como aquellos que han recibido radioterapia para tratar cánceres. Aunque los síntomas generales son similares a aquellos de afecciones de colon irritado no relacionadas con radiación, tales como dolor y diarrea crónica, los pacientes que padecen colitis después de la radiación se identifican fácilmente basándose en sus antecedentes médicos.

Colitis microscópica

La colitis microscópica (CM) engloba las dos entidades morfológicamente distintas de colitis colagenosa (CC) y colitis linfocítica (CL). Los pacientes con CM generalmente presentan diarrea crónica, que puede asociarse a calambres e hinchazón. Los exámenes endoscópicos y radiológicos son normalmente normales. La evaluación histológica revela inflamación que consiste predominantemente en infiltración linfocítica, y una banda de colágeno subepitelial engrosada es diagnóstico de CC. Tanto la CL como la CC pueden asociarse a enfermedades autoinmunitarias tales como celiaquía, diabetes, artritis y tiroiditis, incluso los precisos mecanismos que participan en la patogénesis siguen sin estar claros.

3. Fibrosis renal

Se conocen una variedad de enfermedades y afecciones renales para aumentar la probabilidad de que un paciente desarrolle fibrosis renal, conduciendo con el tiempo a enfermedad renal terminal y la necesidad de diálisis y trasplante. Estas enfermedades y afecciones incluyen: nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica, enfermedad renal poliquística, y otras enfermedades menos comunes que afectan al riñón.

Nefropatía diabética

La nefropatía diabética es una enfermedad renal asociada a la diabetes de larga duración. También se conoce como enfermedad de Kimmelstiel-Wilson (o síndrome), afecta la red de vasos sanguíneos minúsculos (la microvasculatura) en el glomérulo, una estructura clave en el riñón que está compuesta por vasos sanguíneos capilares y es críticamente necesaria para la filtración de la sangre.

Los síntomas de esta enfermedad incluyen excesiva filtración de proteína en la orina (proteinuria), orina espumosa (que significa proteína en orina), hipertensión arterial (hipertensión), hinchazón de las piernas (peor después de caminar/estar de pie), picor, náuseas/vómitos, pérdida de peso sin explicación, fatiga/letargo, gran necesidad de orinar por la noche, y requerir menos píldoras o insulina para controlar la diabetes.

La nefropatía diabética generalmente produce función renal progresivamente alterada. En su forma grave, esta enfermedad puede conducir a insuficiencia renal y enfermedad renal terminal, y un paciente puede requerir diálisis renal crónica o un trasplante de riñón. La nefropatía diabética también se denomina glomerulonefritis intercapilar.

Nefroesclerosis hipertensiva

La nefroesclerosis hipertensiva es el endurecimiento (esclerosis) del riñón en relación con la hipertensión. El riñón desempeña una función importante en regular la tensión arterial. Las enfermedades renales pueden afectar la función de los riñones y alterar tal regulación, produciendo tensión arterial elevada. Por otra parte, los daños renales pueden producir hipertensión durante un periodo prolongado, ya que la hipertensión arterial puede afectar el aparato cardiovascular haciendo que se estreche o engrosen los vasos sanguíneos.

En su etapa temprana, la nefroesclerosis hipertensiva puede no mostrar ningún síntoma significativo durante un tiempo prolongado. Cuando está presente, síntomas comunes incluyen: hipertensión arterial, cefalea, molestia en el cuello, fatiga, náuseas o vómitos y proteína en orina (proteinuria).

Glomerulonefritis crónica

La glomerulonefritis es una afección inflamatoria que afecta predominantemente a los glomérulos, las cabezas filtrantes de las nefronas en el riñón. La glomerulonefritis crónica normalmente conduce a enfermedad renal terminal.

Los síntomas generales de la glomerulonefritis incluyen sangre o proteína en orina, orina espumosa (normalmente indicativa de proteína en orina), orina oscura o de color rosa, hinchazón de las piernas, enfermedades sistémicas tales como diabetes o enfermedades autoinmunitarias con manifestaciones sistémicas, por ejemplo, pérdida de peso sin explicación, artritis o erupción cutánea.

Hay varias afecciones diferentes que pueden producir glomerulonefritis o resultar de glomerulonefritis. Algunas de estas afecciones se tratan más adelante. Un ejemplo de una afección relacionada con la glomerulonefritis es la **nefropatía por IgA**, una enfermedad renal en la que la IgA se deposita dentro de los glomérulos dentro del riñón. Los depósitos de IgA previenen este proceso de filtración, conduciendo a los síntomas de sangre y proteína en la orina e hinchazón en las manos y los pies. Esta enfermedad produce inflamación glomerular que por último lugar

produce la alteración o incluso la pérdida completa de la función renal.

Las enfermedades autoinmunitarias también pueden dar lugar a glomerulonefritis. Un ejemplo tal es la nefritis lúpica (o **glomerulonefritis secundaria a lupus**). En otros casos, las infecciones por bacterias (por ejemplo, *Streptococcus*) o virus (por ejemplo, HIV o VHB), particularmente en niños por debajo de la edad de diez, pueden producir glomerulonefritis después de la infección.

La glomerulonefritis también se refiere a **glomeruloesclerosis segmentaria focal** (GESF), una enfermedad que se produce cuando se forma tejido cicatricial en algunos de los glomérulos del riñón. El término "focal" significa que algunos de los glomérulos cicatrizan, mientras que otros siguen normales. El término "segmentaria" significa que solo se daña parte de un glomérulo individual. Los síntomas de GESF incluyen orina espumosa, hinchazón del cuerpo (es decir, edema generalizado, de líquidos retenidos), aumento de peso y poco apetito.

Puede hacerse un diagnóstico basándose en: un análisis de orina, que muestra proteína, con o sin pequeñas cantidades de sangre; una biopsia renal, que muestra evidencia de cicatrización; y una prueba de microscopía de inmunofluorescencia, que muestra depósitos de IgM.

Hay dos tipos de **glomerulonefritis membranoproliferativa**, que son trastornos renales con síntomas similares que producen función renal alterada o disminuida, producida por inflamación y cambios en la estructura microscópica de células renales. Los síntomas incluyen: sangre en la orina, orina oscura, orina turbia, disminución en el volumen de orina, hinchazón de cualquier parte del cuerpo, cambios en el estado mental (por ejemplo, disminución de la vigilia, disminución de la concentración). Una exploración física revelará estos síntomas a un grado variable. Un diagnóstico se ayuda de análisis de orina y se confirma por biopsias de riñón.

La **glomerulonefritis rápidamente progresiva** es una forma de enfermedad renal que produce daño a las estructuras internas de los riñones y la rápida pérdida de la función, con anomalías en forma de media luna que se muestran sobre una biopsia del riñón. Síntomas comunes incluyen: edema, orina oscura o de color humo, sangre en la orina, disminución del volumen de orina, fiebre, dolores musculares, dolores de las articulaciones, falta de aliento, tos, malestar general, dolor abdominal, pérdida del apetito, diarrea y similares. Para diagnosticar esta afección, una exploración física combinada con análisis de sangre y análisis de orina puede revelar muchos de los síntomas anteriores, además de BUN y creatinina elevados, disminución de la eliminación de creatinina, y/o la presencia de anticuerpos anti-membrana basal glomerular y anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos (ANCA). Una biopsia de riñón confirma la glomerulonefritis semilunar.

La **esclerodermia** es una enfermedad autoinmunitaria del tejido conjuntivo, también llamada esclerosis sistémica. Esta afección se caracteriza por fibrosis en la piel y órganos del cuerpo. El diagnóstico de la esclerodermia se basa en el hallazgo de las características clínicas de las enfermedades. Casi todos los pacientes con esclerodermia tienen análisis de sangre que sugieren autoinmunidad, anticuerpos antinucleares (ANA). Un anticuerpo particular, el anticuerpo anticentrómero, se encuentra casi exclusivamente en la forma limitada, o CREST, de esclerodermia. El anticuerpo anti-Scl 70 (anticuerpo anti-topoisomerasa I) se observa casi siempre en pacientes con la forma difusa de esclerodermia.

La **vasculitis** es un término general para un grupo de enfermedades no comunes que caracterizan la inflamación de los vasos sanguíneos, conduciendo a daños a las paredes de diversos vasos sanguíneos. Los análisis de sangre o líquidos corporales en un paciente con vasculitis activa generalmente indican inflamación en el cuerpo. Dependiendo del grado de participación del órgano, una variedad de pruebas de función del órgano pueden ser anormales y así indicativas de la afección. El diagnóstico de la vasculitis se establece por último lugar después de que una biopsia de tejido implicado (por ejemplo, riñón) demuestre el patrón de inflamación de vasos sanguíneos. Dependiendo de la situación, una alternativa a la biopsia puede ser una prueba de rayos X de los vasos sanguíneos, por ejemplo, un angiograma.

La **granulomatosis de Wegener** (GW) es una enfermedad rara que afecta a muchos órganos diferentes que incluyen el aparato respiratorio (senos, nariz, tráquea y los pulmones) y los riñones. Una de las principales características de la enfermedad es una inflamación de los vasos sanguíneos (o vasculitis). La inflamación estrecha los vasos sanguíneos y reduce la circulación sanguínea a los órganos afectados, posteriormente daña tejidos y órganos afectados.

La causa precisa de la GW sigue siendo desconocida, pero se cree que se refiere a una afección autoinmunitaria. En realidad, los auto-anticuerpos se detectan frecuentemente en algunos pacientes con GW. Uno de los síntomas más comunes de la GW es una rinorrea crónica y otros síntomas similares al resfriado que no responden a tratamiento convencional. Los síntomas del resfriado empeoran gradualmente y podrían conducir a sinusitis (inflamación de los senos), infección del oído medio (otitis media), tos, expectoración con sangre e inflamación del pulmón (pleuritis y neumonía). Otros síntomas incluyen fiebre, fatiga, pérdida del apetito, pérdida de peso, dolor de las articulaciones, sudores nocturnos, cambio en el color de la orina y debilidad. La enfermedad renal es el desarrollo más grave de la GW.

