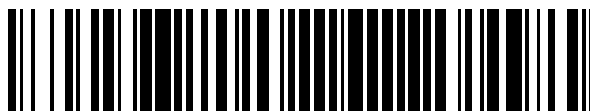


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 487**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/198** (2006.01) **A61K 31/192** (2006.01)  
**A61P 5/50** (2006.01)  
**A61P 5/00** (2006.01)  
**A61P 7/06** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2012 E 12744116 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2723333**

54 Título: **Tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo**

30 Prioridad:

**23.06.2011 US 201161500153 P**  
**06.12.2011 EP 11462024**

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

**18.01.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PÉCS (100.0%)**  
**Vasvári Pál utca 4.**  
**7622 Pécs, HU**

72 Inventor/es:

**WITTMANN, ISTVÁN;**  
**MOLNÁR, GERGO ATTILA;**  
**MOHAS-CSEH, JUDIT y**  
**SZIJÁRTÓ, ISTVÁN ANDRÁS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 556 487 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento y la prevención de condiciones debidas al estrés oxidativo y a la resistencia hormonal. Preferiblemente, están dentro de los objetivos la resistencia a la insulina, la resistencia a la eritropoyetina y la resistencia a la acetilcolina. La invención también se refiere al campo del uso de aminoácidos, en particular, p-L-Tirosina y sus precursores como un medicamento o una composición o formulación en la prevención o el tratamiento de dichas condiciones.

**Antecedentes de la técnica**

10 El tejido adiposo es un órgano activo endocrino y paracrino que influye no solo en la homeostasis del peso corporal sino que también desempeña una función importante en la inflamación, que induce el estrés oxidativo (EO) conduciendo, por ejemplo, a la resistencia a la insulina y a la diabetes mellitus (Iozzo 2009, Houstis 2006). El EO conduce a un desequilibrio entre especies de oxígeno reactivas (ERO) y la capacidad de defensa antioxidante. Las ERO implican, entre otros, al radical anión superóxido ( $-O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al radical libre hidroxilo (-OH). El -OH puede formarse, por ejemplo, en la reacción de Fenton en presencia de metales de transición. Se sabe que el estrés oxidativo (EO) tiene un efecto negativo en las macromoléculas; por ejemplo, OH es capaz de convertir a la L-fenilalanina (Phe) en *meta*-tirosina (m-Tyr) y *orto*-tirosina (o-Tyr) (Huggins 1993), isómeros del aminoácido natural *para*-tirosina (p-Tyr). Esta reacción puede llevarse a cabo en restos Phe dentro de las cadenas polipeptídicas proteínicas, aunque también en aminoácidos unidos a no proteínas (Galano 2008). Debido a que m-Tyr y o-Tyr son moléculas estables y aunque están ausentes de las proteínas normales, han servido como marcadores útiles del estrés de radicales -OH (Gurer-Orhan 2006).

15 Normalmente se sugiere que las enfermedades relacionadas con EO se tratan y/o se previenen con antioxidantes directos, como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides y polifenoles (Pokomy 2001). Una intervención terapéutica mediante la administración de la especie antioxidante resveratrol podría conducir a una reducción en la resistencia a la insulina ( $HOMA_{IR}$ ) (Brasnyó 2011). De forma alternativa, se administran agentes que aumentan los niveles de antioxidantes intracelulares, como glutatona (documento US2009/0017002A1). Típicamente, estos intentos fueron mayormente ineficaces y la mayor parte de los estudios clínicos no confirmaron las asunciones anteriores. Sin embargo, los datos previos del grupo de trabajo de los investigadores mostraron que el resveratrol es capaz de mejorar la resistencia a la insulina, disminuyendo la excreción urinaria de o-Tyr (Brasnyó 2011).

20 Los presentes inventores no conocen ninguna información de la técnica anterior sobre el uso de para-L-Tirosina (también denominada en este documento para-Tirosina, p-Tyr o Tyr, en abreviaturas), sus derivados, precursores o compuestos relacionados en el tratamiento de enfermedades debidas o inducidas por EO.

25 El documento US2010/0172916A1 proporciona una revisión de usos médicos de meta- o para-Tirosina y meta- o para-Tiramina. La tirosina, al ser un precursor de neurotransmisor, es ampliamente usada como suplemento dietético.

30 El documento US 7977319 muestra una bebida con alto contenido en fibras que puede comprender, entre otros aminoácidos, p-Tyr también. No existe indicación sobre el hecho de que la misma p-Tyr, como agente activo, sea apropiada para prevenir la enfermedad de la resistencia hormonal.

35 En el documento WO 01/13935, se sugiere el tratamiento de la resistencia a la leptina usando, entre otros, p-Tyr, mediante el aumento del transporte de leptina a través de la barrera sangre-cerebro; por lo que trata así la obesidad.

40 El documento US 2008/0090832 muestra el tratamiento de hiperfenilalaninemia mediante la administración de tetrahidrobiopterina a un sujeto. La p-Tyr es mencionada solo como un suplemento dietético de aminoácidos y no como agente activo.

45 Reinstein *et al.* (Reinstein 1985) proponen el uso de tirosina dietética en condiciones con reducciones en niveles de estrés hormonal.

50 Hao *et al.* sugieren que la tirosina podría ser una terapia potencial para problemas cognitivos y de ánimo asociados al mantenimiento de un menor peso corporal en el tratamiento de la obesidad y en el caso extremo de la anorexia nerviosa (Hao 2001). Con respecto a esto, se ha publicado que la tirosina puede reducir el apetito en sujetos susceptibles (Moller 1995); por ejemplo, afectando al hipotálamo, un área del cerebro implicada en la regulación del apetito (Fernstrom 2001).

Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que aunque m-Tyr y o-Tyr, formados bajo condiciones de estrés oxidativo, inhiben la fosforilación de proteínas en la ruta P13-K/Akt (fosfatidil-inositol-3 quinasa/proteína quinasa B), p-Tyr puede revertir este proceso.

Los presentes inventores también han encontrado que p-Tyr es útil para revertir la resistencia hormonal desarrollada debido a la formación de orto-Tyr y/o m-Tyr en las células debida a EO y la incorporación de estos aminoácidos en proteínas del receptor de dicha hormona o proteínas de señalización de la respectiva ruta de transducción de señal. En realizaciones preferidas, p-Tyr es útil para revertir la resistencia a la insulina y/o la resistencia a la eritropoyetina (EPO) y/o la resistencia a la acetilcolina.

Además, los presentes inventores han reconocido que p-Tyr es útil en el tratamiento de enfermedades de resistencia hormonal mediadas o inducidas por estrés oxidativo, siendo seleccionada dicha enfermedad de resistencia hormonal del grupo de enfermedades, condiciones o síndromes de obesidad, IGT (intolerancia a la glucosa), síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, resistencia a la insulina; estrés oxidativo en células del tejido adiposo/grasa, anemia, anemia crónica, isquemia, enfermedades vasculares, enfermedad renal crónica (ERC), enfermedad crónica cardíaca (ECC), estrés oxidativo del riñón, apnea obstructiva del sueño (OSAS) (u otras enfermedades relacionadas con la ruta (de señalización) de la insulina o eritropoyetina o acetil-colina).

### Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto seleccionado a partir de para-L-Tirosina (p-Tyr) y p-OH-fenil-piruvato o sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición debido a resistencia hormonal (o enfermedad de resistencia hormonal) inducida por estrés oxidativo, en donde dicho p-OH-fenil-piruvato se metaboliza en p-Tyr en dicho sujeto.

En una realización preferida, el sujeto muestra o se caracteriza por un estado de estrés oxidativo, preferiblemente un estrés oxidativo crónico, preferiblemente un daño de radicales hidroxilo en fenilalanina (Phe). Preferiblemente, al menos un marcador de estrés oxidativo está aumentado en dicho paciente, preferiblemente en una muestra biológica obtenida de dicho paciente. Opcionalmente, el nivel urinario de m-Tyr y o-Tyr puede considerarse como un marcador específico del daño del radical hidroxilo en Phe. Además, puede considerarse como un marcador indirecto de estrés oxidativo un nivel alto o aumentado de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) en un fluido corporal de dicho paciente, en donde el fluido corporal es suero o plasma.

En una realización preferida, dicha resistencia hormonal es la resistencia a la insulina.

En una realización preferida, dicha resistencia hormonal es la resistencia a la eritropoyetina.

En otra realización preferida, dicha resistencia hormonal es la resistencia a la acetilcolina.

Preferiblemente, dicha condición se selecciona a partir de obesidad, IGT (intolerancia a la glucosa), síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, resistencia a la insulina, resistencia a la eritropoyetina, resistencia a la acetilcolina, estrés oxidativo en células del tejido adiposo/grasa, anemia, anemia crónica, isquemia, enfermedades vasculares, enfermedad renal crónica (ERC), enfermedad crónica cardíaca (ECC), estrés oxidativo del riñón, apnea obstructiva del sueño (OSAS) u otras enfermedades derivadas de la ruta (de señalización) de la insulina o eritropoyetina o acetilcolina).

Muy preferiblemente, la condición se selecciona de hipertensión, anemia; por ejemplo, anemia crónica, enfermedades vasculares, enfermedad crónica cardíaca (ECC), incluso más preferiblemente la condición es hipertensión o anemia. Muy preferiblemente, la condición es una enfermedad renal; por ejemplo, enfermedad renal crónica (ERC) o estrés oxidativo del riñón.

En una realización preferida, la resistencia hormonal está inducida por estrés oxidativo vía la formación de o-Tyr y/o m-Tyr y opcionalmente vía la incorporación de dicho o-Tyr y/o m-Tyr en proteínas celulares, preferiblemente en al menos una proteína celular de la ruta de señalización intracelular de una hormona en cuya resistencia dicha condición está relacionada.

Preferiblemente, la resistencia hormonal es diferente de la resistencia a la leptina. En otra realización preferida, se excluyen del alcance de la presente invención patologías resistentes a la insulina que son debidas a una inhibición o bloqueo del transporte de leptina a través de la barrera sangre-cerebro. En particular, en una realización preferida, se excluye la resistencia a la insulina y/o diabetes mellitus tipo 2 y/o la obesidad debidas, inducidas o mediadas por la resistencia a la leptina. Este alcance de soluciones puede evaluarse o definirse midiendo el nivel de leptina en el suero de dichos pacientes. Típicamente, los pacientes con resistencia a la leptina tienen un elevado nivel de leptina en suero.

En otra realización preferida, se excluyen del alcance de la presente invención composiciones y regímenes dietéticos en donde p-Tyr se usa como suplemento dietético de aminoácidos y no como agente activo.

Preferiblemente, la resistencia hormonal está inducida por el estrés oxidativo vía la modificación de restos de tirosina de al menos una proteína celular de la ruta de señalización intracelular de una hormona de cuya resistencia dicha condición está relacionada, inhibiendo por medio de esto la fosforilación de tirosina o por dicha proteína.

Más preferiblemente, dicha al menos una proteína se selecciona a partir de proteínas de la ruta de absorción de glucosa y/o vasodilatación de la ruta de señalización de la insulina; y/o proteínas de la ruta de generación neuroprotectora, neuroprotectora de fosfatidilinositol y/o de eritrocito de la ruta de señalización de eritropoyetina; y/o proteínas de la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa(PI3K)/AKT. Más preferiblemente, dicha al menos una proteína se selecciona a partir de la parte intracelular de un receptor de dicha hormona, receptor de insulina, IRS 1, IRS2, PD3K, PDK1, AKT y GLUT4.

En una realización preferida, la hormona actúa vía la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa(PI3K)/AKT.

En otra realización, la prevención, la mejora o el tratamiento de dicha condición comprende, consiste o es parte de un régimen (personalizado) o programa de administración dirigido a dicho sujeto.

En una realización preferida, el paciente que se trata de acuerdo con la invención es un paciente expuesto a estrés oxidativo o un paciente que está en un estado de estrés oxidativo. Preferiblemente, el estrés oxidativo es estrés oxidativo crónico. Un paciente expuesto a estrés oxidativo, preferiblemente al estrés oxidativo crónico, preferiblemente debido a una enfermedad de estrés oxidativo ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar una condición o trastorno debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo.

Así, la invención es preferiblemente aplicable cuando una condición o trastorno, debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo, tiene que prevenirse o mejorarse, preferiblemente prevenirse.

El estado de estrés oxidativo puede mostrarse o diagnosticarse vía marcadores del estrés oxidativo.

En una realización preferida, el marcador de estrés oxidativo tiene un nivel o una excreción elevada, por ejemplo, una excreción diaria de m-Tyr o o-Tyr en la orina del paciente. Otro marcador del estrés oxidativo es el nivel anormalmente alto o elevado de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP).

Así, en otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado de para-L-Tirosina (p-Tyr), precursor de p-Tyr o sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde dicho precursor de p-Tyr se metaboliza en p-Tyr en dicho sujeto, para uso en un sujeto en la prevención o mejora, o preferiblemente la prevención de una condición debida a resistencia hormonal, en donde dicho sujeto está expuesto a estrés oxidativo y/o estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres de hidroxilo (-OH) o dicho sujeto sufre una enfermedad por estrés oxidativo. Preferiblemente, el estrés oxidativo es estrés oxidativo crónico y/o la enfermedad por estrés oxidativo es una enfermedad crónica por estrés oxidativo.

En una realización preferida, el sujeto tiene una condición inflamatoria subclínica. En particular, el sujeto se caracteriza por un nivel anormalmente alto o elevado de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP).

En una realización más preferida, el paciente muestra un elevado nivel o excreción, por ejemplo, una excreción diaria de m-Tyr o o-Tyr en la orina.

Preferiblemente, dicho sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

Dicho compuesto se selecciona de:

- para-L-Tirosina y p-OH-fenil-piruvato.

En una realización preferida, dicho compuesto se formula como una composición farmacéutica o un medicamento, o el compuesto se formula como un suplemento dietético, producto nutracéutico, alimento funcional, alimento o composición con una propiedad saludable.

La invención también se refiere a dicha formulación, preferiblemente seleccionada de composiciones farmacéuticas, suplementos dietéticos, productos nutracéuticos, alimentos funcionales, alimentos o composiciones con una propiedad saludable. Preferiblemente dicha formulación es para uso en el tratamiento de una condición como se define anteriormente. Preferiblemente, dicha formulación está acompañada de una descripción del efecto biológico del compuesto de la invención y/o indicación terapéutica y/o tratamiento propuesto de cada uno de ellos como se describe en este documento.

La formulación puede formularse para uso oral o uso parenteral. En una realización, la formulación se formula como una composición farmacéutica o un medicamento y comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización más, la formulación se formula como un suplemento dietético, suplemento alimenticio, producto nutracéutico, alimento funcional, alimento o composición, o uno o más de estos con una propiedad saludable.

En una realización preferida, la formulación de la invención comprende al menos una dosis o múltiples dosis del compuesto adecuado para proporcionar una aportación diaria durante al menos un día.

En una realización, una dosis individual de dicho compuesto es de al menos 100 mg, 200 mg, 300, mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g y/o como mucho 10 g, 7,5 g, 5 mg, 3 g, 2,5 g, 2 g, 1,8 g, 1,6 g, 1,5 g, 1,4 g, 1,3 g, 1,2 g, 1,1 g, 1 g, 900 mg, 800 mg, 700 mg, 600 mg, 500 mg, dependiendo de la dosis máxima o mínima, respectivamente.