El análisis de sangre de pacientes con GW frecuentemente muestra anemia (bajo número de glóbulos rojos) y altos números de leucocitos. Si los riñones participan, se observan glóbulos rojos en la orina cuando se visualizan bajo un microscopio. Por tanto, los análisis de sangre que tienen como objetivo medir la función renal pueden mostrar anomalías. Se usa radiografía del tórax para determinar si los pulmones participan. La biopsia de riñón y TAC de senos o pulmones también son herramientas importantes usadas en el diagnóstico de GW.

Se observa un tipo específico de anticuerpo llamado anticuerpo citoplásmico antineutrófilos (ANCA) en la sangre de aproximadamente el 90 % de los pacientes con GW. El ANCA es un tipo de auto-anticuerpos contra los propios glóbulos blancos de un individuo (es decir, los neutrófilos). Estos anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos también se encuentran en otras afecciones inflamatorias y enfermedades (tales como infección por el VIH). La prueba para ANCA es útil para confirmar un diagnóstico de GW, pero no puede usarse por sí misma para hacer un diagnóstico.

La **poliarteritis nodosa** (PAN) es una enfermedad autoinmunitaria rara caracterizada por inflamación espontánea de las arterias del cuerpo. Los órganos más comúnmente implicados incluyen intestinos y riñones. La función alterada o dolor en cualquiera de estos órganos puede ser un síntoma. El mal riego sanguíneo a los intestinos puede producir dolor abdominal y hemorragia. La fatiga, pérdida de peso y fiebre también se observan frecuentemente en pacientes. La causa de PAN no es clara, aunque se ha informado tras la infección por el VHB.

El diagnóstico de PAN está soportado por pruebas que indican inflamación que incluye elevación de la velocidad de sedimentación de la sangre y proteína C reactiva. El número de leucocitos y el número de plaquetas puede ser elevado, mientras que el número de glóbulos rojos disminuye (anemia). Algunos pacientes pueden ser positivos para las pruebas del VHB. Los análisis de orina pueden mostrar la presencia de proteína y glóbulos rojos en la orina. En algunos casos, pueden observarse anomalías en las pruebas de la función nerviosa. El diagnóstico se confirma por una biopsia o un angiograma de tejido implicado, que revela los vasos sanguíneos inflamados.

Además, el **síndrome de Goodpasture** es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por una combinación de enfermedad pulmonar y renal - específicamente, hemorragia pulmonar (sangrado en los pulmones) y glomerulonefritis (inflamación del glomérulo) - debida a inflamación grave en las membranas basales de los alvéolos del pulmón y el glomérulo en el riñón con formación de anticuerpos para componentes de la membrana basal en ambos sitios. Los síntomas clínicos incluyen tos con esputo con sangre, orina con sangre, disminución de la diuresis, fatiga, hipertensión, hinchazón (edema) y pérdida de peso sin explicación. El síndrome también se ha llamado enfermedad de anticuerpos anti-membrana basal glomerular.

Glomerulopatía crónica del trasplante

Glomerulopatía crónica del trasplante se refiere a una variedad de afecciones que se producen en pacientes que han recibido un trasplante de riñón y tienen los cambios característicos en la estructura del riñón que incluyen expansión de la matriz mesangial, proliferación mesangial, engrosamiento de la membrana basal con dobles contornos, e interposición mesangial periférica, algunas veces acompañada de esclerosis segmentaria focal. Estos cambios están normalmente asociados a proteinuria marcada, frecuentemente en el intervalo nefrótico. El diagnóstico de estas afecciones se hace basándose en la revisión de los antecedentes médicos (si un paciente es un receptor de trasplante), análisis de orina y biopsia de riñón.

Nefritis intersticial crónica

La nefritis intersticial es un tipo de nefritis debida a trastornos del tejido conjuntivo dentro del riñón, reacciones alérgicas graves, exposición a sustancias tóxicas, rechazo de trasplante, bloqueo urinario u otros factores, produciendo inflamación del espacio entre los túbulos renales y puede incluir inflamación de los túbulos. Los síntomas de la nefritis intersticial pueden incluir fiebre, dolor en el área del riñón, diuresis elevada o disminuida, fiebre, cambios del estado mental (que oscilan de somnolencia a confusión a coma), náuseas o vómitos, eritema, hinchazón del cuerpo, aumento de peso debido a la retención de líquido, y sangre o proteína en la orina.

Un examen de un paciente que padece nefritis intersticial puede revelar edema o sobrecarga de fluido, o signos de empobrecimiento del volumen, con ruidos anormales oídos cuando se escucha con un estetoscopio el corazón o pulmones. La tensión arterial comúnmente es alta. Un análisis de orina frecuentemente muestra pequeñas cantidades de proteína y algunas veces glóbulos rojos, células tubulares renales y otras anomalías. Frecuentemente se observan WBC y cilindros de WBC en la orina (particularmente eosinófilos). Los CBC pueden demostrar eosinofilia (superior al número de eosinófilos normal). La gravedad específica de la orina y la osmolalidad muestran que hay un fallo en concentrar orina incluso cuando se limita la ingestión de agua. El pH de la orina puede mostrar un fallo en acidificar la orina apropiadamente. Los gases de la sangre arterial y la química de la sangre pueden mostrar acidosis metabólica. Se usan los niveles de BUN y de creatinina para evaluar el nivel de funcionamiento del riñón. RBC - orina muestra elevados glóbulos rojos que indican enfermedad renal. Finalmente, una biopsia de riñón puede confirmar el diagnóstico de nefritis intersticial y se usa para evaluar el grado de daño al riñón.

Enfermedad renal poliquística

La enfermedad renal poliquística (EPQ) es un trastorno que se caracteriza por el crecimiento de numerosos quistes en los riñones. Los quistes están llenos de fluido. Los quistes de EPQ pueden sustituir mucha masa de los riñones, reduciendo así la función renal y conduciendo a insuficiencia renal. Cuando la EPQ hace que los riñones dejen de funcionar, que normalmente se produce solo después de muchos años, el paciente requiere diálisis o trasplante de riñón. Aproximadamente la mitad de las personas con la forma primaria de EPQ progresan a insuficiencia renal o enfermedad renal terminal (ERT).

La EPQ puede producir quistes en el hígado y problemas en otros órganos, tales como el corazón y los vasos sanguíneos en el cerebro. Estas complicaciones ayudan a los doctores a distinguir EPQ de los quistes “simples” normalmente inocuos que frecuentemente se forman en los riñones en los últimos años de vida.

Hay dos formas heredadas principales de EPQ y una forma no heredada. La EPQ dominante autosómica es la forma heredada más común. Los síntomas se desarrollan normalmente entre las edades de 30 y 40, pero pueden empezar tan pronto como en la infancia. Aproximadamente el 90 por ciento de todos los casos de EPQ son EPQ dominante autosómica. Los síntomas más comunes son dolor en la espalda y los costados (entre las costillas y las caderas), y cefaleas. El dolor sordo puede ser temporal o persistente, leve o grave. Las personas con EPQ dominante autosómica también pueden experimentar los siguientes problemas: infecciones de las vías urinarias; hematuria (sangre en la orina); quistes en el hígado y pancreáticos; válvulas del corazón anormales; hipertensión arterial; cálculos renales; aneurismas (bultos en las paredes de los vasos sanguíneos) en el cerebro; y diverticulosis (pequeños sacos sobre el colon).

Para diagnosticar EPQ dominante autosómica, un doctor normalmente observa tres o más quistes del riñón usando ecografía. El diagnóstico se refuerza por un antecedente familiar de EPQ dominante autosómica y la presencia de quistes en otros órganos.

En la mayoría de los casos de EPQ dominante autosómica, la condición física de la persona parece normal durante muchos años, incluso décadas, de manera que la enfermedad puede pasar desapercibida. Los reconocimientos físicos y los análisis de sangre y orina pueden no conducir a diagnóstico. Una vez se han formado los quistes, sin embargo, el diagnóstico es posible con tecnología de obtención de imágenes. Casi siempre se usa ultrasonidos, ya que la ecografía emplea colorantes no inyectados o radiación y es segura para todos los pacientes, que incluye mujeres embarazadas. También puede detectar quistes en los riñones de un feto.

Procedimientos de obtención de imágenes más poderosos tales como TAC e IRM también pueden detectar quistes. El avance en la tecnología molecular también ha hecho de las pruebas de ADN una posibilidad para confirmar un diagnóstico de EPQ dominante autosómica antes del desarrollo de quistes.

La EPQ recesiva autosómica es una segunda forma heredada de la enfermedad. Es relativamente rara. La EPQ recesiva autosómica se produce por un defecto genético que es diferente del que produce EPQ dominante autosómica. Los padres que no tienen la enfermedad pueden tener un niño con la enfermedad si ambos padres llevan el gen anormal y ambos pasan el gen a su bebé. La probabilidad de que esto ocurra (cuando ambos padres llevan el gen anormal) es de uno entre cuatro. Si solo un padre lleva el gen anormal, el bebé no puede tener la enfermedad.

Los síntomas de EPQ recesiva autosómica pueden empezar en los primeros meses de vida, incluso en el útero, de manera que frecuentemente se llama “EPQ infantil”. Los niños nacidos con EPQ recesiva autosómica normalmente desarrollan insuficiencia renal en el plazo de algunos años. La gravedad de la enfermedad varía. Los bebés con los peores casos mueren horas o días después de nacer. Los niños con una versión infantil pueden tener suficiente función renal para actividades normales durante algunos años. Las personas con la versión juvenil pueden vivir en su adolescencia y veintena y normalmente también sufrir problemas del hígado.

Los niños con EPQ recesiva autosómica muestran síntomas que incluyen hipertensión arterial, infecciones de las vías urinarias y micción frecuente. La enfermedad normalmente afecta al hígado, bazo y páncreas, y produce bajas cifras de células sanguíneas, venas varicosas y hemorroides. Debido a que la función renal es crucial para el desarrollo físico temprano, los niños con EPQ recesiva autosómica son normalmente más pequeños que el tamaño promedio.

En el diagnóstico de esta enfermedad, la ecografía del feto o bebé recién nacido puede revelar quistes en los riñones, pero no distingue entre los quistes de EPQ recesiva autosómica y dominante autosómica. Una ecografía de riñones de parientes puede ser útil para hacer el diagnóstico correcto. Por ejemplo, un padre o abuelo con quistes de EPQ dominante autosómica podría ayudar a confirmar el diagnóstico de EPQ dominante autosómica en un feto o niño. Es extremadamente raro, aunque no imposible, que una persona con EPQ recesiva autosómica sea padre. Debido a que la EPQ recesiva autosómica tiende a cicatrizar el hígado, la ecografía del hígado también ayuda en el diagnóstico.

Similar al diagnóstico de EPQ dominante autosómica, la EPQ recesiva autosómica también puede diagnosticarse definitivamente basándose en análisis de ADN.

La enfermedad renal quística adquirida (ERQA) es una forma no heredada de EPQ y tiende a producirse en los últimos años de vida. La ERQA frecuentemente se desarrolla en asociación con problemas renales a largo plazo (por ejemplo, daño renal y cicatrización), especialmente en pacientes que tienen insuficiencia renal y que han estado en diálisis durante un largo tiempo. Aproximadamente el 90 por ciento de las personas en diálisis durante 5 años desarrollan ERQA. Los pacientes con ERQA pueden tener cualquier enfermedad renal subyacente, tal como glomerulonefritis o la enfermedad renal producida por diabetes.

Los quistes de ERQA pueden sangrar. Así, el primer síntoma perceptible de ERQA es sangre en la orina, o hematuria. El diagnóstico de ERQA se confirma usando ultrasonidos, TAC o IRM de los riñones. Además, los tumores renales, que incluyen cáncer de riñón (renal), también pueden desarrollarse en personas con ERQA. Aunque el cáncer renal es raro, se produce al menos dos veces más frecuentemente en pacientes con ERQA que en la población general.

II. La exclusión de afecciones colestásticas

A. Afecciones colestásticas

Aunque es probable que diversas afecciones colestásticas conduzcan a fibrosis hepática, la presente invención no engloba el tratamiento/prevenición de fibrosis hepática en un paciente que ya padece una afección colestástica, tal como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria y colestasis intrahepática del embarazo, colestasis asociada a nutrición parenteral total, septicemia y fibrosis quística. Lo siguiente describe cómo excluir pacientes con estas afecciones colestásticas cuando se pone en práctica la presente invención.

B. Diagnóstico de afecciones colestásticas

Los síntomas típicos de una afección colestástica incluyen picor (prurito), fatiga, piel u ojos ictericos, incapacidad para digerir ciertos alimentos, náuseas, vómitos, heces pálidas, orina oscura y dolor abdominal del cuadrante superior derecho. El fallo orgánico puede producirse en casos de septicemia (pero no de la propia colestasis), y puede resultar eritema o fiebre en algunos casos de colestasis inducida por fármacos.

El diagnóstico de una afección colestástica se basa generalmente en la detección de niveles elevados de bilirrubina conjugada, fosfatasa alcalina, γ -glutamiltanspeptidasa (GGT), 5'-nucleotidasa, ácidos biliares y colesterol en la sangre de un paciente. Para cada una de las afecciones anteriormente nombradas, pueden aplicarse criterios de diagnóstico específicos.

La **cirrosis biliar primaria** (CBP) es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación y destrucción progresiva lenta de las pequeñas vías biliares dentro del hígado. La inflamación y destrucción interfieren con la secreción de bilis, producen cicatrización y con el tiempo conducen a cirrosis. En las fases tempranas de CBP, el principal problema es la formación de sustancias (como ácidos biliares, colesterol) en la sangre, que normalmente son eliminados en la bilis. Muchos pacientes con CBP no tienen síntomas de enfermedad y se diagnostican encontrando una anomalía en el análisis de sangre del hígado rutinario. El picor y la fatiga son síntomas comunes. Otros signos incluyen ictericia, depósitos de colesterol en la piel, acumulación de líquido en los tobillos y abdomen, y oscurecimiento de la piel. Varios otros trastornos están frecuentemente asociados a CBP. El más común es el funcionamiento alterado de las glándulas lacrimales y salivares, causando ojos o boca seca. También pueden estar presentes artritis y problemas de tiroides. Pueden desarrollarse cálculos renales y cálculos biliares. Pueden producirse ablandamiento y fragilidad de los huesos, que conducen a fracturas en las etapas finales de la enfermedad.

El diagnóstico de CBP se basa en varias indicaciones: el paciente puede tener síntomas (tales como picor) que sugieren daño de las vías biliares; pruebas de laboratorio, tales como la prueba de actividad de fosfatasa alcalina, pueden confirmar el diagnóstico. La prueba para anticuerpos antimitocondriales (AMA) es particularmente útil, ya que es positiva en casi todos los pacientes con CBP. Pocas veces, las vías biliares se radiografían para descartar posibilidades de otras causas de enfermedad de las vías biliares, tales como obstrucción. Una biopsia de hígado es útil en confirmar el diagnóstico y en dar información sobre la gravedad y grado del daño hepático.

Se han establecido criterios para un diagnóstico definitivo de CBP para identificar todos los pacientes con CBP clásica y excluir cualquier paciente con un diagnóstico cuestionable. Se hace un diagnóstico definitivo de CBP en un paciente que tiene los tres siguientes: pruebas de hígado colestásico (fosfatasa alcalina y GGT elevada superior a ALT y AST); AMA positivo a un título superior o igual a 1:40; y lectura positiva de un diagnóstico o biopsia de hígado compatible.

En un paciente que padece **colangitis esclerosante primaria** (CEP), las vías biliares dentro y fuera del hígado se

inflaman y cicatrizan. A medida que aumenta la cicatrización, las vías se bloquean, que conduce a la formación de bilis en el hígado y daña las células del hígado. Se ha especulado sobre diversas causas de CEP, que incluyen infección bacteriana o viral o anomalías del sistema inmunitario.

Los principales síntomas de CEP son picor, fatiga e ictericia. Una infección en las vías biliares puede producir escalofríos y fiebre. La CEP se diagnostica mediante colangiografía, que implica inyectar colorante en las vías biliares y tomar una imagen de rayos X. La colangiografía puede realizarse como un procedimiento endoscópico (colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, ERCP), mediante radiología o cirugía, o con imagen por resonancia magnética (IRM).

Colestasis inducida por fármacos se refiere al bloqueo del flujo de bilis del hígado debido a cierta medicación. Muchos fármacos pueden producir este tipo de colestasis. Algunos culpables más comunes incluyen: sales de oro, nitrofurantoína, esteroides anabolizantes, anticonceptivos orales, clorpromazina, proclorperazina, sulindaco, cimetidina, eritromicina, tolbutamida, imipramina, ampicilina, y otros antibióticos basados en penicilina. Otras medicaciones también pueden producir inesperadamente colestasis en algunos individuos. Los síntomas de la colestasis inducida por fármacos son similares a otras afecciones colestásicas, concretamente, picor, piel u ojos ictericos, orina muy oscura, heces muy pálidas, fiebre o eritema de sensibilidad a los fármacos, dolor abdominal del cuadrante superior derecho, y náuseas/vómitos. Se hace un diagnóstico de colestasis inducida por fármacos basándose en el análisis de sangre que revela elevados niveles de bilirrubina y fosfatasa alcalina, además de una revisión cuidadosa de los antecedentes médicos.

La **colestasis hereditaria** es una forma heredada de afección colestásica, una enfermedad recesiva autosómica. Con muchos síntomas similares a aquellos del tipo no hereditario de colestasis, esta afección se diagnostica y distingue del tipo no hereditario basado en la aparición temprana de los síntomas y antecedentes médicos familiares. La prueba genética es el procedimiento más fidedigno para identificar pacientes con esta afección. Por ejemplo, se han identificado ATP8B1 (FIC1) y ABCB 11 (BSEP) como dos genes que participan en la colestasis hereditaria (véase, por ejemplo, van Mil et al., Semin Liver Dis. 21:535-44, 2001; Chen et al., J Pediatr. 140:119-24, 2002).

La **colestasis intrahepática del embarazo** (CIE) es una afección colestásica observada en mujeres embarazadas. Las mujeres con CIE pueden mostrar síntomas tales como anorexia, fatiga, heces grasientas, orina oscura y molestias epigástricas. Las infecciones de las vías urinarias son más comunes en mujeres con CIE que en mujeres embarazadas no afectadas. Finalmente, puede desarrollarse una deficiencia de vitamina K en mujeres que tienen un desarrollo prolongado de CIE. El diagnóstico de CIE se basa en el análisis de sangre que muestra niveles elevados de ácidos biliares y ciertas enzimas hepáticas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, GGT, 5'-nucleotidasa). La presencia de picor sin un eritema primario también ayuda a confirmar el diagnóstico. Raramente se necesita una biopsia del hígado o ultrasonidos para establecer el diagnóstico.

La **colestasis asociada a nutrición parenteral total** es un tipo de colestasis que se produce en pacientes que reciben el 100 % de su nutrición parenteralmente. Aunque las características clínicas pueden ser similares a otras afecciones colestásicas, estos pacientes son fáciles de identificar ya que se les está dando nutrición líquida mediante un catéter intravenosamente.

Una afección potencialmente mortal, **septicemia**, también se denomina una "infección de la corriente sanguínea". Esta afección refleja la respuesta del cuerpo a una infección y caracteriza la presencia de organismos infecciosos (tales como bacteria, virus, hongo, levadura, parásito, etc.) o sus toxinas en la sangre o en otro tejido del cuerpo. La septicemia puede asociarse a síntomas clínicos de enfermedad sistémica, tales como fiebre, escalofríos, malestar general, tensión arterial baja y vigilia mental reducida. El diagnóstico de septicemia se basa en cultivos de sangre para detectar la presencia de bacterias o levaduras, que pueden haberse propagado de otro sitio en el cuerpo.