- 5 La invención proporciona además un método para prevenir, mejorar o tratar una condición relacionada con la resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo, que comprende administrar un compuesto o una dosis farmacéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado de p-Tyr, precursor de p-Tyr o sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde dicho precursor de p-Tyr se metaboliza en p-Tyr en dicho sujeto.

Preferiblemente, la condición es una condición como se define antes.

- 10 Preferiblemente, en el método de la descripción, el compuesto administrado es un compuesto como se define antes.

Preferiblemente, el sujeto con dicha condición para prevenir, mejorar o tratar es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

Preferiblemente, la prevención, la mejora o el tratamiento de dicha condición comprende, consiste o es parte de un régimen (personalizado) o programa de administración dirigido a dicho sujeto.

- 15 En una opción preferida, el compuesto se administra a un sujeto expuesto a estrés oxidativo y/o estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres de hidroxilo (-OH) o un sujeto en una enfermedad de estrés oxidativo. Preferiblemente, el estrés oxidativo es estrés oxidativo crónico y/o la enfermedad por estrés oxidativo es una enfermedad crónica por estrés oxidativo. En una opción preferida, el sujeto tiene una condición inflamatoria subclínica. En particular, el sujeto se caracteriza por un nivel anormalmente alto o elevado de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP). En una opción más preferida, el paciente muestra un elevado nivel o excreción, por ejemplo, una excreción diaria de m-Tyr u o-Tyr en la orina.

- 20 En una opción preferida, la aportación diaria de dicho compuesto es uno, dos o tres veces al día de una dosis de al menos 100 mg, 200 mg, 300, mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g y/o como mucho 10 g, 7,5 g, 5 mg, 3 g, 2,5 g, 2 g, 1,8 g, 1,6 g, 1,5 g, 1,4 g, 1,3 g, 1,2 g, 1,1 g, 1 g, 900 mg, 800 mg, 700 mg, 600 mg, 500 mg. Si fuera apropiado, pueden aplicarse dosis individuales mayores para una aportación diaria individual de hasta 30.000 mg con la condición de que pueda formularse en una unidad de dosificación individual que pueda administrarse todavía oralmente y, por ejemplo, que se administre tragada. Preferiblemente, la formulación de la invención se formula en una forma adecuada para la administración de una dosis que proporciona una toma diaria.

- 25 En otra opción preferida, el nivel en suero de p-Tyr y o-Tyr y m-Tyr se monitorea durante el ajuste del régimen de administración de p-Tyr o durante el tratamiento.

En una opción preferida, la monitorización incluye la medida de niveles de p-Tyr y o-Tyr y/o m-Tyr en suero y urinarios también; preferiblemente, niveles de glucosa en suero e insulina. En una cierta opción, también se monitorea la absorción de p-Tyr y/o la hormona por adipocitos y/o tejido adiposo.

- 30 En una opción preferida del tratamiento para una condición o enfermedad debida a la resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo:

- p-Tyr o un precursor de p-Tyr se administra a un sujeto caracterizado o predispuesto a una condición o trastorno debido a la resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo,

- el nivel de estrés oxidativo se evalúa en dicho paciente,

- 35 - en donde si el nivel de estrés oxidativo está por encima de un valor predeterminado, la dosis diaria de p-Tyr o un precursor de p-Tyr administrado se aumenta en dicho paciente.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo en un tratamiento continuo o se continua durante al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 días, más preferiblemente durante al menos un mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses o al menos durante medio año o al menos 1 año o al menos 2 años o al menos 3 años o al menos 5 años o al menos 10 años o toda la vida.

- 40 Dicho compuesto se formula preferiblemente como se define anteriormente.

La invención también proporciona un uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la preparación de una formulación como se define en este documento para uso en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición como se define en este documento.

#### Definiciones

- 45 Los precursores de para-Tirosina son moléculas que se convierten en para-L-Tirosina en el cuerpo vivo de un animal, incluyendo seres humanos. Preferiblemente, los precursores de para-L-Tirosina se sintetizan en el cuerpo

vivo de dicho animal. Muy preferiblemente, de acuerdo con la invención el precursor de para-Tirosina es el p-OH-fenil-piruvato, el cetoanálogo de p-Tyr.

Una proteína celular es una proteína que, cuando se expresa en una célula, se localiza dentro de dicha célula o al lado celular de la membrana de dicha célula, preferiblemente dentro de dicha célula.

- 5 La ruta de señalización o ruta de transducción de la señal o simplemente la ruta, si el contexto lo permite, se usa en este documento de forma intercambiable y se refiere a un serie de cambios bioquímicos y/o eventos, incluyendo cambios bioquímicos y/o eventos dentro de la célula en donde dichos cambios y/o eventos está influenciados, catalizados o afectados por sustancias bioquímicas, por ejemplo, biomoléculas y en donde un receptor de la pared celular recibe una señal (preferiblemente una hormona) y transmite esta información a la célula y, preferiblemente provoca una respuesta celular, o se refiere a una parte de este proceso, preferiblemente que comprende al menos dos cambios bioquímicos y/o eventos o reacciones, que implican preferiblemente al menos dos enzimas.

Los receptores que inician cambios bioquímicos pueden hacerlo o bien directamente vía actividades enzimáticas intrínsecas dentro del receptor o activando moléculas mensajeras intracelulares.

- 15 Una hormona es una sustancia química producida en el cuerpo que controla y regula la actividad de ciertas células u órganos. Así, este término es ampliamente entendido en este documento para que incluya pequeñas moléculas químicas que llevan mensajes en el cuerpo, por ejemplo, desde los órganos a las células, incluyendo así, por ejemplo, a la acetilcolina. En una realización más preferida, la hormona es una hormona peptídica, por ejemplo, insulina o eritropoyetina. Preferiblemente, la hormona es diferente a una leptina.

- 20 Debe entenderse en este documento una condición o enfermedad debida a resistencia hormonal (o una enfermedad por resistencia hormonal) como el estado de un paciente en donde la resistencia hormonal en dicho paciente contribuyó a este estado. Dicho estado es diferente de un estado saludable, por ejemplo, se caracteriza por parámetros mensurables que caen fuera del rango aceptado como normal o típico de un sujeto saludable. Opcionalmente, dicho estado es una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad que es debida a una resistencia hormonal formada en dicho paciente.

- 25 La expresión resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo (o una enfermedad por resistencia hormonal mediada por estrés oxidativo) se refiere a una condición en donde el estrés oxidativo está detectablemente presente en el cuerpo de un paciente. Si el estrés oxidativo se muestra mediante el nivel elevado de un marcador del estrés oxidativo, como se define en este documento, presenta un riesgo mayor de resistencia hormonal, preferiblemente resistencia a la insulina y/o resistencia a la eritropoyetina y/o resistencia a la acetilcolina. Así, el estado de estrés oxidativo, preferiblemente el estrés oxidativo crónico, define un grupo de sujetos que se trata de acuerdo con la presente invención. A partir de ahí, una condición o enfermedad debida a la resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo o una enfermedad de estrés oxidativo puede prevenirse o mejorarse. En la práctica, la expresión resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo o enfermedad de estrés oxidativo debe entenderse como que existe una co-existencia o correlación entre la resistencia hormonal y el estrés oxidativo en dicho sujeto o paciente.

- 35 Estrés oxidativo (EO) es el estado de un sujeto caracterizado por un desequilibrio entre especies reactivas con oxígeno (ERO) y la capacidad de defensa antioxidante o el sujeto, es decir, un nivel mayor de ERO, en particular del anión radical de superóxido ( $-O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical libre de hidroxilo ( $-OH$ ), en una realización altamente preferida,  $-OH$ . El estrés oxidativo, si es persistente, es estrés oxidativo crónico. El estrés oxidativo crónico se entiende en este documento como la presencia de estrés oxidativo en el sujeto durante un periodo de tiempo mayor que en el estrés oxidativo agudo, es decir, durante típicamente al menos 5 días o al menos 10 días o al menos 15 días o durante 1 semana o durante al menos 2 semanas o durante al menos 3 semanas o, preferiblemente, durante al menos 4 semanas o durante al menos 1 mes o al menos 2 meses o al menos 3 meses o durante al menos durante medio año o durante al menos un año.

- 45 La enfermedad por estrés oxidativo o la enfermedad crónica por estrés oxidativo es una condición de un sujeto caracterizada por un estrés oxidativo crónico en donde en dicho sujeto cualquier efecto pernicioso o síntoma de un estrés oxidativo crónico, por ejemplo, la aparición de resistencia hormonal, preferiblemente resistencia a la insulina, y/o resistencia a EPO y/o resistencia a la acetilcolina puede mostrarse, evaluarse, medirse o diagnosticarse. Los métodos para evaluar el estrés oxidativo que se describen en este documento también son conocidos en la técnica.

- 50 Un sujeto es un ser humano o un animal. Un paciente es un sujeto que recibe atención médica, cuidados o tratamiento.

- 55 La prevención, según se entiende en este documento, se refiere al tratamiento de un sujeto que comprende la administración del compuesto de la invención con el objetivo de prevenir el desarrollo de la resistencia hormonal en dicho sujeto o prevenir el inicio de una enfermedad por resistencia hormonal o prevenir la exacerbación de los síntomas de una enfermedad por resistencia hormonal. Preferiblemente, la prevención es un tratamiento de un sujeto expuesto y caracterizado por el estrés oxidativo o teniendo el estado de éste; preferiblemente el estrés oxidativo crónico con el fin de prevenir el desarrollo de resistencia hormonal en dicho sujeto o prevenir el inicio de una enfermedad por resistencia hormonal. La prevención parcial está preferiblemente incluida en el significado de esta expresión.

Un proceso bioquímico comprende uno o más cambios biológicos y/o eventos funcionalmente relacionados en un organismo vivo con un efecto en dicho organismo siendo dicho efecto preferiblemente detectable, en donde dichos cambios o eventos están influidos, catalizados o afectados por sustancias bioquímicas, por ejemplo, biomoléculas.

5 La inhibición de un proceso bioquímico es entendida como un proceso que resulta en la reducción del efecto biológico de dicho proceso biológico en comparación con el mismo proceso sin inhibición. Dicha reducción del efecto biológico puede conducir a la abolición de dicho efecto, puede conducir a la reducción de dicho efecto a un nivel que no es detectable o la reducción de dicho efecto a un nivel menor que el medido sin inhibición.

El inhibidor es una sustancia, preferiblemente un compuesto, de cuyo contacto con dichas sustancias bioquímicas, por ejemplo, con las biomoléculas, resulta en una inhibición.

10	No estándar	Abreviaturas y Acrónimos
	ACh	Acetilcolina
	ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	m-Tyr	Meta-L-tirosina
15	NO	Óxido nítrico
	o-Tyr	Orto-L-tirosina
	-OH	Radical hidroxilo
	p-Tyr	Para-L-tirosina
	Phe	L-fenilalanina
20	PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt
	Px	Peroxidasas
	ERO	Especies reactivas con oxígeno

Breve Descripción de las Figuras

25 Figura 1. Una presentación esquemática de la relación entre el estrés oxidativo, la producción de meta- y orto-tirosina, inflamación subclínica y una resistencia hormonal consecuente. El estrés oxidativo persistente y no tratado a través de un mecanismo de pre-alimentación (o retroalimentación positiva) inicia un círculo vicioso que conduce a resistencia hormonal y enfermedades de estrés oxidativo.

30 Figura 2. Absorción dependiente de insulina de desoxi-D-glucosa 2-[1 2-<sup>3</sup>H(N)] en adipocitos 3T3-L1. La absorción de glucosa se midió en medio que contenía i) para-tirosina con un contenido de glucosa 5 mM, ii) meta-tirosina con glucosa 5 mM, iii) orto-tirosina con glucosa 5 mM y iv) para-tirosina con contenido de glucosa 25 mM. Las células se trataron con insulina 2, 20, 200 y 400 nM, como se muestra. La absorción de glucosa de las células no tratadas cultivadas en para-tirosina y medio de glucosa 5 mM se ajustó al 100%. Los resultados están en promedio ± SEM para n=5 medidas individuales. \*,p<0,05 p-Tyr + glucosa 5 mM vs. m-Tyr + glucosa 5 mM, o-Tyr + glucosa 5 mM y p-Tyr + glucosa 25 mM, en todas las concentraciones de insulina (muestras independientes del t-test).

35 Figura 3. Absorción dependiente de insulina (400 nmol/l) de desoxi-D-glucosa 2-[1 2-<sup>3</sup>H(N)] en adipocitos 3T3-L1 (barras negras) en medio, suplementado con para tirosina (72 mg/l) o tanto tirosina meta (panel A) como orto (panel B) a diferentes concentraciones (72 mg/l, 36 mg/l, 18 mg/l, 9 mg/l, 4,5 mg/l, 2.25 mg/l). Las barras blancas indican la absorción de las células no tratadas con insulina (control) cultivadas en medio de para-tirosina. Los resultados son representativos para n=2 medidas individuales.

40 Figura 4. Absorción dependiente de insulina (400 nM) de desoxi-D-glucosa 2-[1 2-<sup>3</sup>H(N)] en adipocitos 3T3-L1 (barras negras) en medio, suplementado con para tirosina (72 mg/l) o tanto tirosina meta (72 mg/l) (panel A) como orto (72 mg/l) (panel B) para diferentes periodos de tiempo. Las barras blancas indican la absorción de las células no tratadas con insulina (control), que se ajustaron al 100%. Los resultados son representativos para n=2 medidas individuales.

45 Figura 5. Fosforilación inducida por insulina de Akt [proteína quinasa B] en adipocitos 3T3-L1 cultivados en medio que contenía para-, orto-, o meta-tirosina tanto en medio que contenía glucosa 5 mM como 25 mM, en tratamiento

de insulina a 200 y 400 nmol/l. Los resultados están en promedio  $\pm$  SEM para n=5 medidas individuales. \*, p<0,05 p-Tyr y glucosa 5 mM vs. todos los otros grupos de tratamiento (muestras independientes del t-test).

5 Figura 6. Medida de HPLC de absorción aguda de para-, orto- y meta-tirosina por adipocitos 3T3-L1 después de una incubación dependiente del tiempo con las tirosinas mencionadas más arriba, con o sin tratamiento de las células con insulina (400 nM). Nótese que p-Tyr se mide en nM (panel A), mientras que o-Tyr (panel B) y m-Tyr (panel C) se miden en nM.

10 Figura 7. Medida de HPLC de isómeros de tirosina unidos a proteína en lisados de células, cultivadas en medio que contenía para-tirosina (panel A), orto-tirosina (panel B) o meta-tirosina (panel C). \*: p<0,05 (muestras independientes de t-test). Los resultados están en promedio  $\pm$  SEM para n=10 medidas individuales. La cantidad de los aminoácidos fue corregida respecto al contenido de tirosina de proteína total.