La **fibrosis quística** (FQ), producida por un defecto genético heredado de un modo recesivo autosómico, es una enfermedad crónica, progresiva y frecuentemente mortal de las glándulas mucosas del cuerpo. Las características clínicas de esta enfermedad incluyen: infecciones crónicas de los pulmones, enfisema, insuficiencia respiratoria progresiva, problemas gastrointestinales (incluyendo páncreas y hígado), insuficiencia pancreática (sin secreción de tripsina y otras enzimas digestivas en el intestino), obstrucción intestinal al nacer, deficiencia continua de enzimas pancreáticas, obstrucción de las vías biliares, constricción del conducto colédoco, cirrosis del hígado, episodios recurrentes de dolor en la parte inferior derecha del abdomen, adenocarcinoma del íleon, problemas del corazón tales como cardiopatía pulmonar, y problemas reproductivos tales como infertilidad masculina. Las pruebas de laboratorio son necesarias para diagnosticar FQ. Un paciente con FQ frecuentemente muestra resultados de la prueba de sudor positivos, carece de tripsina en las heces (y alto nivel de tripsina en suero sanguíneo). Se ha identificado el gen implicado en la FQ, así la prueba de ADN es la herramienta de diagnóstico más fidedigna para esta afección.

III. Ligandos de FXR

A. Ensayos para identificar ligandos de FXR

5 Se han establecido varios sistemas de ensayo para identificar ligandos de FXR, particularmente aquellos con alta potencia para activar FXR. Por ejemplo, un compuesto comparativo candidato puede probarse en un ensayo de reclutamiento de co-reguladores libres de células para determinar si el compuesto es un ligando activante de FXR y su eficacia. Brevemente, este sistema utiliza la unión entre FXR y una proteína o péptido co-regulador. Los co-reguladores son proteínas nucleares conocidas por ser reclutadas para FXR tras la unión de FXR a su ligando (por ejemplo, SRC1). El reclutamiento dependiente de ligando de una proteína o péptido co-regulador para FXR se mide por diversos procedimientos tales como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización por fluorescencia o ensayos de proximidad luminiscente. Cualquier FXR humano o FXR de rata puede usarse para este fin. Para una descripción detallada de este sistema de ensayo véanse, por ejemplo, Maloney et al., J. Med. Chem., 43:2971-2974, 2000; Pellicciari et al., J. Med. Chem., 45:3569-3572, 2002; Cui et al., J. Bio. Chem., 277:25963-25969, 2002; y Jones et al., *Methods Enzymol.*, 364:53-71, 2003.

Alternativamente, los compuestos comparativos candidatos pueden probarse para su potencia de unión a FXR en ensayos libres de células tales como filtración en gel o ensayos de proximidad de centelleo en los que se usan radioligandos, véase, por ejemplo, Jones et al., *Methods Enzymol.*, 364:53-71, 2003.

Otro sistema de ensayo útil para probar un compuesto para sus propiedades de ligando de FXR es un modelo de célula completa (por ejemplo, en células estrelladas hepáticas) que implican un gen indicador (tal como luciferasa o β -galactosidasa) controlada por un elemento regulador de la transcripción sensible a un FXR activado por ligando. Tanto de FXR humano como de rata puede usarse en el ensayo. El nivel de actividad indicadora indica la eficacia de un compuesto de prueba como ligando activante de FXR. Para una descripción detallada de un sistema de selección basado en un gen indicador tal, véase, por ejemplo, Goodwin et al., *Mol. Cell.*, 6:517-526, 2000; Cui et al., *J. Bio. Chem.*, 277:25963-25969, 2002.

En cualquiera de las dos clases de sistemas de ensayo descritas anteriormente, la potencia de un ligando de FXR particular se mide por su CE_{50} (es decir, la concentración de un ligando necesaria para producir el 50 % del valor máximo de un efecto medido) demostrada durante el ensayo. Los ligandos de FXR adecuados para su uso en la presente invención son aquellos con una CE_{50} no superior a 5 μ M, preferentemente no superior a 2 μ M, más preferentemente no superior a 1,5 μ M, y lo más preferentemente no superior a 1 μ M, como se determina en un ensayo de FXR libre de células o un ensayo de transactivación basado en células usando un FXR humano o de rata según los procedimientos descritos en las referencias citadas anteriormente.

Además, se establecen procedimientos para el cribado de un ligando específico para FXR y no para otros receptores nucleares, particularmente RXR. Por ejemplo, el documento WO 00/76523 describe un sistema de ensayo en el que el RXR recombinante se muta por una única mutación puntual (RXR_{D322P}) para eliminar el sitio de unión al ligando de RXR, de forma que el uso del heterodímero de FXR-RXR_{D322P} permite la identificación no ambigua de compuestos que pueden modular la actividad de FXR.

Los compuestos de estructuras químicas similares o distintas han demostrado su capacidad para unirse específicamente a FXR. Por ejemplo, los documentos WO00/40965, WO00/76523, WO03/015771, WO03/015777, WO03/016280, WO03/016288, WO03/030612 y WO03/043581 proporcionan una lista larga de tales compuestos como posibles candidatos para ligandos activantes de FXR.

B. Ejemplos de ligandos activantes de FXR conocidos

Una lista creciente de ligandos específicos de FXR conocidos incluye ácido quenodesoxicólico (CDCA), 6ECDCA, GW4064, 6 α -MeCDCA, 6 α -PrCDCA, fexaramina, ácido litocólico (LCA), colato (CA), ácido ursodesoxicólico (UDCA) y ácido desoxicólico (DCA) (véase, por ejemplo, Pellicciari et al., *J. Med. Chem.*, 45:3569-3572, 2002). Entre los ligandos de FXR, algunos tienen una CE_{50} menor, por ejemplo, no superior a 5 μ M, preferentemente no superior a 2 μ M, más preferentemente no superior a 1,5 μ M, y lo más preferentemente no superior a 1 μ M, cuando se prueban en un ensayo libre de células o un ensayo de transactivación basado en células usando un FXR humano o de rata. Un ligando de FXR que presenta una CE_{50} no superior a 0,2 μ M o no superior a 0,1 μ M, tal como 6ECDCA, es particularmente eficaz para el procedimiento de tratamiento de la presente invención (véase, por ejemplo, Fiorucci et al., *Gastroenterology* 127:1497-1512, 2004). Estos ligandos de FXR pueden sintetizarse químicamente según procedimientos muy conocidos o algunos de ellos pueden comprarse de proveedores comerciales tales como Sigma-Aldrich (USA), Erregierre (Italia) y Hengchanlong Pharmaceuticals (China).

IV. Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de 6-ECDCA para tratar fibrosis en aplicaciones tanto profilácticas como terapéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos.

Formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Para una breve revisión de procedimientos para la administración de fármacos véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Las vías citadas de administración de las composiciones farmacéuticas son oral, subcutánea e intravenosa a dosis diarias de aproximadamente 0,01 - 5000 mg, preferentemente 5 - 500 mg, del ligando de FXR para un ser humano adulto de 70 kg por día. Las dosis apropiadas pueden administrarse en una dosis diaria única o como dosis divididas presentadas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen 6-ECDCA, se usan vehículos inertes y farmacéuticamente aceptables. El vehículo farmacéutico puede ser tanto sólido como líquido. Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos y supositorios. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar de diluyentes, aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes o agentes disgregantes comprimidos; también puede ser un material de encapsulamiento.

En polvos, el vehículo es generalmente un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En comprimidos, el principio activo (ligando de FXR) se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones adecuadas y compactadas en la forma y tamaño deseados.

Para preparar composiciones farmacéuticas en forma de supositorios, una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao se funde primero y el principio activo se dispersa en su interior por, por ejemplo, agitación. Entonces, la mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y solidificar.

Los polvos y comprimidos contienen preferentemente entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 70 % en peso del principio activo. Vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulamiento como vehículo que proporciona una cápsula en la que el 6-ECDCA (con o sin otros vehículos) está rodeado por el vehículo, de forma que el vehículo está así en asociación con el compuesto. De una manera similar, también pueden incluirse sellos. Pueden usarse comprimidos, polvos, sellos y cápsulas como formas de dosificación sólidas adecuadas para administración por vía oral.

Composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, disoluciones adecuadas para administración oral o parenteral, suspensiones y emulsiones adecuadas para administración por vía oral. Disoluciones estériles acuosas del componente activo o disoluciones estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, agua tamponada, solución salina, PBS, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Las disoluciones estériles pueden prepararse disolviendo el componente activo en el sistema de disolventes deseados, y pasando a continuación la disolución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarse o, alternativamente, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado bajo condiciones estériles. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tal, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9, y lo más preferentemente de 7 a 8.

Las composiciones farmacéuticas que contienen 6-ECDCA pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece fibrosis de un órgano en el que se expresa FXR, en una cantidad suficiente para prevenir, curar, invertir, o al menos ralentizar o detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y el peso y estado general del paciente, pero generalmente oscilan de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg del compuesto por día para un paciente de 70 kg, usándose más comúnmente dosificaciones de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto por día para un paciente de 70 kg.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas que contienen 6-ECDCA se administran a un paciente susceptible a o de otro modo en riesgo de desarrollar fibrosis en un órgano en el que se expresa FXR, por ejemplo, hígado, riñón, intestino, etc., en una cantidad suficiente para retardar o prevenir la aparición de los

síntomas fibróticos. Se define que una cantidad tal es una “dosis profilácticamente eficaz”. En este uso, las cantidades precisas del ligando de FXR dependen de nuevo del estado de salud y peso del paciente, pero generalmente oscilan de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg para un paciente de 70 kg por día, más comúnmente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg para un paciente de 70 kg por día.