15 Figura 8. A) Protocolo de estudio experimental de la suplementación del isómero de tirosina en ratas Sprague-Dawley. Al comienzo, se les suministró oralmente a ratas macho en ayuno (5-6 semanas) tanto para-tirosina (p-Tyr) como orto-tirosina (o-Tyr) disuelta en solución salina o vehículo (solo solución salina) durante cuatro semanas (véase también en la sección de Métodos). Al final de la suplementación de la semana cuatro, las ratas o bien fueron sacrificadas para el análisis HPLC y los estudios vasomotores o bien se sometieron a un largo 'periodo de lavado' de cuatro semanas parando la suplementación del isómero de tirosina y se sacrificaron al final de la 8ª semana para realizar los estudios de HPLC y los vasomotores. B) Efecto de la suplementación del isómero de tirosina de ratas en los niveles de o-Tyr vascular de segmentos arteriales consecutivos aislados (4ª semana). La suplementación de o-Tyr oral sostenida de ratas (o-Tyr) aumentó significativamente el contenido de o-Tyr en los tres segmentos arteriales (es decir, las aortas torácica y abdominal y la arteria femoral), mientras que la suplementación de p-Tyr (p-Tyr) no alteró los niveles de o-Tyr comparado con las ratas tratadas con vehículo (Control). [Control: Torácico: n=4; Abdominal: n=4; Femoral: n=4; p-Tyr: Torácico: n=4; Abdominal: n=4; Femoral: n=4; o-Tyr: Torácico: n=4; Abdominal: n=4; Femoral: n=4]. Los niveles de o-Tyr vascular son relativos a los niveles de fenilalanina (Phe). C) Efecto de la suplementación del isómero de tirosina de ratas en relajación inducida por insulina de segmentos arteriales consecutivos aislados (4ª semana). La suplementación de ratas con o-Tyr (o-Tyr) atenuó notablemente los relajamientos inducidos por insulina de los tres segmentos aislados comparado con el grupo tratado con p-Tyr (p-Tyr), también en la aorta abdominal y la arteria femoral comparado con las ratas tratadas con vehículo (Control), como se indica por los menores valores de logEC50 de insulina cercanos a cero. [Control: Torácico: n=4; Abdominal: n=4; Femoral: n=4; p-Tyr: Torácico: n=4; Abdominal: n=4; Femoral: n=4; o-Tyr: Torácico: n=4; Abdominal: n=4; Femoral: n=4]. Los datos están en promedios  $\pm$  SEM. \* P <0,05; NS P > 0,05; Panel B: (ANOVA); Panel C: # P <0,05 vs. para (Extra suma-de-cuadrados F test)

Figura 9. La falta de incorporación de diferentes isoformas de tirosina en proteínas celulares de células de endotelio de ratón en la incorporación aguda (30 min) con los aminoácidos respectivos, p>0,05 para todas las comparaciones (ANOVA). Los datos están en promedio  $\pm$  SEM.

35 Figura 10. La incorporación de diferentes isoformas de tirosina en proteínas celulares de células de endotelio de ratón después de 7 días con los respectivos aminoácidos. \*: p<0,05 (ANOVA). Los datos están en promedio  $\pm$  SEM.

Figura 11. Vasorelajación dependiente de insulina en la aorta torácica de ratas Sprague-Dawley alimentadas con p-Tyr/m-Tyr/o-Tyr en 4 semanas (panel A), en la semana 8ª (después de 4 semanas de lavado, panel B) y en el experimento agudo (panel C). \*: p<0,05

40 Figura 12. Vasorelajación dependiente de insulina en la aorta abdominal de ratas Sprague-Dawley alimentadas con p-Tyr/m-Tyr/o-Tyr en 4 semanas (panel A), en la semana 8ª (después de 4 semanas de lavado, panel B) y en el experimento agudo (panel C). \*: p<0,05

45 Figura 13. Vasorelajación dependiente de insulina en la arteria renal de ratas Sprague-Dawley alimentadas con p-Tyr/m-Tyr/o-Tyr en 4 semanas (panel A), en la semana 8ª (después de 4 semanas de lavado, panel B) y en el experimento agudo (panel C). \*: p<0,05

Figura 14. Vasorelajación dependiente de insulina en la arteria femoral de ratas Sprague-Dawley alimentadas con p-Tyr/m-Tyr/o-Tyr en 4 semanas (panel A), en la semana 8ª (después de 4 semanas de lavado, panel B) y en el experimento agudo (panel C). \*: p<0,05

50 Figura 15. Vasorelajación dependiente de insulina expresada como -log EC50 de la dosis de insulina en diferentes segmentos vasculares de ratas Sprague-Dawley alimentadas con p-Tyr/m-Tyr/o-Tyr en 4 semanas de alimentación. La suplementación de ratas con p-Tyr (p-Tyr) aumentó los relajamientos inducidos por insulina solo en la aorta torácica pero no en ninguno de los otros segmentos arteriales aislados (es decir, aorta abdominal y arteria femoral) comparado con las ratas tratadas con vehículo (Control). \*: p<0,05

55 Figura 16. Vasorelajación inducida con acetilcolina (Ach) expresada como log EC50 de la dosis de insulina en diferentes segmentos vasculares de ratas Sprague-Dawley. Tanto en el experimento con Ach sola (barras negras) como con Ach se administró más superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). \*: p<0,05.



Figura 17. Absorción dependiente de eritropoyetina de desoxi-D-glucosa 2-[1 2-<sup>3</sup>H(N)] en adipocitos 3T3-L1. La absorción de glucosa se midió en medio que contenía i) para-tirosina con contenido de glucosa 5 mM o ii) orto-tirosina con 5 mM. Las células se trataron con varias concentraciones de eritropoyetina (como se indica). La absorción de glucosa de células no tratadas cultivadas en para-tirosina y medio de glucosa 5 mM se ajustó al 100%. Los resultados son promedios para n=3 medidas individuales.

Figura 18. Fosforilación dependiente de eritropoyetina de Akt (PKB) en adipocitos 3T3-L1. Los experimentos se llevaron a cabo en células cultivadas en medio que contenía i) para-tirosina con contenido de glucosa 25 mM, ii) meta-tirosina con glucosa 25 mM, iii) orto-tirosina con glucosa 25 mM. Las células se trataron con varias concentraciones de eritropoyetina (como se indica). La tasa de fosforilación de células no tratadas cultivadas en para-tirosina y medio de glucosa 25 mM se ajustó al 100%. Los resultados están en promedio ± SEM para n=3 medidas individuales. \*,p<0,05 (muestras independientes de t-test).

Figura 19. Vista esquemática de segmentos arteriales consecutivos de ratas Sprague-Dawley usadas en los experimentos. Los segmentos proximales de la aorta torácica (a) y abdominal (c) y la arteria femoral (e) se usaron para determinar el contenido de o-Tyr con análisis HPLC. Las partes distales de los mismos segmentos de la aorta torácica (b), aorta abdominal (d) y arteria femoral (f) se usaron para evaluar la función vasomotora.

### Descripción detallada de la invención

El daño derivado de (ERO) de especies reactivas de oxígeno puede estudiarse mediante la detección de derivados estables de ácidos grasos, ácidos nucleicos o aminoácidos. Debido al ataque del radical hidroxilo, pueden formarse dos isoformas específicas de tirosina, es decir, m-Tyr y o-Tyr. Estos aminoácidos no se generan a partir de la hidroxilación enzimática de Phe; en la última reacción solo se forma p-Tyr. Por lo tanto, m-Tyr y o-Tyr pueden considerarse como marcadores específicos del daño del radical hidroxilo en Phe.

Estos aminoácidos oxidados pueden producirse post-translacionalmente *in loco* mediante la oxidación de restos Phe de cadenas proteicas, sin embargo, también existen pruebas de que las m- y o-Tyr libres pueden absorberse e incorporarse en proteínas de células de ovario de hámster chino (Gruer-Orhan 2006), células de macrófago de ratón (Rodgers 2002) y pueden alterar el recambio de proteínas y las funciones celulares.

Los presentes inventores han realizado experimentos modelo para obtener proteínas enriquecidas con m-Tyr y o-Tyr para imitar el efecto de un alto estado de estrés oxidativo donde tanto las cadenas laterales de Phe pueden estar *in loco* oxidadas para dar las cadenas laterales de m- y o-Tyr de la proteína, o m- y o-Tyr no derivadas de ERO podrían ser incorporadas en las proteínas. Cuando las células se cultivaron en medio que contiene m- o o-Tyr durante 10 días, los dos isómeros de aminoácido no fisiológicos se incorporaron dentro de las proteínas. No hubo un cambio significativo en el contenido de Phe de la proteína (no se muestran los datos).

Las células 3T3-L1 pueden diferenciarse en adipocitos y usarse como modelo para observar los efectos *in vitro* sobre el tejido graso (Thomson 1997). Ya que el tejido adiposo es un *locus* principal para la resistencia a la insulina, los presentes inventores estudiaron el efecto de la insulina en células 3T3-L1. Los presentes inventores usaron diferentes concentraciones de los isómeros de aminoácido en los experimentos, es decir, la relación de p-Tyr:m-Tyr o la de p-Tyr:o-Tyr varió de 1:32 a 1:1. Los presentes inventores han encontrado que en concentraciones equimolares (72:72 mg/l), tanto m-Tyr como o-Tyr inhiben totalmente la absorción de glucosa inducida por insulina. p-Tyr tiene que estar presente en una concentración aprox. 8-32- veces más alta que m-Tyr u o-Tyr en el medio para ser capaz de competir con el efecto de m- u o-Tyr. Estos datos sugieren una competición entre los aminoácidos.

La incorporación de m- u o-Tyr en las proteínas induce un efecto persistente del estrés oxidativo en el paciente. Así, esto significa que si las células del paciente están expuestas a estrés oxidativo crónico las células "recuerdan" el estado oxidativo. Esto ocurre principalmente en el estrés oxidativo crónico lo que conduce a resistencia hormonal, como se describe en este documento.

Por tanto, un paciente típico que se trata de acuerdo con la invención es un paciente expuesto a estrés oxidativo durante un periodo de estrés oxidativo suficiente para que esta "memoria del estrés oxidativo" se forme y como consecuencia se forme una resistencia hormonal. Por lo tanto, estos pacientes expuestos al estrés oxidativo tienen un riesgo mayor de resistencia hormonal, incluso si los síntomas de una enfermedad por resistencia hormonal no están presentes. En estos pacientes, el tratamiento de acuerdo con la invención puede usarse como prevención de una condición o un trastorno debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo.

En el caso de los síntomas iniciales de resistencia hormonal, puede mejorarse la condición o el trastorno debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo. Sin embargo, debe entenderse que incluso si se ha desarrollado en un paciente la resistencia hormonal de acuerdo con la invención, la administración del compuesto para uso de acuerdo con la invención aún puede proporcionar la prevención de la exacerbación de la enfermedad, es decir, puede prevenir o aliviar las consecuencias posteriores de dicha enfermedad por resistencia hormonal.

Así, de acuerdo con la invención, una enfermedad crónica por estrés oxidativo o una condición, síntoma, síndrome o enfermedad inducida por ésta se previene, mejora o trata, preferiblemente se previene, mediante la administración

del compuesto de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el estrés (enfermedad) oxidativo crónico está inducido por un elevado nivel de radicales OH.

5 El estado de estrés oxidativo puede mostrarse o diagnosticarse vía marcadores del estrés oxidativo. Tales métodos se conocen en la técnica. Por ejemplo, m-Tyr y o-Tyr pueden considerarse como marcadores específicos del daño del radical hidroxilo en Phe. Se ha encontrado que la excreción renal de o-Tyr aumentaba en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con o sin una enfermedad concomitante renal crónica (Molnár 2005a). Además, m-Tyr y o-Tyr se acumulan en proteínas insolubles de los cristalininos de las cataratas de los pacientes diabéticos (Molnár 2005b). Por lo tanto, puede usarse m-Tyr y o-Tyr como marcador del estrés oxidativo inducido por el radical hidroxilo y posiblemente como marcador de resistencia a la insulina.

10 Otro marcador de estrés oxidativo indirecto preferido es el nivel anormalmente alto o elevado de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP). Otros marcadores del estrés oxidativo se mencionan en este documento más abajo.

La invención se explica con más detalle más abajo por medio de estos ejemplos y mediante la descripción de los antecedentes científicos de este epígrafe y en los resultados.

15 El daño oxidativo de los diferentes constituyentes celulares desempeñan una función central en la patogénesis de varias enfermedades.

Por tanto, de acuerdo con la descripción para-L-Tirosina (p-Tyr), el precursor de p-Tyr, es decir, p-OH-fenil-piruvato o sus sales farmacéuticamente aceptables se usan en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición debida a la resistencia hormonal o a la enfermedad por resistencia hormonal inducida o caracterizada por estrés oxidativo.

20 Preferiblemente, se usan la para-L-Tirosina (p-Tyr), el precursor de p-Tyr o sus sales farmacéuticamente aceptables en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de la resistencia a la eritropoyetina o una enfermedad debida a la resistencia a la eritropoyetina.

25 Preferiblemente, de acuerdo con la descripción, para-L-Tirosina (p-Tyr), el precursor de p-Tyr o sus sales farmacéuticamente aceptables se usan en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de la resistencia a la insulina o una enfermedad debida a la resistencia a la insulina.

Preferiblemente, de acuerdo con la descripción, se usan para-L-Tirosina (p-Tyr), el precursor de p-Tyr o sus sales farmacéuticamente aceptables en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de la resistencia a la acetilcolina o una enfermedad debida a la resistencia a la acetilcolina.

30 En un gran número de casos, el estrés oxidativo es una de las causas originarias de la resistencia a la insulina. Hay una compleja interrelación entre las alteraciones metabólicas relacionadas con la diabetes mellitus, la inflamación y el estrés oxidativo. La hiperglucemia por sí misma puede conducir a un aumento del estrés oxidativo vía múltiples rutas. Uno de los tejidos, en los que esta compleja interacción entre ERO, formación de AGE, inflamación, RAGEs etc. tiene lugar, es el tejido adiposo. Un modelo *in vitro* de adipocitos usado para estudiar las rutas de la insulina y la obesidad es la línea celular 3T3-L1, un fibroblasto embrionario de ratón de la línea celular transformada adiposa (Thomson 1997).

35 La insulina es una hormona que - bajo condiciones normal – aumenta la absorción de glucosa en la grasa, por tanto sirve como el primer regulador de la concentración de glucosa en sangre.

40 La resistencia a la insulina es una condición en la cual la insulina es incapaz de asegurar que la glucosa sea eficazmente utilizada por los tejidos periféricos, especialmente en las células de grasa. La patogénesis está muy estudiada pero no se comprende totalmente. Se han sugerido varias rutas como las causantes (DeFronzo 2010). Un factor potencial implementado en la patogénesis de la resistencia a la insulina es la obesidad y la acumulación de tejido graso visceral.

45 Un síndrome que acompaña a la resistencia a la insulina es la diabetes mellitus tipo 2. Además, la importancia de la resistencia a la insulina se basa en el hecho de que puede considerarse como una posible causa subyacente del síndrome metabólico (Reaven 1988, Balkau 1999, Alberti 1998).

50 Se ha propuesto que los periodos de euglucemia durante en un periodo de mejoría podrían tener efectos a largo plazo (aprox. 6-12 meses), y algunos de estos pacientes podrían mantener un buen control glucémico sin necesitar agentes antidiabéticos orales o podrían retrasar la necesidad de insulina. Algunos datos también sugieren que este enfoque fue más eficaz en pacientes que eran menos resistentes a la insulina (Ryan 2004, Yoshioka 2004). La base de este fenómeno no ha sido clarificada todavía, algunos datos sugieren que es por la mejora a largo plazo de la función de las células  $\beta$ , otros dicen que la mejora a la resistencia a la insulina y otros sugieren que es por la presencia de ambos después de una euglucemia transitoria.