Administraciones individuales o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con niveles de dosis y patrón que se selecciona por el médico práctico. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de un ligando de FXR suficiente para inhibir eficazmente la fibrosis en el paciente, tanto terapéuticamente como profilácticamente.

V. KITS

La invención también proporciona kits para prevenir, tratar o invertir la fibrosis según el procedimiento de la presente invención. Los kits normalmente incluyen una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un ligando específico para FXR y que puede estimular la actividad transcripcional de FXR, además de material informativo que contiene instrucciones de cómo dispensar la composición farmacéutica, que incluye descripción del tipo de pacientes que puede tratarse (por ejemplo, una persona en riesgo de desarrollar fibrosis hepática en un órgano en el que se expresa FXR, pero que no padece una afección colestásica), el programa (por ejemplo, dosis y frecuencia) y la vía de administración, y similares.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solo y no a modo de limitación. Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para dar resultados esencialmente similares.

Ejemplo 1: Supresión mediada por ligando de FXR de la expresión de colágeno tipo $\alpha 1$ en células estrelladas hepáticas (CEH)

La fibrosis hepática que conduce con el tiempo a cirrosis es un proceso de cicatrización del hígado que incluye componentes de tanto elevada fibrogénesis como contracción de heridas. Las células estrelladas hepáticas (CEH) con reconocidas como el principal tipo de células responsables de la fibrogénesis del hígado. En enfermedad del hígado crónica, las CEH adquieren un fenotipo “activado”, que incluye elevada proliferación, contractilidad, fibrogénesis, degradación de la matriz, quimiotaxis y liberación de citocinas (Friedman, J. Biol. Chem. 275:2247-2250, 2000). El presente paradigma propone que el estado activado de CEH se logra mediante el microentorno transformado, que está soportado en parte por los factores de crecimiento factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante (TGF)- β , productos intermedios de oxígeno reactivo liberados por hepatocitos y por la matriz fibrilar generada por CEH previamente activadas, además de en respuesta a estimulación con trombina y su receptor tipo I (receptor 1 activado por proteinasa, o PAR-1) (Fiorucci, et al., Hepatology, 39:365-75, 2004). El tipo α -1 de colágeno I (α 1) representa el principal subtipo de colágeno encontrado en el hígado normal y cirrótico (Friedman, J. Biol. Chem., 275:2247-2250,2000). El colágeno α 1 se genera en el hígado fibrótico y cirrótico por CEH activadas.

Los ácidos biliares actúan de moléculas de señalización que regulan su propia biosíntesis y transporte uniéndose a y activando el receptor X farnesiloide (FXR), también conocido como NR1H4, y el receptor de ácido biliar (BAR), un receptor nuclear expresado en tejidos expuestos a ácidos biliares, tales como hígado, intestino, vesícula biliar y riñón. El FXR altera la transcripción uniendo secuencias de ADN compuestas de dos repeticiones invertidas por un nucleótido (IR-1) como heterodímero con el receptor de ácido 9-cis-retinoico (9-cis-RA) (RXR, también conocido como NR2B1). En hepatocitos, tras la activación, FXR inicia una transcripción de una cohorte de genes que sirve para reducir la concentración de ácidos biliares dentro del hepatocito. Específicamente, el FXR activado induce la expresión de los genes que codifican BSEP, proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos (MDR3; ABCB4) y MRP2. Además, la activación de FXR por tanto sus ligandos que se producen naturalmente (por ejemplo, ácido quenodesoxicólico, CDCA) como los ligandos sintéticos (por ejemplo, 6ECDCA y GW4064) conduce a una represión de la retroalimentación del polipéptido co-transportador de Na^+ /taurocolato (NTCP; SLC10A1), CYP7A1 y CYP8B1. Estos genes codifican colesterol 7 α -hidroxilasa y esterol 12 α -hidroxilasa, ambos de los cuales son fundamentales para la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol. La supresión dependiente de FXR de CYP7A1 está mediada por el represor transcripcional, componente heterodímero corto (SHP; NR0B2), un receptor nuclear atípico que carece de un dominio de unión a ADN. Así, tras la activación, FXR induce directamente la expresión de SHP, que a su vez interacciona con el homólogo 1 del receptor del hígado (LRH-1; NR5A2), un regulador positivo conocido de CYP7A1 y reprime su actividad transcripcional. Los estudios realizados en ratones que alojan un gen SHP afectado han confirmado la importancia de la cascada de FXR-SHP-LRH-1 en la supresión de CYP7A1 (véase, por ejemplo, Forman et al., Cell 81:687-693, 1995; Seol et al., Mol. Endocrinol. 9:72-85, 1995; Sinal et al., Cell 102:731-744, 2000; Ananthanarayanan et al., J. Biol. Chem., 276: 28857-28865, 2001; Holt et al., Genes Dev., 17:1581-91, 2003; Kast et al., J. Biol. Chem., 277:2908-2915, 2002; Goodwin et al., Mol. Cell 6:517-526, 2000; y Lu et al., Mol. Cell 6:507-515, 2000).

Los objetivos del estudio presentado más adelante son: 1) para demostrar si CEH expresan FXR; 2) para demostrar si los ligandos de FXR modulan la expresión y síntesis de colágeno $\alpha 1$ *in vitro*; y 3) para definir productos intermedios moleculares de este efecto. Se usaron dos tipos de CEH en este estudio, tanto células recientemente aisladas en cultivos primarios como una línea celular inmortalizada (CEH-T6) obtenida de CEH de rata.

Los resultados, como se muestran en la Figura 1, demuestran que tanto los cultivos primarios de CEH como CEH-T6 expresan FXR, como se evalúa midiendo ARNm (Panel a) por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y proteína por análisis de transferencia Western (Panel b). El Panel b demuestra que la cantidad de FXR en CEH aumenta con el tiempo durante el cultivo y su aumento es paralelo a la expresión de α -actina de músculo liso (α SMA), un marcador de diferenciación de CEH en células similares a miofibroblastos. Así, mientras que las CEH adquieren su fenotipo diferenciado, también expresan FXR. De acuerdo con esto, la expresión de FXR también se detectó en CEH-T6.

Entonces se evaluó si las CEH expresan genes que son dianas transcripcionales de FXR conocidas. Como se muestra en la Figura 2 Panel a, la expresión de NTCP, BSEP, CYP7A1 y SHP se detectó en CEH. Además, como se muestra en la Figura 2 Panel b, la expresión de estos genes en CEH está regulada por ligandos de FXR. La RT-PCR cuantitativa mostrada en la Figura 2b ilustra que la exposición a 6ECDCA, un ligando de FXR sintético (a una concentración de 1 μ M) y a CDCA, un ligando de FXR natural (a una concentración de 20 μ M) produce un aumento de 2 veces del ARNm de SHP y BSEP y una reducción del 50-70 % del ARNm de NTCP y CYP7A1.

Como se ilustra en la Figura 3a, la exposición de CEH a los ligandos de FXR 6ECDCA (1 μ M), CDCA (20 μ M) y GW4064 (100 μ M) reduce la expresión del colágeno tipo I como medida evaluando la expresión de ARNm de $\alpha 1$ por RT-PCR y RT-PCR cuantitativa. Estas observaciones se han confirmado por análisis de transferencia Northern, como se muestra en la Figura 3b.

El efecto inhibitorio que los ligandos de FXR ejercen sobre la síntesis de $\alpha 1$ colágeno *in vitro* no está relacionado con la inhibición de la proliferación de CEH o inducción de muerte de CEH, ya que, como se ilustra en la Figura 4a-c, 6ECDCA no previene la proliferación de CEH inducida por trombina, PDGF y TGF $\beta 1$, como se evalúa determinando la incorporación de [3 H]-timidina (Paneles a y b) o la cifra de células (Panel c). Además, la exposición del ligando de FXR no produce ninguna apoptosis de CEH (Panel d).

Como se ilustra en la Figura 5, los ligandos de FXR también inhiben la liberación de colágeno $\alpha 1$ como se mide determinando concentraciones de hidroxiprolina en sobrenadantes de células, una medida de liberación de colágeno de CEH.

Debido a que el gen $\alpha 1$ carece de un IR que pueda usarse por FXR para unirse al promotor de $\alpha 1$, los presentes inventores han investigado mediadores que participan en la inhibición de la expresión de $\alpha 1$ inducida por ligandos de FXR en CEH y encontrado pruebas de que la inducción de SHP se requiere estrictamente por los ligandos de FXR con el fin de inhibir la expresión de $\alpha 1$. De hecho, como se ilustra en la Figura 6, la expresión de SHP en exceso en CEH-T6 suprime la expresión de $\alpha 1$ en CEH-T6 en reposo como se mide por QRT-PCR (Panel a) y análisis de transferencia Northern (Panel b), y previene la inducción de $\alpha 1$ producida por trombina, TGF $\beta 1$ y PDGF.

A diferencia, como se ilustra en la Figura 7, la supresión de la expresión de SHP por ARN interferente pequeño (ARNip) específico invirtió la inhibición de ARNm de $\alpha 1$ producida por ligandos de FXR (Panel a). El silenciamiento de SHP también previno la inhibición de la expresión de $\alpha 1$ inducida por ligandos de FXR en CEH tratadas con factores mitogénicos tales como trombina, TGF y PDGF (Panel 7c). Estos datos se confirmaron por análisis de transferencia Northern.

En resumen, los datos presentados en el presente documento demuestran que CEH, las células que producen colágeno en el hígado y son responsables de la fibrosis hepática, expresan FXR y que la exposición de estas células a ligandos naturales o sintéticos de FXR regula por disminución el ARNm de colágeno $\alpha 1$ y la secreción por un mecanismo que implica la inducción de SHP.