55 Se sabe que la unión de la insulina al receptor de insulina provoca la auto-fosforilación del receptor, el cual inicia una cascada de señalización compleja con muchos puntos claves de la fosforilación de tirosina (Chang 2010). Por medio de la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-K)/Akt (proteína quinasa B), la insulina induce efectos metabólicos

(Transportador de Glucosa 4 -GLUT 4- que regula el transporte a la membrana celular) y la vasodilatación (producción de NO) y posee un efecto intrínseco anti-inflamatorio (Avogaro 2008).

5 La insulina puede ejercer, sin embargo, sus acciones vía una ruta más: que implica la cascada de MAP quinasa que es capaz de promover la proliferación celular. El impedimento selectivo de la primera ruta resulta en una disminución del efecto metabólico y vasodilatador de la insulina. Mientras tanto, los efectos de la insulina se desplazan hacia la segunda ruta (es decir, hacia la proliferación celular), lo que explica parcialmente una tasa más alta de malignidades observadas en la diabetes y en la resistencia a la insulina (Avogaro 2008). Por lo tanto, una intervención en donde los efectos de la insulina vía la ruta de PI3 quinasa- Akt(PKB) se mejoran resultaría en un efecto inverso, es decir, que los efectos de la insulina se desplazarían desde la proliferación celular hacia la actividad metabólica y vasodilatadora. Por lo tanto, dicha intervención no solo podría mejorar las condiciones metabólicas y vasoreactivas, sino que debería conducir a una tasa menor de la proliferación celular (una condición relacionada con la resistencia hormonal en el contexto de la presente invención).

15 La resistencia a la insulina se ha asociado con una reducción en la fosforilación (actividad) de moléculas de señalización de la insulina (Kanety 1995). El sistema de señalización entre el receptor de insulina y Akt podría estar afectado. En presencia de una resistencia a la insulina, la señalización de la insulina junto con la ruta PI3K/Akt se impide selectivamente.

Akt puede ser activado a través de diferentes rutas de señalización, el efecto de insulina en la absorción de glucosa implica a IRS-1 y PI3K y conduce a la fosforilación de Ser(473) de Akt. Los agentes oxidantes pueden tener un impacto en la señalización de la insulina en diversos modos.

20 El estrés oxidativo puede influir en la respuesta de la insulina, sin embargo, es muy importante distinguir entre los efectos agudos y crónicos del estrés oxidativo. Por ejemplo, Wu *et al*, mostraron que una ráfaga de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aguda conduce a una mejor respuesta y señalización de la insulina, mientras que niveles crónicamente elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conducen al bloqueo de la misma ruta de la señalización (Wu 2005).

25 Una larga exposición de células a ERO causa una disminución de la activación específica de compartimento de PI3K, dando como resultado una disminución de la translocación de GLUT-4 (Rudich 1998). Además, la disminución inducida por FFA en la fosforilación de Akt podría revertirse por siRNA contra NOX2, sugiriendo un papel de ERO en la inhibición de la ruta de Akt (Yuan 2010). Otra ruta activada por el estrés crónico oxidativo es vía la fosforilación de JNK que puede conducir a una Ser-fosforilación inhibitoria y a la subsecuente degradación de IRS-1 que induce la inhibición de la señalización mediada por Akt (Berdichevsky 2010).

30 La enzima que cataliza la conversión de Phe → p-Tyr, la Phe-hidroxilasa, es muy abundante en el riñón. Los inventores de este grupo han mostrado previamente que en el plasma de pacientes con ERC con enfermedad renal crónica los niveles de para-tirosina urinaria disminuye (Molnar *et al*. 2005a). Además, los pacientes con ERC o fallo renal tienen preferiblemente resistencia hormonal. La ERC puede ser una condición con menores niveles de p-Tyr, y mayores niveles de los aminoácidos anormales, m- y/o o-Tyr. Por lo tanto, la relación entre los aminoácidos anormales vs. fisiológicos, es decir, la relación m-Tyr/p-Tyr o o-Tyr/p-Tyr es altamente anormal. Es posible que los pacientes con ERC y tales proporciones de aminoácidos anormales se pudieran beneficiar especialmente de la mencionada intervención.

35 Recientemente, Zecchin *et al*. han mostrado que la acetilcolina (ACh) induce la rápida fosforilación de tirosina y la activación de Janus quinasa 2 (JAK2) en la aorta de rata y a su vez, bajo la activación de JAK2, se detecta la fosforilación de tirosina del sustrato del receptor de insulina (IRS)-1. Además, la ACh induce las asociaciones de JAK2/IRS-1 y IRS-1/fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa, la activación posterior de Akt/proteína quinasa B, óxido nítrico sintasa (eNOS) de células endoteliales, y la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK)-1/2. Los resultados apoyan que la ACh también estimula la ruta de transducción de señal para la activación de IRS-1/P1 3-quinasa/Akt/eNOS y ERK1/2 por medio de la fosforilación de tirosina de JAK2 en los vasos sanguíneos. Los autores sugirieron que en la aorta de ratas obesas, no hay solo resistencia a la insulina sino que también resistencia a la ACh, probablemente mediada por una ruta de señalización común.

40 El modelo de los inventores se centra en imitar un alto estado de estrés oxidativo crónico, donde las proteínas exhibirían un alto contenido de los aminoácidos oxidados, m- y o-Tyr. Los resultados obtenidos verificaron que en línea con los hallazgos de la disminución de la absorción de glucosa, la adición de m-Tyr y o-Tyr inhibió la Akt-fosforilación inducida por insulina, de modo similar al alto ambiente de glucosa. Por lo tanto, la inhibición de la ruta de Akt por m- y o-Tyr proporciona una explicación de la menor absorción de glucosa, es decir, el estado de la resistencia de insulina de los adipocitos. Por tanto, la incorporación de m- y o-Tyr interfiere con la señalización de la insulina debido a una perturbación de la fosforilación de la proteína Tyr. Por consiguiente, p-Tyr y sus análogos no fisiológicos, m- y o-Tyr, están en competición y así el efecto negativo de la formación de los últimos aminoácidos puede revertirse mediante la administración de p-Tyr y la intervención usando p-Tyr podría mejorar los efectos de la insulina vía la ruta PI3 quinasa- Akt(PKB). En este caso, los efectos de la insulina se desplazarían desde la proliferación celular hasta la actividad metabólica y vasodilatadora. Por lo tanto, dicha intervención podría no solo mejorar las condiciones metabólicas y la vasoreactividad, sino que también podría conducir a una menor tasa de proliferación celular y como consecuencia a una menor incidencia de malignidades.

Además, se ha encontrado por los presentes inventores que ERO tiene una función en la resistencia a la ACh también. Por tanto, se contempla que p-Tyr tiene un efecto beneficioso en el que la hiporespuesta de ACh afecta a la ruta de IRS-1/PI 3-quinasa/Akt.

5 Otro ejemplo de una hormona cuyo efecto está impedido por el estrés oxidativo y ERO es la eritropoyetina (EPO). La transducción de señal del receptor de eritropoyetina (EPO-R) está bien descrita. El receptor se activa en ocho dominios de tirosina citoplasmática y continuado en la señal posterior de la ruta de JAK2/STAT1-5. La actividad de JAK2 es también regulada por la fosforilación de tirosina. Sin vincularse a ninguna teoría, parece que la desintegración de m- u o-tirosina en las enzimas de la ruta de señalización cambia el resultado intracelular de la activación del receptor, jugando el mayor papel en la respuesta de EPO.

10 Los presentes inventores han aplicado un modelo de resistencia hormonal y han encontrado un aumento de Akt y el consecuente aumento de la absorción de glucosa en el efecto de EPO en adipocitos 3T3-L1. La influencia del tratamiento crónico de m- o o-tirosina en el efecto de EPO sobre la absorción de glucosa y la transducción de señal de adipocitos ha sido confirmada. De acuerdo con el mayor nivel de o-tirosina de la orina en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) los inventores asumieron que el nivel de o-tirosina de la orina muestra una correlación negativa con la respuesta de EPO. Un grupo de experimentos *in vivo* usando modelos animales se lleva a cabo con este propósito.

15 Como se detalla a continuación, se encontró que el mecanismo fundamental detrás de la resistencia de EPO es similar al de la resistencia a la insulina relacionada con el estrés oxidativo, y se contempla el tratamiento mediante la p-Tyr. Otros precursores de p-Tyr resultantes en p-Tyr en el sujeto u organismo que se trata son igualmente aplicables.

20 Como condiciones y enfermedades ilustrativas, la anemia es una complicación común en pacientes que padecen una enfermedad renal crónica (ERC). La eritropoyetina humana recombinante (r-hu-EPO) se usa en la ERC desde 1989, dando como resultado una mejora de la calidad de vida. Aproximadamente el 10 % de los sujetos que reciben r-hu-EPO son hiposensibles, asociado a un aumento del riesgo de muerte [van der Putten *et al* 2008]. Las razones de la resistencia de EPO no están claramente investigadas. Van der Putten *et al.* señalaron el papel de la proteína que contenía SH<sub>2</sub> inducible por citoquina (CIS), sobrerregulada por citoquinas inflamatorias, que se une al receptor de EPO (EPO-R) e inhibe la proliferación celular dependiente de EPO; o la influencia de fosfatasa de células hematopoyéticas (HCP) en la inhibición de la transducción de la señal de EPO-R.

La presente invención proporciona ahora un tratamiento y una prevención para pacientes resistentes a EPO.

30 Al estudiar la vasorelajación provocada por insulina en el segmento torácico y abdominal de la aorta y en las arterias renal y femoral, se comprobó que la respuesta frente a la insulina disminuía significativamente en la aorta abdominal, arterias femoral y renal de animales tratados con m- y o-Tyr comparado con el control o grupos p-Tyr. Los experimentos sugieren que mientras m- y o-Tyr dan como resultado resistencia a la insulina, esto puede revertirse mediante la administración de p-Tyr.

35 Como se sugiere antes, no solo p-Tyr es aplicable como agente competitivo de acuerdo con la presente invención. P-Tyr se forma también enzimáticamente bajo circunstancias fisiológicas vía dos rutas. Por un lado, puede sintetizarse a partir de p-OH-fenil-piruvato mediante la conversión simultánea de tirosina transaminasa de L-glutamato a 2-ceto-glutarato. A su vez, se forma p-OH-fenil-piruvato a partir de p-fenilalanina mediante p-fenilalanina 4-hidroxilasa. Por otro lado, la fenilalanina se convierte en p-Tyr mediante la fenilalanina-4-hidroxilasa, por lo tanto, los precursores corriente arriba de esta ruta, es decir, el fenil-piruvato y el p-fenilalanina son también precursores de p-Tyr.

40 Indicando que el estrés oxidativo está implicado en la producción anormal de aminoácidos, el radical hidroxilo convierte la L-fenilalanina en m-tirosina y o-tirosina. Así, el p-fenilalanina, fenil-piruvato y L-Phe no son precursores apropiados de p-Tyr útiles en la presente invención. El p-OH-fenil-piruvato, sin embargo, como un precursor directo de p-Tyr puede ser un sustituto útil del mismo. Preferiblemente se administra y se suministra junto con L-glutamato siendo un sustrato común de la tirosina transaminasa.

45 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, una condición debida a la resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo puede prevenirse, mejorarse o tratarse administrando un compuesto o una dosis farmacéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado de p-Tyr y p-OH-fenil-piruvato o sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde dicho p-OH-fenil-piruvato se metaboliza en p-Tyr en dicho sujeto. Preferiblemente, la condición es una condición como se define en la Breve Descripción de la Invención. Preferiblemente, dicha condición se previene o mejora, preferiblemente se previene, administrando p-Tyr o p-OH-fenil-piruvato.

El estado de estrés oxidativo en un paciente puede evaluarse o diagnosticarse midiendo o detectando el nivel de un marcador del estrés oxidativo en una muestra biológica obtenida a partir de dicho paciente.

55 Las enfermedades por estrés oxidativo [como la diabetes mellitus (DM), enfermedad renal crónica (ERC), obesidad (OB), hipertensión (DM), síndrome de la apnea obstructiva del sueño (OSAS)] conducen a la formación de varias especies reactivas con oxígeno (ERO) y macromoléculas derivadas de radical (como o-Tyr). En particular, en el

contexto de la invención, se forma el radical libre de hidroxilo (OH). Estas especies son capaces de activar numerosos procesos intracelulares, entre otros pueden conducir a la activación del factor nuclear kappa B (NFkB).

La activación de NFkB, a su vez, conduce a un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias. Tal proceso resulta en una inflamación subclínica, que puede ser indicada por un nivel mayor de lo normal o aumentado de la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP). Como una explicación no vinculante, las citoquinas pro-inflamatorias son capaces de promover la activación de NADPH-oxidasa vía sus receptores de citoquina celulares. Los datos también sugieren que la propia CRP puede activar a la NADPH-oxidasa. La activación de NADPH-oxidasa es responsable de una mayor producción de ERO, es decir, de estrés oxidativo. Por tanto, puede comenzar un círculo vicioso (una retroalimentación anticipada o positiva) (Figura 1). Como consecuencia, la administración del compuesto de la invención, aunque puede no ser suficiente para revertir la enfermedad después de que la resistencia hormonal se desarrolle, puede prevenir bien, tanto totalmente como parcialmente como exacerbación posterior o puede prevenir, tanto totalmente como parcialmente, la aparición de síntomas de fases posteriores de enfermedad de resistencias hormonales.

Un marcador del estrés oxidativo es, por ejemplo, el nivel de o-Tyr, preferiblemente cuando se mide en la orina de pacientes como se describe en Molnár *et al.* (Molnár *et al.* 2005a). Típicamente, en la orina de pacientes expuestos a estrés oxidativo el nivel de o-Tyr se eleva a al menos 1,5 veces o al menos 2 veces o al menos 2,5 veces o al menos 3 veces o al menos 4 veces o al menos 5 veces o al menos 6 veces o al menos 8 veces o de 2 a 10 veces, o de 5 a 10 veces o de 8 a 20 veces del nivel o intervalo normal. Típicamente, en la excreción de o-Tyr urinaria de pacientes expuestos a estrés oxidativo el nivel de o-Tyr es de al menos 0,5 umol/día o al menos 1 umol/día o al menos 1,5 umol/día o al menos 2 umol/día o al menos 2,5 umol/día o de 0,4 a 10 umol/día o de 0,5 a 10 umol/día o de 1 a 8 umol/día o de 2 a 10 umol/día. El nivel o la excreción diaria de oTyr pueden medirse por métodos conocidos en la técnica. Una posibilidad alternativa es medir m-Tyr en la orina de los pacientes.

Otro marcador del estrés oxidativo aplicable en la presente invención es un aumento en el marcador inflamatorio proteína C-reactiva (CRP), en particular la CRP de alta respuesta (hsCRP) [Abramson J L *et al.* (2005)]. Los inventores han encontrado que el estrés oxidativo puede ser determinante de los niveles de CRP y promover los procesos inflamatorios pro-ateroscleróticos en las etapas tempranas del desarrollo de CHD. También se ha encontrado que los niveles de CRP están asociados al estrés oxidativo mientras que hay interrelaciones significativas entre la inflamación, el estrés oxidativo y los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales [Dohi J *et al.* (2007)]. Los niveles de CRP o hsCRP pueden medirse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por un método como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones: [Abramson J L *et al.* (2005); Yasunari K *et al.* (2002); Dohi J *et al.* (2007)]. Típicamente, el nivel de hsCRP de pacientes que se tratan con el compuesto de la invención o en los que se va a aplicar prevención muestran un nivel de hsCRP de al menos 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 75% o al menos 90% del límite superior del intervalo normal de pacientes saludables que muestran un riesgo mayor del estado de estrés oxidativo y por ello del desarrollo de resistencia hormonal. Preferiblemente, un paciente expuesto a estrés oxidativo tiene un nivel de hsCRP elevado en al menos 1,2 veces o al menos 1,5 veces o al menos 2 veces o al menos 2,5 veces o al menos 3 veces o al menos 4 veces del nivel o intervalo normal.

Otro marcador aplicable del estrés oxidativo es la prueba del radical libre de oxígeno (FORT), que refleja niveles de hidroperóxidos orgánicos y muestra una buena correlación con el nivel de hsCRP [Abramson J L *et al.* (2005)].

Otros marcadores oxidativos y métodos para su evaluación se describen en las siguientes publicaciones de revisión: [Naito Y *et al.* (2010); Stephens J W. *et al.* (2009); Ogino K y Wang D-H. (2007)].

Las formulaciones de p-Tyr como composición farmacéutica o como medicamento, opcionalmente con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable son conocidas en la técnica. Preferiblemente, la especificación del producto, prospecto para el paciente o información para los médicos comprende información sobre la condición que se trata, previene o mejora con la formulación que comprende el compuesto de la invención, como se define en este documento. Además, son también conocidas en la técnica formulaciones como suplementos dietéticos, suplementos alimenticios, productos nutracéuticos, alimentos funcionales, alimentos o composiciones. La invención también se refiere a estos productos para uso en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición como se estipula en este documento. En esta realización, el uso del producto se indica en la etiqueta, en un prospecto o anuncio relacionado con dicho producto. En particular, cualquiera de estos productos puede ser acompañado por una propiedad saludable. Por ejemplo, como se estipula en la Regulación (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de Diciembre de 2006 sobre propiedades de nutrición y salud hecha sobre alimentos, una "propiedad de salud" significa cualquier propiedad que establece, sugiere o implica que existe una relación entre una categoría de alimento, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud; y una particular "reducción de la propiedad del riesgo de enfermedad" significa cualquier propiedad de la salud que establece, sugiere o implica que el consumo de una categoría de alimento, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo en el desarrollo de una enfermedad en un ser humano. Las regulaciones sobre objetivos similares y el sujeto pueden ser válidos en otros países o regiones geográficas y las propiedades de salud o indicaciones análogas pueden sugerir que el compuesto para uso de acuerdo con la invención es beneficioso en una condición como se describe en este documento. Estos productos para usar están dentro del alcance de la presente invención.

Preferiblemente, la prevención, la mejora o el tratamiento de dicha condición comprende, consiste o es parte de un régimen (personalizado) o programa de administración dirigido a dicho sujeto.

Por ejemplo, el compuesto puede usarse en un paciente en riesgo de resistencia hormonal, es decir, en una condición de aumento del estrés oxidativo.

- 5 Por ejemplo, el compuesto puede usarse antes de que aparezcan los síntomas de la diabetes, por ejemplo, para la prevención de IGT y DM (monoterapia).

10 En la diabetes, el compuesto o la formulación puede usarse en combinación con agentes antidiabéticos orales y parenterales (por ejemplo, sulfonilureas, biguanidas, glitazonas, inhibidores de DPP-4, miméticos de incretina, inhibidores de alfa-glucosidasa, glinidas (meglitinidas), inhibidores de SGLT-2) y con insulina para pacientes resistentes a la insulina.

15 En pacientes con hipertensión, el compuesto o la formulación puede usarse en combinación con agentes antihipertensivos (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, agentes bloqueantes del receptor de angiotensina, inhibidores de renina directos, diuréticos, agentes bloqueantes del canal de calcio, agentes bloqueantes del receptor de alfa-1, agentes bloqueantes del receptor de Beta, vasodilatadores directos, fármacos antihipertensivos que afectan al sistema nervioso central).

Los pacientes con hipertensión pueden ser preferiblemente pacientes resistentes a la insulina y/o pacientes con resistencia a la eritropoyetina y/o pacientes con resistencia a la acetil-colina.

20 En una realización preferida, la aportación diaria de dicho compuesto se proporciona administrando una, dos o tres veces la dosis usual de p-Tyr o una dosis como se muestra en la sección Breve Descripción de la Invención o una formulación que comprende una dosis equivalente a la aportación diaria hasta 30000 mg con la condición de que la preparación de dicha dosis individual sea apropiada para la administración y pueda ser manejada de forma razonable.

25 Se debe decir aquí que la p-Tyr puede interferir con otros fármacos, por ejemplo, podría disminuir la efectividad de L-dopa y puede ser aconsejable la separación de las dosis de administración. Además, p-Tyr puede aumentar el efecto de fármacos que influyen en el metabolismo de la dopamina.

Como resumen, los inventores encontraron que o- y m-Tyr causan resistencia hormonal para hormonas de la ruta de Akt, por ejemplo, en el caso de insulina y eritropoyetina y acetilcolina, lo que puede ser revertido mediante la administración de p-Tyr y sus derivados, análogos y precursores metabolizados en p-Tyr en el cuerpo.

## EJEMPLOS

### 30 Materiales y Métodos

#### Materiales básicos

Insulina, epinefrina, para-, meta-, orto-tirosina y  $Mg_2SO_4$  fueron comprados en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO 63178, EE.UU.). NaCl, KCl,  $KH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$ , glucosa y  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  fueron comprados en Merck (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania).

### 35 Cultivo celular

40 Los cultivos primarios de fibroblastos de embrión de ratón (3T3-L1) fueron comprados en ATCC (Manassas, EE.UU.). Los pasos iniciales de los fibroblastos 3T3-L1 fueron cultivados en medio Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM, Invitrogen, Número de cat.: 41966-029; Sigma Aldrich Número de cat.: D6046) suplementado con 10% Suero Bovino Fetal (Gibco, Número de cat.: 16170-078), penicilina a 100U/ml y estreptomycin a 0,1 mg/ml (Gibco, Número de cat.: 15070-063) y p-, m-, o o-Tyr 398 nM. El DMEM contenía glucosa 25 o 5 mM (dependiendo del experimento), L-glutamina y piruvato. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C y  $CO_2$  al 5%. El medio de diferenciación consistió en DMEM suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) (FBS, Gibco, Csertex, Budapest, Hungría, Número de cat.: 10106-169), al que se añadió un cóctel que contenía isobutilmetilxantina 0,5 nM (Sigma Aldrich, Número de cat.: I 5879), insulina 0,17 nM (Sigma Aldrich, Número de cat.: I 9278) y dexametasona 250 nM (Sigma Aldrich, Número de cat.: 861871). Desde el día 4 en adelante, las células se mantuvieron en DMEM /FBS al 10% que contenía insulina a 1,5 g/ml con un cambio de medio cada día alterno hasta que los tratamientos experimentales fueron iniciados. Para todos los tratamientos, las células se incubaron toda la noche en medio sin suero después de que el 90% de la población de células alcanzara el fenotipo de adipocito.

50 El tratamiento experimental se logró en medio sin suero que contenía insulina a 200 o 400 nmol/l, durante 5 minutos. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con solución salina (4°C) para eliminar cualquier traza del medio, después se expuso a 80  $\mu$ L de tampón de lisis/placa, que contenía Tritón X a 1,15%, Trisbase 1M, pH 7,4, EDTA 0,5 M, pH 8, EGTA 0,2 M, pH 7, ditiotreitil 0,1 M (DTT), fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 5 mg/ml (PMSF),  $Na_3VO_4$  0,1 M, leupeptina a 5 mg/ml, aprotinina a 5 mg/ml, Coctel 1 y 2 de Inhibidor de fosfatasa (Sigma Aldrich,

Número de cat.: P2850 y P5726). Los adipocitos se separaron por raspado mecánicamente y luego se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Los cultivos primarios de células de ratón endoteliales (EC) del endotelioma fueron comprados en LGC Promochem (Taddington, Reino Unido). Los ECs se cultivaron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco, Csertex, Budapest, Hungría) suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (Gibco, Número de cat.: 16170-078), mezcla al 2% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Número de cat.: 15070-063) y p-Tyr a 400  $\mu\text{mol/l}$  (Control), o p-Tyr a 800  $\mu\text{mol/l}$  (p-Tyr), o m- a 400  $\mu\text{mol/l}$  y p-Tyr a 400  $\mu\text{mol/l}$  (m-Tyr), u o- a 400  $\mu\text{mol/l}$  y p-Tyr a 400  $\mu\text{mol/l}$  (o-Tyr). El medio se cambió cada 2 días. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a  $37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5%. Después de 7 días los ECs se separaron por raspado mecánicamente y luego se usaron para el análisis por HPLC.

#### 10 Absorción del isótopo

Las células se incubaron en DMEM sin glucosa (Gibco, Csertex, Hungría) durante 30 minutos, luego se trataron con insulina a 2, 20, 200 ó 400  $\text{nmol/l}$  durante 100 minutos. Simultáneamente, se añadió a las placas durante 100 minutos desoxi-D-glucosa 2-[1- $^3\text{H}$ (N)] a 1  $\mu\text{Ci/ml}$  ( $3,7 \times 10^4 \text{Bq/ml}$ ) (Izotóp Intézet, Hungría). Las células se rasparon dentro del medio y se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm. El sedimento se disolvió en 70  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis y la absorción de glucosa se evaluó por recuento por escintilación midiendo 30  $\mu\text{l}$  de la muestra con un contador LS 5000 TD de Beckman en conteos por minuto (CPM) durante cinco minutos cada uno, usando una actividad promedio como el resultado. Las muestras se congelaron toda la noche a  $-70^{\circ}\text{C}$  y la concentración de proteína se midió usando un espectrofotómetro Hitachi. Los resultados se normalizaron según el contenido de proteínas (Kaddai 2009).

#### 20 Análisis de la incorporación del isómero de tirosina; Análisis HPLC

La preparación de la muestra fue diferente dependiendo del tipo de tirosina que se quería determinar. Los métodos se basaron en publicaciones recientes con modificaciones (Molnár 2005a, Molnár 2005b). Para medir el contenido total de tirosina celular unida a proteína, después de añadir 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada, las muestras se congelaron toda la noche a  $-70^{\circ}\text{C}$  para lograr la lisis celular. Después de calentar y una centrifugación a 4000 rpm, durante 10 minutos, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 60% a 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se incubó en hielo durante 30 minutos, para precipitar las proteínas. Después de la segunda centrifugación a 4000 rpm, durante 10 minutos, el sedimento se resuspendió en ácido tricloroacético al 1% y 4  $\mu\text{l}$  de desferrioxamina a 400  $\text{mmol/l}$  y se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de hidroxitolueno butilado a 500  $\text{mmol/l}$  a las muestras para evitar la posible formación de radicales libres durante la hidrólisis. Después se añadieron 200  $\mu\text{l}$  o 400  $\mu\text{l}$  de ácido clorhídrico 6N, y se realizó durante toda la noche la hidrólisis ácida de las proteínas a  $120^{\circ}\text{C}$ . El hidrolizado se filtró después a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Billerica, MA, EE.UU.) y 20  $\mu\text{l}$  del filtrado se inyectaron en la columna de HPLC de un sistema HPLC Clase LC-10 ADVP de Shimadzu (Shimadzu EE.UU. Manufacturing Inc., Canby, OR, EE.UU.) usando un inyector manual de Rheodyne.

El contenido de tirosina total celular unido a proteína de los ECs se midió mediante un método similar con las siguientes diferencias: Después de añadir 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada, las muestras se sonicaron 2 minutos con un homogenizador ultrasónico para lograr la lisis celular. A la adición de 100  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 60% se siguió una centrifugación y una resuspensión como se describe anteriormente. Después de la resuspensión se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 60%. Después de la segunda centrifugación como se describe anteriormente, el proceso anterior se repitió una vez más de nuevo. Finalmente, 4  $\mu\text{l}$  de sedimento de desferrioxamina a 400  $\text{mmol/l}$  y 40  $\mu\text{l}$  de hidroxitolueno butilado a 500  $\text{mmol/l}$  se añadieron al sedimento para evitar la posible formación de radicales libres durante la hidrólisis. Después, se añadieron a las muestras 400  $\mu\text{l}$  de ácido clorhídrico 6 N.

Para medir el contenido de tirosina total de proteína no unida intracelular, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada a las muestras antes de que se congelaran toda la noche a  $-70^{\circ}\text{C}$  para lograr la lisis celular. Las muestras se calentaron y se centrifugaron durante 15 minutos a 15 000 rpm. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 60% a 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante. Después de 30 minutos de incubación en hielo, las muestras se centrifugaron de nuevo durante 15 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante se filtró en el modo mencionado más arriba, se diluyó 5 veces y se añadieron 160  $\mu\text{l}$  de agua destilada a 40  $\mu\text{l}$  del filtrado, que se inyectaron en la columna de HPLC.

Para la determinación del contenido de tirosina de la pared vascular, se usó el método modificado de Molnár *et al.* (Molnár 2005b). Las secciones proximales se hidrolizaron en tubos de polipropileno protegidos con un anillo O y bien cerrados. Cuatro  $\mu\text{l}$  de desferrioxamina a 400  $\text{mmol/l}$  (concentración final: 3,6  $\text{mmol/l}$ ) y 40  $\mu\text{l}$  de hidroxitolueno butilado a 500  $\text{mmol/l}$  (concentración final: 45  $\text{mmol/l}$ ) se añadieron a las muestras. Después, se añadieron a las muestras 200  $\mu\text{l}$  de ácido clorhídrico 6 N.

Los inventores realizaron durante toda la noche la hidrólisis ácida de las proteínas obtenidas de los ECs y las arterias a  $120^{\circ}\text{C}$ . El hidrolizado se filtró después a través de un filtro de 0,2  $\text{mm}$  (Millipore Co., Billerica, MA, EE.UU.) y se inyectaron en la columna de HPLC 20  $\mu\text{l}$  del filtrado.

Se usó autofluorescencia de p-, m- y o-Tyr y Phe para medir sus cantidades en las muestras. Por tanto, no fue necesaria ninguna tinción o derivatización. Las muestras se corrieron en un sistema HPLC Class 10aDVP de Shimadzu equipado con un detector fluorescente RF-10 AXL (Shimadzu EE.UU. Manufacturing Inc., Canby, OR,

EE.UU.) opcionalmente usando un inyector manual de Rheodyne. La fase móvil consistió en ácido acético al 1 % y acetato de sodio al 1 % disueltos en agua, la separación tuvo lugar en una columna LiChroCHART 250-4 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania), en una ronda isocrática. Se usaron longitudes de onda de excitación de 275 nm y de emisión de 305 nm para medir p-, m- y o-Tyr, mientras que Phe se detectó a longitudes de onda de excitación de 258 nm y de emisión de 288 nm. La determinación del área bajo la curva (AUC) y el calibrado estándar externo se usaron para calcular las concentraciones exactas de los aminoácidos. En algunos casos el tiempo de elución de las sustancias también fue verificado por el método de adición del máximo estándar. Las concentraciones de aminoácido se corrigieron para las concentraciones de tirosina total o fenilalanina.