Materiales y procedimientos

PCR en tiempo real

Se realizó la cuantificación de la expresión genes por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-RT-PCR). Se aisló ARN total (reactivo TRIzol-Invitrogen) de células estrelladas hepáticas de rata (CEH) o la línea celular T6 se dejó morir durante 24 h y se estimuló con ligando de FXR 6ECDCA 1 μ M durante 18 horas. Se purificó un μ g de ARN del ADN genómico por tratamiento con DNasa I (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente. La DNasa I se inactiva a 95 $^{\circ}$ C durante 5 minutos en presencia de EDTA 2,5 mM. El ARN se transcribió de forma inversa aleatoria con Superscript III (Invitrogen) en 20 μ l de volumen de reacción. Se usaron cien ng de molde en 25 μ l de volumen final la reacción de PCR en tiempo real contuvo los siguientes reactivos: 0,3 μ M de cada cebador y 12,5 μ l de 2X SYBR Green PCR Master MIX (Bio-Rad). Todas las reacciones se realizaron por triplicado y las

condiciones de los ciclos térmicos fueron: 2 minutos a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, y 60 °C durante 30 segundos en iCycler iQ instrument (Biorad, Hercules, CA). El valor medio de los duplicados para cada muestra se calculó y se expresó como ciclo umbral (CT: número de ciclos a los que cada reacción de PCR alcanza un umbral de fluorescencia predeterminado, fijado dentro del intervalo lineal de todas las reacciones). La cantidad de expresión génica se calculó entonces como la diferencia (ΔC_T) entre el valor de C_T de la muestra para el gen diana y el valor de C_T medio de esa muestra para el control endógeno (Actina). La expresión relativa se calculó como la diferencia ($\Delta\Delta C_T$) entre los valores de ΔC_T de la muestra de prueba y de la muestra de control (WT) para cada gen diana. Se expresó el valor de cuantificación relativo y se muestra como $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Todos los cebadores de PCR se diseñaron usando el software PRIMER3-OUTPUT usando datos de secuencias publicados de la base de datos NCBI. Cebadores: SHP de rata: 5' cctggagcagccctcgt 3' y 5' aacactgtatgcaaaccgagga 3'; FXR de rata: 5' tggactcatcacgcaaacagaga 3' y 5' gtctgaaacccctggaagtctttt 3'; Col1A1 de rata: 5' tctccaagaggcagggttc 3' y 5' ggtagcttcggctcatgc 3'; c-Jun de rata: 5' gaagcagagcatgaccttga 3' y 5' gacgtgagaagggtccgagtt 3'; JunD de rata: 5' atcttgggctgctcaaac 3' y 5' gccacctagggttagaggaa 3'; actina de rata: 5' ttaatgtcacgcacgatttc 3' y 5' taccactggcattgtgatgg 3'.

Análisis de transferencia Northern

Se determinaron los niveles de colágeno I alfa I por análisis de transferencia Northern de muestras de ARN total preparadas a partir de células estrelladas hepáticas primarias (CEH), líneas celulares T6 y HepG2. Para este fin, se resolvieron 10 µg de ARN total por electroforesis en gel (1 % de agarosa que contiene formaldehído 0,98 M). Inmediatamente después de la electroforesis, el ARN se transfirió a una membrana de nailon positivamente cargada (Amersham Life Sciences corp.). El ARN transferido se reticuló a la membrana por luz UV. La membrana se hibridó previamente durante 4 horas en 6X SSC y 2 % de SDS y posteriormente se hibridó a 65 °C durante 20 h con sondas marcadas con ³²P para colágeno I alfa I o GAPDH (como control interno). Se lavaron las membranas hibridadas a una rigurosidad final de 1X SSC, 1,0 % de SDS a 65 °C y se expusieron a película AR-2 de Kodak a -80 °C. Los datos se expresan con respecto a GAPDH interno.

Análisis de transferencia Western

Se privaron de suero cultivos confluentes de líneas celulares CEH o T6 durante 48 h y a continuación se incubaron durante 18 h a 37 °C en DMEM con o sin tanto trombina (10 unidades/ml), 6ECDCA (1 µM). Se prepararon lisados totales por solubilización de células en tampón de muestra SDS-Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 10 % de glicerol, 2 % de SDS, 0,015 % de azul de bromofenol) y 3-4x10⁵ células se sometieron a electroforesis sobre geles de poliacrilamida al 10 %. Entonces se transfirieron las proteínas separadas a membranas de nitrocelulosa (BioRad), y las membranas se sondaron con anticuerpos primarios para c-Jun, JunD, SHP, FXR, αSMA (Santa Cruz Biotechnology). Se añadió el conjugado de anti-inmunoglobulina G-peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad) como anticuerpo secundario, y se visualizaron bandas de proteínas específicas usando quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham corp.) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Ensayo de co-inmunoprecipitación

Para preparar extractos para la inmunoprecipitación, células CEH primarias, o T6 y T6 que expresan en exceso células SHP, se lavaron primero tres veces con PBS helado y a continuación se lisaron por sonicación en tampón E1A (HEPES 50 mM, pH 7, NaCl 250 mM, 0,1 % de NP-40, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 mg/ml de leupeptina, 1 mg/ml de aprotinina y 1 mg/ml de pepstatina A). Los lisados se clarificaron de detritos de membrana por centrifugación a 13.000 g durante 10 min, y las concentraciones de proteína en los extractos de sobrenadante se ajustaron a 1 mg/ml. Se inmunoprecipitaron proteínas totales de uno a cuatro mg de o 10⁷ lisados celulares con anti-SHP, anti-JunD o anti-c-Jun (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) o anti-CD28 como anticuerpo sin correlacionar (control) durante la noche a +4 °C en presencia de 10 µl de proteína A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotechnology, Piscataway, New Jersey). El inmunoprecipitado resultante se lavó 5 veces con E1A y a continuación se sometió a SDS-PAGE y se inmunotransfirió con anticuerpos (inversos) usados en inmunoprecipitados.

Transducción del gen SHP mediado por vector viral en células T6

Se clonó la secuencia codificante de SHP de hepatocito primario de rata. Brevemente, un µg de ARN total se retrotranscribió con transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) en 20 µl de reacción usando hexámeros aleatorios 0,3 µM. Se usaron doscientos de molde de ADNc para amplificar la secuencia codificante de SHP con ADN polimerasa Pfu (Stratagene) en 50 µl de reacción de PCR usando cebadores específicos 5'-CATGAGCACCAGCCAACCAG-3' y 5'-CTGGAACAGGTCACCTGAGC-3'. La secuencia codificante de SHP se clonó primero en el vector pCR2.1 (clonación TOPO-TA - Invitrogen) y a continuación se sub-clonó en el vector retroviral PINCO. Se cultivaron células empaquetadoras modificadas 293T (ΦNX) en medio DMEM con 10 % de SBF y se transfectaron transitoriamente con fosfato de calcio con la quimera PINCO-SHP y PINCO solo como control negativo. 48 horas después de la transfección se recuperó el sobrenadante viral y se usó para infectar células T6. El vector PINCO conduce el gen EGFP (proteína de fluorescencia verde esmeralda) que permite la separación de las células infectadas (verde) de las células no infectadas. Se obtuvo una población pura de las células T6 que expresa SHP por separación en FACS

(citómetro de flujo activado por fluorescencia). La expresión de SHP se detectó por análisis de transferencia Western.

Ejemplo 2: La administración de ligandos de FXR produce fibrosis reducida en ratas con vías biliares ligadas (BDL)

BDL es un modelo de colestasis crónica. En este modelo, sin embargo, la fibrosis hepática progresiva conduce al desarrollo de cirrosis 3-4 semanas después de la ligadura y, por tanto, también se usa como modelo de fibrosis hepática (Kountouras et al., Br. J. Exp. Patol., 65:305-311, 1984). Debido a que este modelo permite a los inventores probar el efecto de remedios antifibróticos, los presentes inventores administraron ratas 3 días después de BDL con 6ECDCA a la dosis de 1 y 3 mg/kg por vía oral por día durante 2 semanas. El estudio del protocolo fue autorizado por el Comité de Estudios en Animales de la Universidad de Perugia. Se indujo fibrosis hepática en ratas macho Wistar de 8-9 semanas de edad (Charles River, Monza, Italia) por BDL. Se realizó BDL como se ha descrito originalmente por Kountouras et al. (Br. J. Exp. Patol. 65: 305-311; 1984). Una semana después de BDL, las ratas se aleatorizaron para recibir uno de los siguientes tratamientos, placebo (inyección subcutánea de 100 µl de PBS) o 6ECDCA a las dosis 1 y 3 mg/kg/día por vía oral. A continuación, los animales se siguieron durante 3 semanas.

Al final del estudio, las ratas supervivientes se sacrificaron bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p) y se sangraron terminalmente mediante punción cardíaca. La sangre se centrifugó a 7250 g durante 20 minutos a 4 °C; el suero resultante se almacenó a 20 °C hasta el análisis (un máximo de 2 semanas). En el momento de la muerte, se confirmó que la ligadura de las vías biliares estaba intacta con dilatación proximal del conducto colédoco. Después de la determinación del peso, los especímenes de hígados se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C para el análisis posterior. Para el examen histológico, porciones de los lóbulos derecho e izquierdo del hígado (10-15 mg/cada uno) de cada animal se fijaron en 10 % de formalina, se incorporaron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina o rojo sirio. Para la tinción con rojo sirio, las secciones se incubaron durante 30 minutos en 0,1 % de rojo sirio F3B (Sigma Chemical Co.) que contenía ácido pícrico saturado y 0,1 % de Fast Green. Después de aclarar dos veces con agua destilada, las secciones se deshidrataron brevemente con 70 % de etanol y se cubrieron con cubreobjetos. La densidad superficial del colágeno de las muestras de hígado se cuantificó usando un sistema de análisis de imágenes computerizado como se ha descrito previamente (Imagen Acquisition System Ver. 005, Delta Sistemi, Roma, Italia). La densidad superficial del colágeno en especímenes cegados se midió a un aumento de visualización de la pantalla de vídeo según el procedimiento descrito por Rockey y Chung (Rockey, D.C., Chung, J.J. J. Clin. Invest. 98:1381-1388, 199) y se expresó como un porcentaje (la relación del área superficial de colágeno por superficie de campo analizado total). Se usó el promedio de la puntuación tomada de 10 campos al azar para generar una única puntuación para cada hígado del animal.