#### Análisis de transferencia Western

Las muestras de los lisados de EC se sonicaron (2 min) y se centrifugaron (10 min, 13.000 rpm, a 4°C). El contenido de proteína de las muestras se determinó por el método Bradford usando albúmina de suero bovino como un Bio-Rad Benchmark Plus estándar. Las muestras se solubilizaron en un tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), dodecil sulfato de sodio al 4,0% (SDS), glicerol al 20%, DTT 200 mM, y azul de bromofenol al 0,2%. Las muestras (de 80 a 120 g de proteína) se sometieron a electroforesis resuelto en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron en un tampón (pH 8,3) que contenía glicina 38 mM, Tris-base 48 mM, y metanol al 20% a membranas de PVDF (Amersham-Biotech, AP Hungría, Budapest, Hungría) durante 90 min a 250 mA.

Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos monoclonales de inmunoglobulina G (IgG) diluidos 1:1000 en TBS-T (0,1%), que contenía suero bovino al 5% (BS). Se usó primero anticuerpo para anti-fosfo-(Ser473)-Akt (pAkt, Ser473, #9271, 1:1000, Cell Signal Technology, Beverly, EE.UU.). Las membranas se lavaron con TBS-T al 0,1% y se incubaron en anticuerpo secundario de IgG conjugado con peroxidasa diluido en leche sin grasa al 5% a 1:2000 con policlonal anti-conejo (Cell Signal Technology, #7074) para detectar anti-fosfo-(Ser473)-Akt. Para resondar las transferencias Western con anticuerpos primarios alternativos para el PKB/Akt total (#9272, Cell Signal Technology, Beverly EE.UU.), las membranas fueron despegadas como sigue: las membranas se lavaron en TBS-T al 0,1% durante 10 minutos, después se pusieron en tampón de despegamiento, que contenía glicina al 1,5%, SDS al 0,1%, Tween-20 al 1% a pH:2,2, para 2x10 mm, luego se lavaron en agua destilada. Las transferencias se detectaron usando quimioluminiscencia potenciada (ECL; Pierce Biotech, Bio-Rad, Budapest, Hungría). La densitometría computarizada (densidad óptica integrada) de las bandas específicas se analizó con Scion Image para Windows Software. Las expresiones de proteína se corrigieron para los niveles de proteína total Akt y se ajustaron para los controles.

Los ensayos de sangre y orina de rutina se llevaron a cabo en el Departamento del Laboratorio de Medicina de la Universidad Pécs Medical School de acuerdo con procedimientos de laboratorio clínicos estándar.

#### Animales y preparación de los tejidos

Los experimentos se llevaron a cabo con el permiso del Comité de Experimentación Animal Local Húngaro. Brevemente, después de destetar ratas CFY macho (una cepa de la rata Sprague-Dawley), se colocaron en celdas individuales y se mantuvieron con dieta regular. Después de dos horas de ayuno de los animales (de 4-5 semanas, 80-140 g) se les suministró para-, meta- o orto-tirosina a 1,76 mg/die (p-, m-, o-tyr; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO 63178, EE.UU.) disueltos en solución salina o vehículo (solo solución salina) por alimentación forzada (por boca) seis días de la semana. Después de un mes de tratamiento, los animales fueron todos anestesiados con éter y se decapitaron con una guillotina o la suplementación de p-, m-, o-tyr y vehículo se paró (periodo "de lavado") y se sacrificaron dos semanas más tarde (Figura 8.A). La aorta torácica descendiente y abdominal, y las arterias renal y femoral se retiraron y se limpiaron de tejido conjuntivo (Figura 19). Las secciones se hidrolizaron inmediatamente para hacer el análisis HPLC o se usaron para los estudios de reactividad vascular.

En otros estudios de incorporación del isómero de tirosina, se usaron 18 Ratas Sprague-Dawley macho (de 5-6 semanas) para estudiar los efectos de la suplementación de p-Tyr y o-Tyr crónicos orales de ratas en el nivel de o-Tyr y relajación inducida por insulina de segmentos arteriales aislados. A las ratas se les suministró oralmente 1,76 mg/die de p-Tyr u o-Tyr o vehículo durante seis días por semana durante cuatro semanas. Las ratas tratadas con p-Tyr, o-Tyr o vehículo casi triplicaron su peso corporal, pero no hubo diferencia entre los grupos. Al final de la semana cuatro de tratamiento, se realizaron los estudios de HPLC y vasomotores. En otro grupo de ratas, la suplementación de p-Tyr/o-Tyr fue parada durante cuatro semanas (periodo "de lavado"), después de lo cual se sacrificaron para los estudios de HPLC y vasomotores.

La preparación de vasos arteriales consecutivos se indica en la Figura 19.

#### Estudios de reactividad vascular

Se usó el método modificado de Fésüs *et al.* (Fésüs 2007). Las partes distales de los vasos se diseccionaron en segmentos de 2 mm de longitud en tampón Krebs enfriado en hielo y se montaron anillos en dos cables de acero inoxidable (40  $\mu$ m en diámetro) en un Danish Multimyograph Modelo 610M (DMT-EE.UU. Inc., Atlanta, GA, EE.UU.). Los vasos se bañaron en tampón Krebs (que contenía NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 mM, glucosa 11,1 mM, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 1,6 mM, pH 7,4) y se pasó gas con CO<sub>2</sub> al 5% y O<sub>2</sub> al 95% a 37°C. La relación de circunferencia tensión en descanso/interna para cada vaso se determinó y luego la



circunferencia interna se ajustó a  $0,9 \times L100$ , donde L100 es la circunferencia interna cuyo vaso hubiera tenido *in vivo* al relajarse una presión transmural bajo de 100 mmHg. Después de este procedimiento de normalización, los vasos se dejaron estabilizar durante 30 min, y luego se midió la tensión isométrica de modo continuo. Los anillos se precontrayeron con epinefrina 100 nM. Después de alcanzar una meseta de contracción de estabilidad, se evaluaron las respuestas relajantes a dosis crecientes de insulina. La tasa de relajación se expresó como porcentaje de la contracción provocada por epinefrina (100%). Se añadieron para-, meta-, orto-tirosina o vehículo a la cámara del vaso 10 minutos antes de la adición de epinefrina y 30 minutos antes de la adición de insulina.

En una variante del método, se usaron p-, m- y o-Tyr de forma separada en los experimentos. En una otra variante del método se usaron tanto p- y o-Tyr como m- y o-Tyr juntos y los resultados se compararon con los datos obtenidos cuando los compuestos se usaban de forma separada para evaluar el efecto competitivo.

#### Estudios estadísticos

La significancia estadística se calculó usando la prueba de t de Student o ANOVA según era apropiado. Todas las distribuciones eran normales, los datos se expresan como promedios  $\pm$  SEM. Las pruebas se realizaron típicamente con ANOVA, prueba F extra suma-de-cuadrados, pruebas no paramétricas según era apropiado usando el paquete del programa SPSS, Versión 15.0 (SPSS Inc., 15 Chicago, IL, EE.UU.), y Prism 5 de GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.), considerando valores P de 0,05 o menos para ser significantes.

#### Resultados

##### Absorción de 2-desoxi-D-glucosa marcada con isótopo en células 3T3-L1

Los inventores midieron la absorción de 2-desoxi-D-glucosa marcada con isótopo en células 3T3-L1. En células cultivadas en medio que contenía p-Tyr + glucosa 5 mM, las concentraciones crecientes de insulina condujeron a un aumento en la absorción de desoxi-D-glucosa. En células cultivadas en medio que contenía p-Tyr + glucosa alta (25 mM), la insulina no consiguió aumentar la absorción de glucosa. De un modo similar a esto, no se pudo verificar el efecto de la insulina en células cultivadas en medio con glucosa normal (5 mM) pero con suplementación de m-Tyr o o-Tyr (Figura 2). Las células se cultivaron durante 11 días en cada experimento.

La capacidad de m-Tyr y o-Tyr de inhibir la absorción de glucosa inducida por insulina se encontró que era dependiente de la concentración. Aunque en las células cultivadas en p-Tyr y glucosa normal, la insulina (400 nM) condujo a un aumento de aprox. 2-veces en la absorción de glucosa (barra blanca y primera negra), con concentraciones crecientes de m-Tyr (Figura 3A) y o-Tyr (Figura 3B), la absorción de glucosa inducida por insulina disminuyó. A concentraciones equimolares de m-Tyr y p-Tyr u o-Tyr y p-Tyr (72-72 mg/l), la insulina no tuvo ningún efecto en la absorción de glucosa (últimas barras), sugiriendo una fuerte competición de los tres aminoácidos.

A partir de la figura puede observarse que p-Tyr estaría presente en aprox. 8-32-veces una concentración más alta que m-Tyr u o-Tyr en el medio para ser capaz de competir de forma eficaz con m-Tyr u o-Tyr.

Los inventores también analizaron si el efecto de m-Tyr y o-Tyr era dependiente del tiempo. Los inventores encontraron que la absorción de glucosa de la línea de base no mostraba un cambio considerable en las células 3T3-L1 cultivadas en m-Tyr- o medio que contenía o-Tyr. Sin embargo, la absorción de glucosa inducida por insulina se bloqueó por m-Tyr y o-Tyr, de una forma dependiente del tiempo (Figura 4A y 4B).

##### Efecto de m-Tyr y o-Tyr en la ruta de transducción de la señal de insulina

Los inventores investigaron el efecto de la adición de m-Tyr y o-Tyr al medio de las células en diferentes rutas de transducción de la señal. Los inventores encontraron que en las células cultivadas en p-Tyr y baja glucosa, las dosis crecientes de insulina condujeron a un aumento de 3 veces en la fosforilación de Akt (proteína quinasa B) comparado con los controles. En las células cultivadas en medio con alta glucosa con p-Tyr solo, la insulina indujo una fosforilación de Akt significativamente inferior. En las células cultivadas en m-Tyr u o-Tyr, la fosforilación de Akt no pudo ser significativamente potenciada por la insulina (Figura 5).

##### Absorción aguda de p-Tyr, m-Tyr y o-Tyr

En los antecedentes de los anteriores hallazgos los inventores realizaron la hipótesis de que los aminoácidos suministrados podían entrar en las células. Esta hipótesis también fue probada: después de diferentes tiempos de incubación, el contenido de p-Tyr, m-Tyr y o-Tyr total intracelular se midió usando HPLC. Los inventores encontraron que la suplementación con p-Tyr (Figura 6A), m-Tyr (Figura 6B) o o-Tyr (Figura 6C) podría elevar de forma eficiente los niveles del aminoácido respectivo en las células 3T3, tanto en medio normal como en glucosa alta, también como con o sin tratamiento de insulina.

##### Incorporación de m-Tyr y o-Tyr en proteínas celulares

También se probó, si la administración a largo plazo (11 días) del suministro de m-Tyr u o-Tyr conduce a un aumento de m-Tyr y o-Tyr incorporado de proteína. El contenido de p-Tyr se expresó como porcentaje del contenido de tirosina de proteína total, es decir, se calculó la relación  $p\text{-Tyr}/[(p\text{-Tyr})+(m\text{-Tyr})+(o\text{-Tyr})]$ . Se normalizaron m- y o-

Tyr respecto al contenido de Tyr total también. Las pruebas se llevaron a cabo tanto en ajustes experimentales de glucosa normal (5 mM) como en alta (25 mM). El crecimiento de las células en medio suplementado con m-Tyr u o-Tyr condujo a una disminución en los niveles de proteína p-Tyr bajo condiciones de glucosa normal y alta. El contenido de p-Tyr fue significativamente más alto en células suplementadas con m-Tyr cultivadas en medio de alta glucosa comparado con el medio de glucosa normal (Figura 7A). El contenido de m-Tyr de las células cultivadas en medio suplementado con m-Tyr fue significativamente mayor en células cultivadas en p- u o-Tyr, ambas en medio de glucosa 5 mM y 25 mM. En células cultivadas en medio de m-Tyr, el contenido de proteína m-Tyr fue significativamente menor en el ambiente de glucosa alta comparado con el medio de glucosa normal (Figura 7B). Cuando se investigó el contenido de la proteína o-Tyr, se encontró que era significativamente mayor en células suplementadas con p-Tyr cultivadas en medio de glucosa alta que en células cultivadas en medio de glucosa 5 mM. En células suplementadas con o-Tyr, la proteína o-Tyr fue significativamente mayor comparado con células suplementadas con p-Tyr o m-Tyr, tanto en medio de glucosa normal como alta (Figura 7C).

#### Presencia arterial de o-Tyr y sus efectos en la vasoactividad

En otro experimento, las aorta torácica descendente y abdominal y arterias femorales de ratas no tratadas fueron retiradas, limpiadas y usadas para su evaluación, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las secciones se hidrolizaron inmediatamente para hacer el análisis HPLC o se usaron para los estudios de la reactividad vascular. El contenido de o-Tyr de la línea de fondo de animales en ayuno (como una medida del estrés oxidativo) de diferentes vasos mostró un orden de rango de aorta torácica > aorta abdominal > arteria femoral (Figura 8, panel B, barras negras) y la respuesta a la insulina mostró un orden de rango opuesto de aorta torácica < aorta abdominal < arteria femoral (Figura 8, panel C, barras negras; las diferencias fueron significativas).

#### El impacto de la suplementación en los niveles de meta- y orto-tirosina en la pared vascular

En este experimento a las ratas les fueron administrados para-, meta- u orto-tirosina. Después de un mes de tratamiento, los animales o bien se sacrificaron o bien se les interrumpió la suplementación (periodo "de lavado") y se sacrificaron cuatro semanas después (Figura 8, panel A). Después de un mes de tratamiento con p-, m-, o-Tyr y vehículo los inventores midieron el contenido de tirosina de la parte torácica y abdominal de la aorta y las arterias renal y femoral. En cada arteria examinada los inventores observaron un nivel de o-Tyr significativamente más alto en el grupo tratado con o-Tyr comparado con el grupo control (Figura 8, panel B, barras blancas). Sin embargo, en este experimento no se encontró ninguna diferencia significativa entre el contenido de m-Tyr de los diferentes grupos (no se muestran los datos).

Los inventores determinaron si la suplementación sostenida *in vivo* de ratas con o-Tyr no tenía ningún impacto en la relajación inducida por insulina *ex vivo*. Los inventores obtuvieron una respuesta significativamente menor frente a la insulina en la aorta abdominal y arteria femoral de ratas tratadas con o-Tyr (Figura 8, panel C, barras blancas) comparado con el vehículo (barras negras) o los grupos tratados con p-Tyr (barras grises). En la aorta torácica, no hubo diferencias significativas entre los grupos de control y tratados con o-Tyr. En contraste, los inventores encontraron una mayor relajación en la respuesta frente a la insulina en la aorta torácica aislada de ratas tratadas con p-Tyr comparado con otros grupos (Figura 8C). Cuatro semanas después de la discontinuación de la suplementación de tirosina (8ª semana) se evaluaron los contenidos de o- y m-Tyr de los mismos vasos. No hubo diferencia significativa entre el contenido de o- y m-Tyr de los diferentes grupos (no se muestran los datos).