Como se ilustra en la Figura 8, la administración *in vivo* de 6ECDCA produjo reducción significativa de la deposición de colágeno en el hígado como se mide por puntuación de tinción con rojo sirio (Figura 8a), contenido de hidroxiprolina del hígado (Figura 8b) y ARNm de $\alpha 1$ del hígado por RT-PCR (Figura 8c). El análisis cuantitativo de colágeno teñido con rojo sirio en el hígado demostró una reducción en el contenido de colágeno del hígado del 62 % después del tratamiento con 6ECDCA. En la Figura 8, los datos son media $\pm$ EE; * indica $P < 0,01$ frente a operado de referencia y **, $P < 0,01$ frente a BDL. "Central" y "porta" se refieren a la vena central y las áreas del espacio porta, además del área parénquima que rodea inmediatamente estos espacios. "Todo" se refiere a todas las áreas hepáticas, como se visualiza bajo aumentos bajos.

Ejemplo 3: Administración de ligandos de FXR para inhibir la fibrosis

La presente invención puede ponerse en práctica según el siguiente ejemplo. Una paciente de 58 años de edad, que pesa aproximadamente 60 kg, padece infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) y está buscando tratamiento para inhibir el desarrollo y la progresión de la fibrosis hepática. Se considera que los niveles en suero sanguíneo del paciente de fosfatasa alcalina, GGT y 5'-nucleotidasa están dentro de un intervalo que no es indicativo de una afección colestásica. Después de la evaluación del estado de fibrosis hepática y la estatificación realizando biopsia del hígado y/o medición de marcadores no invasivos del suero, se recetan comprimidos que contienen 6ECDCA al paciente para administración por vía oral en un programa de dos veces al día. Se toma un total de 300 mg de 6ECDCA cada día. El paciente está en este programa durante el resto de su vida. El desarrollo o progresión de la fibrosis hepática puede monitorizarse basándose en la medida de marcadores del suero o analizando biopsia del hígado.

Todas las patentes, solicitudes de patente y otras publicaciones citadas en la presente solicitud se incorporan por referencia en la totalidad para todos los fines.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es ácido 6-etil-quenodesoxicólico para su uso para inhibir la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica, en el que la fibrosis que va a inhibirse se produce en un órgano en el que se expresa FXR.
5
2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que la afección colestásica se define como que tiene niveles en suero anormalmente elevados de fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) y 5'-nucleotidasa.
3. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que la afección colestásica se define adicionalmente como que presenta al menos un síntoma clínico.
10
4. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el síntoma es picor (prurito).
5. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que la fibrosis está seleccionada del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis intestinal.
15
6. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que la afección colestásica está seleccionada del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria y colestasis intrahepática del embarazo.
20
7. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto no padece una afección colestásica asociada a una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer hepático y biliar primario, cáncer metastásico, septicemia, nutrición parenteral total crónica, fibrosis quística y enfermedad hepática granulomatosa.
25
8. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene fibrosis hepática asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante; enfermedad hepática alcohólica (EHA); enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA); esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); enfermedades del hígado inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmunitaria; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de α 1-antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; trastorno vascular asociado a síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva, o trombosis de la vena porta; y fibrosis hepática congénita.
30
35
9. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene fibrosis intestinal asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis después de radiación y colitis microscópica.
40
10. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene fibrosis renal asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.
45