#### Incorporación de para-, meta- y orto-tirosina en las proteínas celulares de células endoteliales

Las hormonas producen el efecto vasoactivo induciendo la respuesta de las células endoteliales. Por tanto, los cambios de la composición del aminoácido de estas células pueden tener una función clave. En un experimento agudo, 30 minutos de incubación con los respectivos aminoácidos no condujeron a un cambio significativo en el contenido de p-, m- y o-Tyr de la proteína celular (Figura 9A, B y C).

En las proteínas celulares de ECs cultivadas en m-Tyr durante 7 días, hubo un contenido más alto relativo de m-Tyr comparado con células suplementadas con p-Tyr o control (Figura 10 B). De forma similar, en las proteínas de células tratadas con o-Tyr se midió un contenido más alto de o-Tyr comparado con ECs de p-Tyr o control (Figura 10 C). Las cantidades de p-Tyr relativas apenas reflejaron cambios en el contenido de m- y o-Tyr (Figura 10 A).

#### El impacto de la suplementación con para-, meta- y orto-tirosina en la vasorelajación inducida por insulina

Después de un mes de tratamiento (Figuras de 11 a 14, Paneles A), y un mes de lavado posterior (Paneles B) y en un experimento agudo, es decir, después de 30 minutos de incubación (Paneles C) se evaluaron la vasorelajación provocada por insulina en el segmento torácico y abdominal de la aorta y en las arterias renal y femoral (Figuras de 11 a 14). En la aorta torácica, que mostró el nivel más alto de o-tyr reflejando el estrés oxidativo intravascular-intramural más alto entre los cuatro vasos estudiados (Figura 8, panel B, barras negras), los inventores no observaron ninguna bajada significativa posterior de la respuesta frente a insulina con suplementación por m-, o o-Tyr en la semana 4 (Figura 11A). En contraste, hubo una respuesta de vasorelajación más alta frente a la insulina en la aorta torácica del grupo suplementado con p-Tyr comparado con los otros grupos sugiriendo una auténtica competición entre los aminoácidos (Figura 11A). Los inventores observaron que la respuesta disminuyó significativamente frente a insulina en el segmento del estado oxidativo más bajo (aorta abdominal y arterias

- femorales, véase Figura 8 panel B) de animales suplementados con m- y o-Tyr comparado con los animales control (Paneles A de las Figuras 12, 13 y 14). Además, en estas arterias los inventores no pudieron detectar ninguna diferencia significativa entre el control y p-Tyr y entre los grupos m- y o-Tyr (Figuras 12A, 13A y 14A). Los efectos crónicos fueron completamente abolidos mediante 4 semanas de lavado (Panel B de las Figuras 11, 12, 13 y 14) en todos los segmentos.
- 5 En el experimento agudo, después de 30 minutos de incubación con los respectivos aminoácidos, la vasorelajación permaneció invariable (Paneles C de las Figuras 11, 12, 13 y 14).
- Los valores de logEC<sub>50</sub> calculados de estos experimentos en la semana 4<sup>a</sup> (suplementación con p-, m- y o-Tyr crónico) se representan en la Figura 15.
- 10 Inversión del efecto de meta- y orto-tirosina endógena por la suplementación con para-tirosina en experimentos de vasorelajación inducida por insulina en la aorta torácica
- Como se observa en la Figura 15, la suplementación con p-Tyr crónica ha conducido a una mayor vasorelajación en la aorta torácica cuando se compara con los mismos vasos de los animales control (obsérvese la diferencia significativa entre la columna negra y primera gris de la aorta torácica en la Figura 15). Este dato sugiere que incluso en los animales control, hay un estrés oxidativo de fondo crónico que da como resultado una menor respuesta de insulina que puede ser parcialmente revertida mediante la administración de p-Tyr.
- 15 Parece que el nivel de o-Tyr es el más alto en la aorta torácica lo que está en relación con la resistencia hormonal. Por lo tanto, se sugiere por este experimento que el suministro en la aorta torácica de p-Tyr resulta en un reemplazo parcial de o-Tyr y una mejor vasorelajación. Esto funciona como modelo del efecto relacionado con la inversión de la resistencia hormonal causada por el estrés oxidativo en la aorta.
- 20 En otro experimento propuesto similar realizado *in vivo* se lleva a cabo la suplementación de ratas con o-Tyr y p-Tyr y se examina la respuesta frente a insulina en los mismos segmentos arteriales aislados. Se espera que la menor respuesta frente a insulina se invierta. Los efectos metabólicos de la suplementación con m- y o-Tyr también podrían ser estudiados usando visualización funcional. También, los potenciales efectos beneficiosos de la suplementación con p-Tyr podrían investigarse en ratas hipertensas espontáneas, ratas diabéticas obesas Zucker, ratas con minibombas de angiotensina-II o ratas que sufren nefrectomía 5/6.
- 25 Efecto del tratamiento antioxidante a corto plazo en la vasorelajación inducida por acetilcolina
- Se realizaron experimentos de vasorelajación con acetilcolina. Para el caso de la vasorelajación inducida por acetilcolina, los inventores encontraron una diferencia significativa entre los diferentes segmentos vasculares, es decir, la vasorelajación por Ach fue la más fácil de lograr en las arterias femorales, la respuesta frente a Ach fue significativamente menor en la aorta abdominal e incluso inferior en la torácica. El tratamiento con SOD y catalasa dio como resultado un cambio pequeño pero significativo en el caso de la aorta torácica y la arteria femoral, sin embargo la diferencia en los valores de EC<sub>50</sub> de los diferentes segmentos permaneció significativa (Figura 16). Estos datos sugieren que la diferencia sustancial en la vasorelajación inducida por acetilcolina queda igual después del tratamiento con SOD+CAT, por tanto este no es un estrés oxidativo agudo que regula la vasorelajación.
- 30 Este experimento se continúa mediante suplementación con Tyr en analogía con el programa descrito en la sección anterior "El impacto de la suplementación con para-, meta- y orto-tirosina en la vasorelajación inducida por insulina" y se espera un efecto similar.
- Absorción de la 2-desoxi-D-glucosa marcada con isótopo en células 3T3-L1 por eritropoyetina (EPO)
- 35 En un experimento anterior los inventores encontraron un aumento de la fosforilación de Akt y el consecuente aumento de la absorción de glucosa en adipocitos 3T3-L1. En el presente experimento, los inventores midieron la absorción de la 2-desoxi-D-glucosa marcada con isótopo en células 3T3-L1 en presencia de para- y orto-Tyr a varias concentraciones de EPO (Figura 17). Los inventores encontraron que la absorción de glucosa inducida por EPO en presencia de orto-tirosina se inhibía comparada con el control de para-Tyr.
- 40 Fosforilación de Akt en la señalización de eritropoyetina
- Una alteración en la fosforilación de Akt debido a un posterior efecto de EPO se ha estudiado en adipocitos 3T3-L1 por transferencia Western en presencia de para-, orto y meta-tirosina (Figura 18). La presencia de orto- y meta-Tyr en el medio inhibió el aumento normal en la fosforilación de Akt.
- Programación de un régimen de tratamiento con p-Tyr
- 50 Como ejemplo, un paciente dislipidémico con riesgo de síndrome metabólico y un índice de masa corporal de, por ejemplo, 29 atiende al control médico regular. Se comienza con terapia con para-L-Tirosina con una aportación diaria de 600 mg en tres dosis de 200 mg cada una. Los niveles de p-Tyr, o-Tyr y m-Tyr en suero y urinarios se miden cada dos semanas junto con los parámetros de sangre habituales incluyendo insulina en suero y glucosa. Se

propone una dieta baja en glucosa y baja en grasas, y es mantenida por el paciente. La dosis de p-Tyr se aumentó en el conocimiento de los resultados a un nivel eficaz.

- 5 Como un ejemplo más, un paciente varón atiende al control médico con una queja de alta presión arterial y un aumento de estrés en su rutina regular diaria en el último mes. En esta situación el paciente aumentó la toma de cafeína y azúcar. Su nivel de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) se mide también como su insulina en suero, y el nivel de glucosa en plasma. Cada valor medido se encontró cercano al límite superior del intervalo normal mientras que la glucosa en plasma ligeramente lo excedió. La terapia con p-Tyr se comenzó con una aportación diaria de 3 g (tres veces de dosis de 1 g) y en un mes todos los parámetros se midieron de nuevo y se encontró que disminuyeron algo. La terapia de p-Tyr disminuyó y en un mes más los valores volvieron al intervalo medio normal.
- 10 La terapia con p-Tyr continuó con una aportación diaria de 1,5 g en tres dosis.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona compuestos, formulaciones y métodos para uso en el tratamiento de trastornos de resistencia hormonal y trastornos de estrés oxidativo crónico.

### Referencias

- 15 Abramson J L *et al.* (2005) Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. *Atherosclerosis* **178** (2005) 115-121.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; **15**:539-553.
- 20 Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP Oxidative stress and vascular disease in diabetes: is the dichotomization of insulin signaling still valid? *Free Radic Biol Med* 2008; **44**: 1209-15.
- Balkau B, Charles MA: Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabet Med.* 1999 May; **16**(5):442-3.
- 25 Berdichevsky A, Guarente L, Bose A: Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem.* 2010 Jul 9; **285**(28):21581-9.
- Brasnyó P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, Mikolds E, Szijartó IA, Merei A, Halmai R, Meszros LG, Sihnegi B, Wittmann I: Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr.* 2011 Mar 9:1-7. [Epub ahead of print]
- 30 Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res.* 2010 Jun 10; **2**(3):316-31.
- DeFronzo RA: Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia.* 2010 Jul; **53**(7):1270-87.
- Dohi J *et al.* (2007) Association among C-reactive protein, oxidative stress, and traditional risk factors in healthy Japanese subjects. *International Journal of Cardiology* **115** 63-66
- 35 Fernstrom JD, Fernstrom MH: Monoamines and protein intake: are control mechanisms designed to monitor a threshold intake or a set point? *Nutr Rev.* 2001 Aug; **59**(8 Pt 2):560-5; discussion S66-8.
- Fesils *et al.* (2007) Adiponectin is a novel humoral vasodilator? *Cardiovascular Research* **75** 719-727.
- Galano A, Cruz-Torres A. OH radical reactions with phenylalanine in free and peptide forms. *Org Biomol Chem.* 2008 Feb 21; **6**(4):732-8.
- 40 Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M.: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000 Mar 17; **86**(5):494-501. Review.
- Gurer-Orhan H, Ercal N, Mare S, Pennathur S, Orhan H, Heinecke JW. Misincorporation of free m-tyrosine into cellular proteins: a potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids. *Biochem J.* 2006 Apr 15; **395**(2):277-84.
- 45 Hao S, Avraham Y, Bonne O, Berry EM: Separation-induced body weight loss, impairment in alternation behavior, and autonomic tone: effects of tyrosine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 Feb; **68**(2):273-81.
- HeM TW, Singh U, Vasquez-Vivar J, Devaraj S, Kuo L, Jialal I.: Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS *in vivo*. *Atherosclerosis.* 2009 Sep; **206**(1):61-8. Epub 2009 Feb 12.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006 Apr 13; **440**(7086):944-8.

- Huang X, Zhang J, Liu J, Sun L, Zhao H., Lu Y, Wang J, Li J.: C-reactive protein promotes adhesion of monocytes to endothelial cells via NADPH oxidase-mediated oxidative stress. *J Cell Biochem.* 2012 Mar; **113**(3):857-67. doi: 10.1002/jcb.23415.
- 5 Huggins TG, Wells-Knecht MC, Detorie NA, Baynes JW, Thorpe SR. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15; **268**(17):12341-7.
- Iozzo P: Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care.* 2009 Nov; **32** Supl 2:S168-73.
- 10 Kaddai V, Gonzalez T, Keslair F, Gremeaux T, Bonnafous S, Gugenheim J, Tran A, Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Cormont M. Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. 2009; PLoS One 4: e5257.
- Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A (1995) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* **270**: 23780-23784
- 15 Kuhad A, Bishnoi M, Tiwari V, Chopra K.: Suppression of NF-kappabeta signaling pathway by tocotrienol can prevent diabetes associated cognitive deficits. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009 Apr; **92**(2):251-9. Epub 2008 Dec 24.
- Kuhad A, Chopra K.: Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. *Life Sci.* 2009 Feb 27; **84**(9-10):296-301. Epub 2008 Dec 30.
- Kuhad A, Chopra K.: Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology.* 2009 Sep; **57**(4):456-62. Epub 2009 Jun 23.
- 20 Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug; **14**(8 Supl 3):S221-6.
- Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JT, Goldstein BJ: Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2001 Dec 28; **276**(52):48662-9.
- 25 Martinez-Hervas S, Real JT, Ivorra C, Priego A, Chaves FJ, Pallardo FV, Viha JR, Redon J, Carmena R, Ascaso JF.: Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 Dec; **20**(10):734-9. Epub 2009 Sep 17.
- 30 Moller SE, Maach-Moller B, Olesen M, Madsen B, Madsen P, Fjalland B: Tyrosine metabolism in users of oral contraceptives. *Life Sci.* 1995; **56**(9):687-95.
- Molnar GA, Nemes V, Biro Z, Ludany A, Wagner Z, Wittmann I: Accumulation of the hydroxyl free radical markers meta-, ortho-tyrosine and DOPA in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free Radic Res.* 2005 Dec; **39**(12):1359-66.
- 35 Molnar GA, Wagner Z, Marko L, KO Szegi T, Mohas M, Kocsis B, Matus Z, Wagner L, Tamask6 M, Mazak I, Laczky B, Nagy J, Wittmann I: Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int.* 2005 Nov; **68**(5):2281-7.
- Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, Yoshida A, Hein TW.: C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 May; **49**(5):2053-60.
- 40 Naito Y *et al.* (2010) Oxidative Stress Markers. *Anti-Aging Medicine* **7** (5) : 36-44.
- Ogino K and Wang D-H. (2007) Biomarkers of OxidativeNitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention. *Acta Med. Okayama*, **61**(4) 181-189
- Pokomy J *et al.* Antioxidants in food: practical applications. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, U.K. 2001 Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988 Dec; **37**(12): 1595-607.
- 45 Reinstein DK, Lehnert Wurtman RJ: Dietary tyrosine suppresses the rise in plasma corticosterone following acute stress in rats. *Life Sci.* 1985 Dec 9; **37**(23):2157-63.
- Rodgers KJ, Wang H, Fu S, Dean RI: Biosynthetic incorporation of oxidized amino acids into proteins and their cellular proteolysis. *Free Radic Biol Med.* 2002 Apr 15; **32**(8):766-75.
- 50 Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R, Bashan N: Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol.* 1997 May; **272**(5 Pt 1):E935-40.