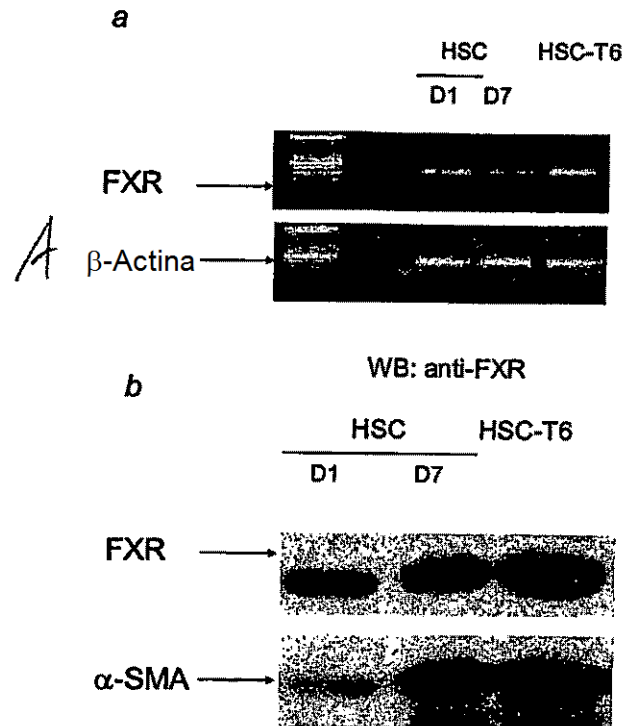


Figura 1

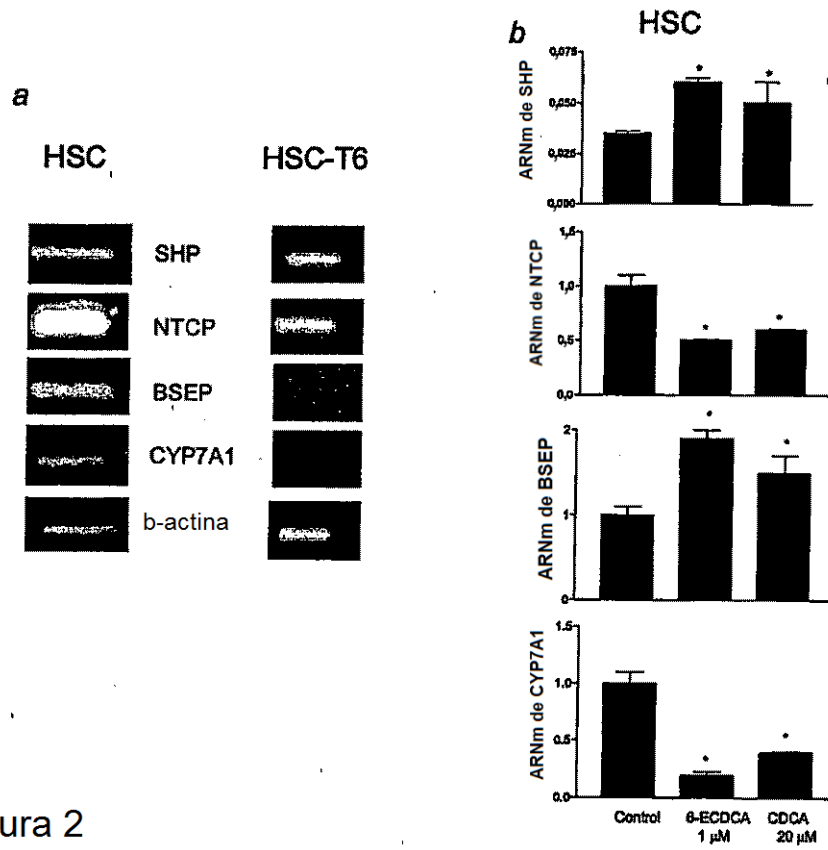


Figura 2

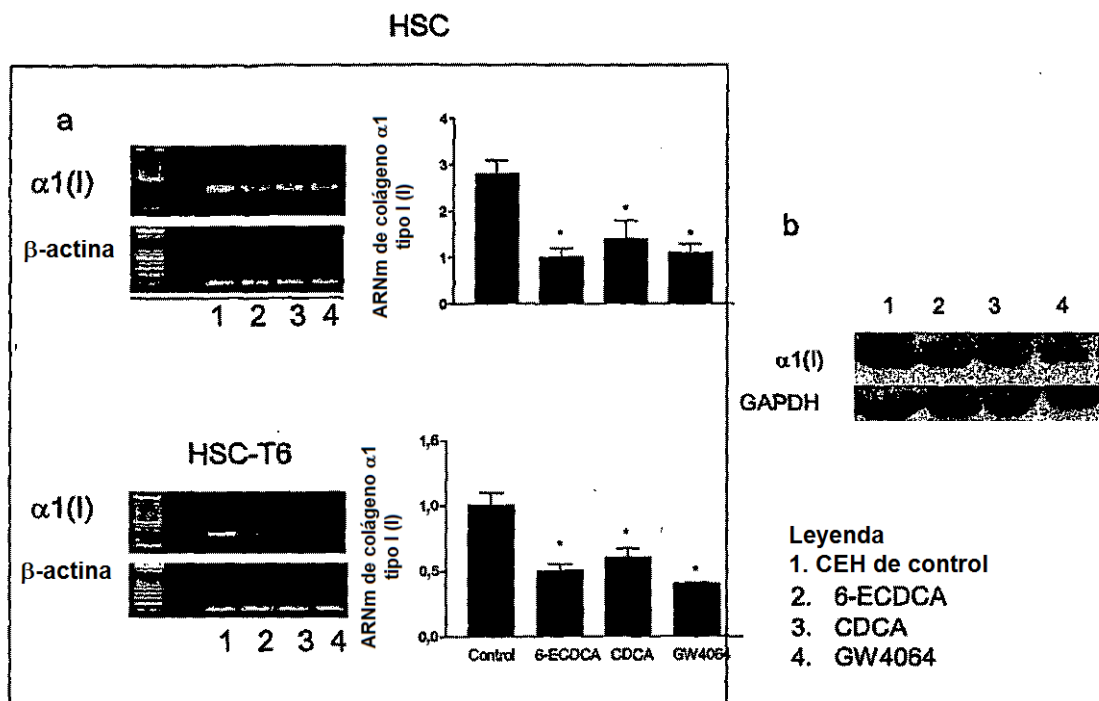


Figura 3

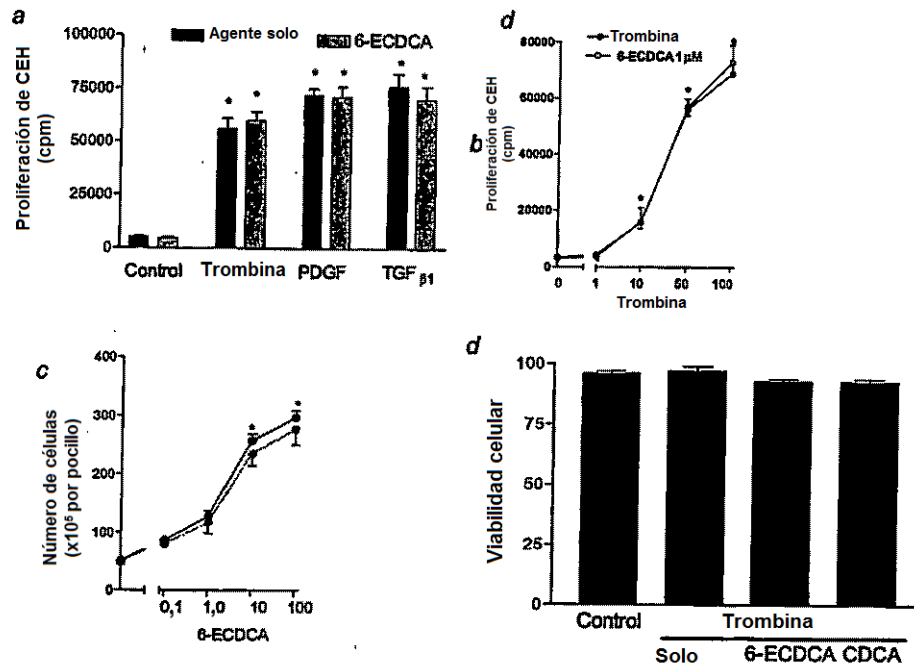


Figura 4

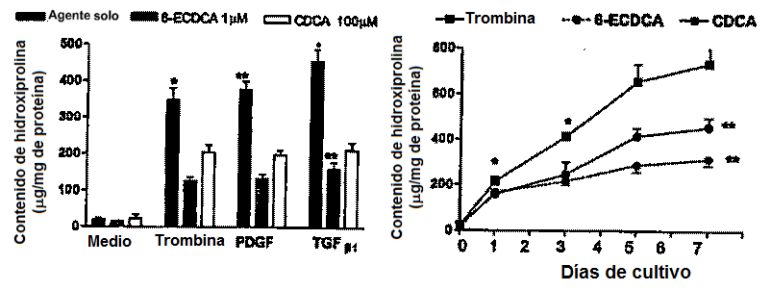


Figura 5

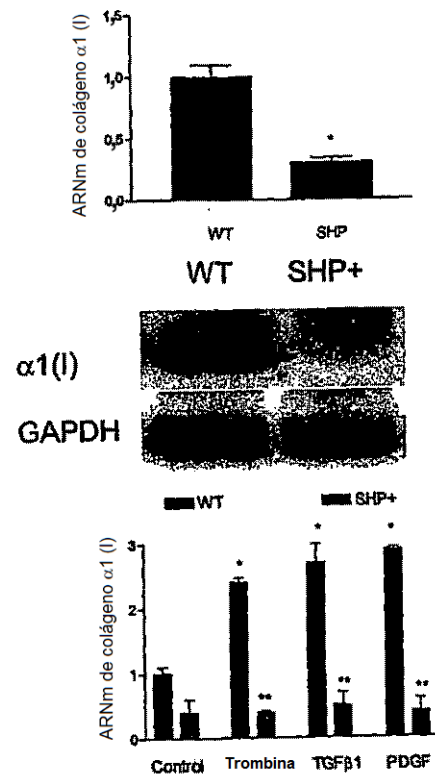


Figura 6

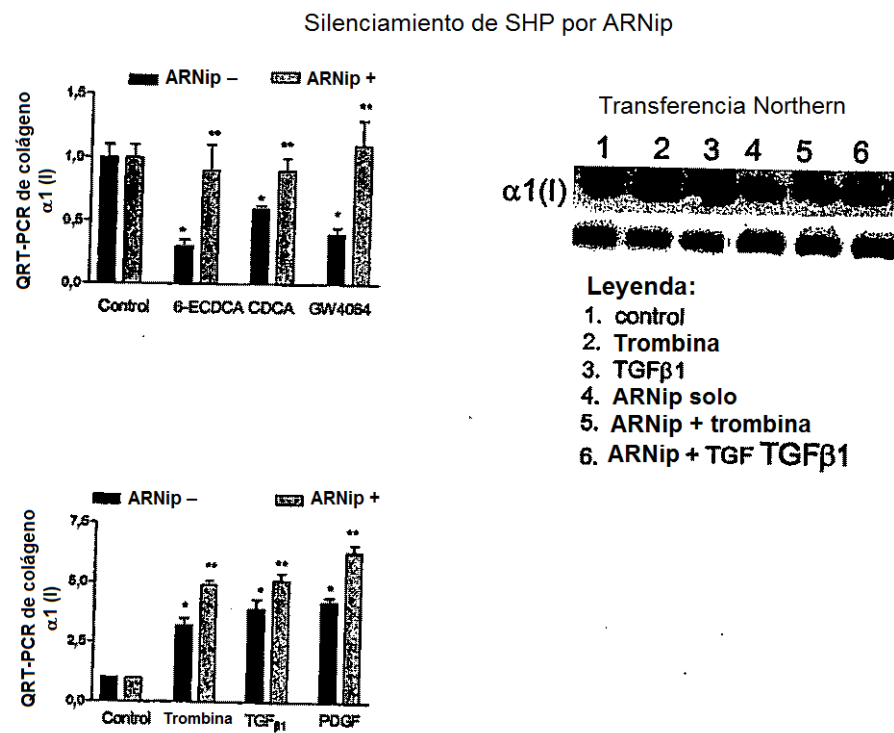


Figura 7

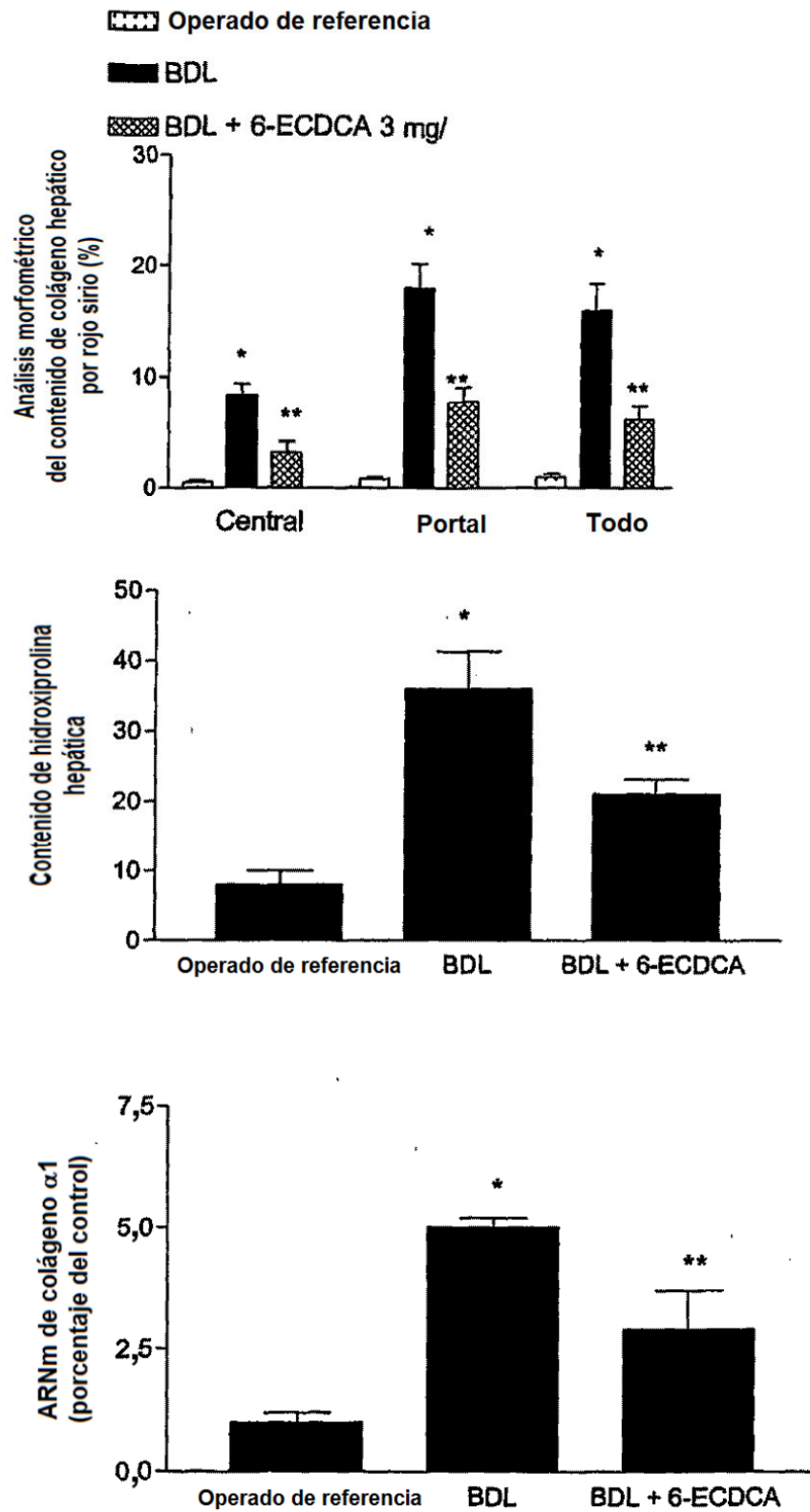


Figura 8