- Ryan EA, Imes S, Wallace C: Short-term intensive insulin therapy in newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004 May; **27**(5):1028-32.
- Singh U, Devaraj S, Vasquez-Vivar J, Jialal I.: C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Dec; **43**(6):780-91. Epub 2007 Aug 31.
- 5 Stephens J W. et al. (2009) The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **202** 321-329
- Thomson MJ, Williams MG, Frost SC: Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1997 Mar 21; **272**(12):7759-64.
- 10 Van der Putten K, Braam B, Jie KE, Gaillard CA (2008) Mechanisms of Disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nat Clin Pract Nephrol*. **4**(1) 47-57.
- Wu X, Zhu L, Zilbering A, Mahadev K, Motoshima H, Yao J, Goldstein BJ. Hyperglycemia Potentiates H2O2 Production in Adipocytes and Enhances Insulin Signal Transduction: Potential Role for Oxidative Inhibition of Thiol-Sensitive Protein-Tyrosine Phosphatases. *Antioxid Redox Signal*. 2005; **7**(5-6): 526-537.
- 15 Yasunari K et al. (2002) Oxidative Stress in Leukocytes Is a Possible Link Between Blood Pressure, Blood Glucose, and C-Reacting Protein. *Hypertension* **39**:777-780.
- Yoshioka K, Yoshida T, Yoshikawa T: Short-term intensive insulin therapy in newly diagnosed type 2 diabetes: response to Ryan, Imes, and Wallace. *Diabetes Care*. 2004 Sep; **27**(9):2281-2
- 20 Yuan H, Zhang X, Huang X, Lu Y, Tang W, Man Y, Wang S, Xi J, Li J: NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of O-cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways. *PLoS One*. 2010 Dec 29; **5**(12):e15726.
- Zecchin H. G. et al. (2007) Defective Insulin and Acetylcholine Induction of Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Through Insulin Receptor Substrate/Akt Signaling Pathway in Aorta of Obese Rats. *Diabetes* **56**(4) 1014-1024.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un compuesto seleccionado a partir de para-L-Tirosina (p-Tyr) y p-OH-fenil-piruvato, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición o trastorno debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo, en donde dicho p-OH-fenil-piruvato se metaboliza en p-Tyr en dicho sujeto.
2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un sujeto con una enfermedad de estrés oxidativo.
3. El compuesto para uso de la reivindicación 1 ó 2, en donde el estrés oxidativo se caracteriza por:
  - 10 - un nivel mayor de meta-Tirosina (m-Tyr) y/u orto-Tirosina (o-Tyr) en un fluido corporal de dicho sujeto, en donde el fluido corporal se selecciona a partir de suero, plasma, orina, saliva, jugos, lágrimas o en un tejido de dicho sujeto en donde el tejido se selecciona de tejido adiposo, músculo, muestras de biopsia del riñón o del hígado.
4. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la resistencia hormonal es diferente de la resistencia a leptina.
- 15 5. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho compuesto es para uso en la prevención de una condición o trastorno debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo y que se administra antes del inicio de dicha condición o trastorno, en donde preferiblemente el sujeto está expuesto a estrés oxidativo o predispuesto a dicha condición o trastorno.
6. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha resistencia hormonal es la resistencia a la insulina.
- 20 7. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha resistencia hormonal es la resistencia a la eritropoyetina.
8. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha resistencia hormonal es la resistencia a la acetilcolina.
- 25 9. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha condición se selecciona de hipertensión, estrés oxidativo en tejido adiposo o en adipocitos, anemia, anemia crónica, isquemia, enfermedades vasculares, enfermedad renal crónica (ERC), enfermedad crónica cardiaca (ECC), estrés oxidativo del riñón, síndrome de apnea obstructiva del sueño, malignidades relacionadas con la resistencia hormonal o cualquier condición que sea una consecuencia de estas.
- 30 10. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde la resistencia hormonal está inducida por estrés oxidativo vía la formación de o-Tyr y/o m-Tyr y vía la incorporación de dicha o-Tyr y/o m-Tyr en proteínas celulares, preferiblemente en al menos una proteína celular de la ruta de señalización intracelular de una hormona cuya resistencia a dicha condición está relacionada con ésta.
- 35 11. El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde la hormona actúa vía la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa(PI3K)/AKT.
12. El compuesto para uso de la reivindicación 10, en donde dicha al menos una proteína se selecciona de la parte intracelular de un receptor de dicha hormona, receptor de insulina IRS1, IRS2, PD3K, PDK1, Akt y GLUT4.
- 40 13. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde la prevención, la mejora o el tratamiento de dicha condición comprende un régimen personalizado dirigido a dicho sujeto en donde la administración de dicho compuesto al sujeto se continúa durante al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 días, más preferiblemente durante al menos un mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses o al menos durante medio año o al menos 1 año o al menos 2 años o al menos 3 años o al menos 5 años o al menos 10 años o toda la vida.
- 45 14. Una formulación que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para uso en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo, siendo seleccionada dicha formulación de una composición farmacéutica y un medicamento.
- 50 15. Una formulación que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para uso en un sujeto en la prevención, la mejora o el tratamiento de una condición debido a resistencia hormonal inducida por estrés oxidativo, siendo seleccionada dicha formulación de un suplemento dietético, producto nutracéutico, alimento funcional, alimento y una composición con una propiedad saludable.

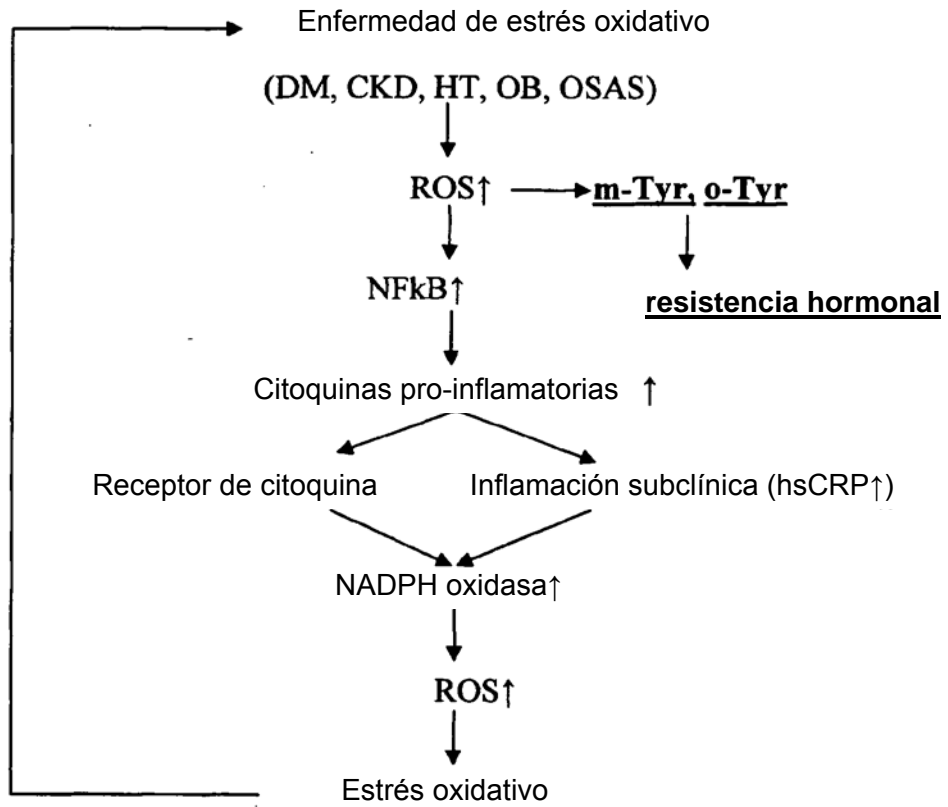


Figura 1

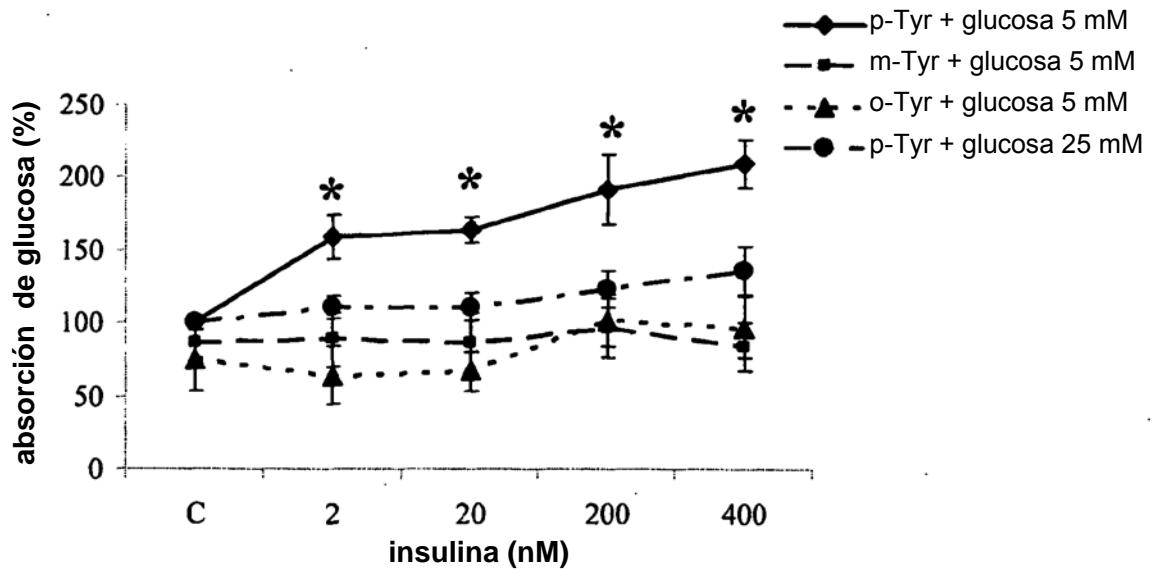


Figura 2



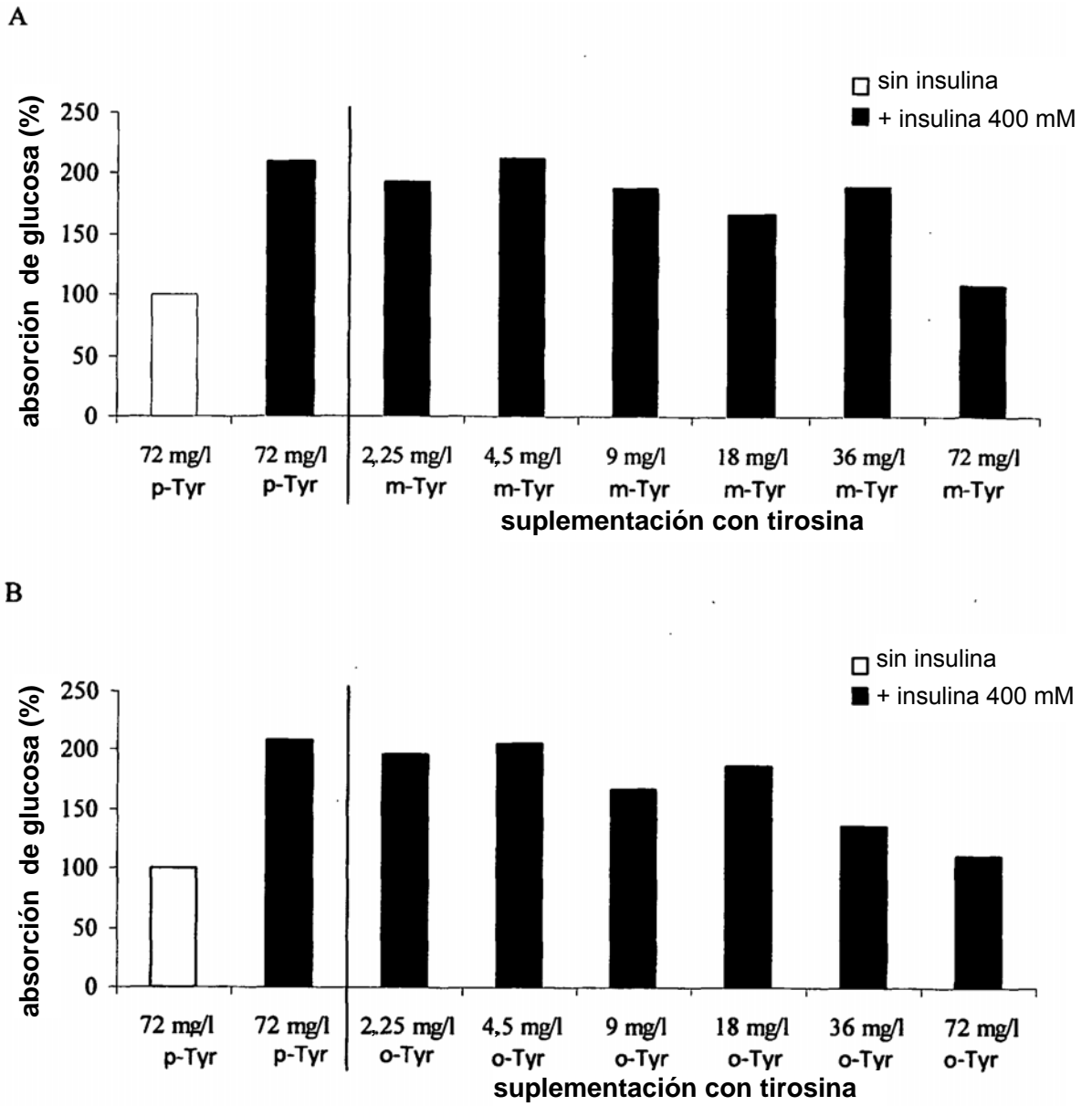
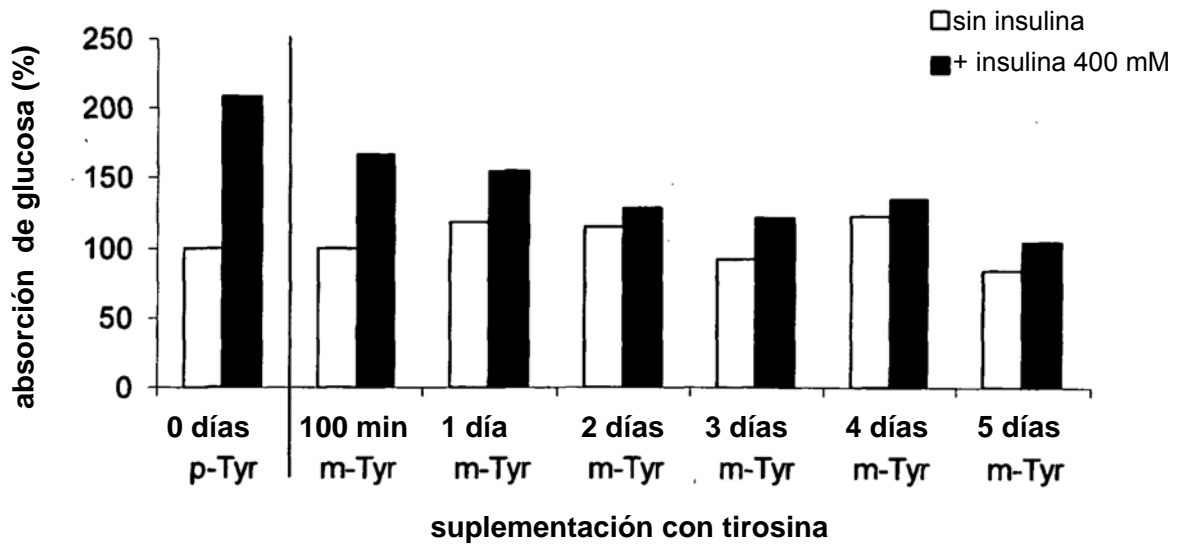


Figura 3

A



B

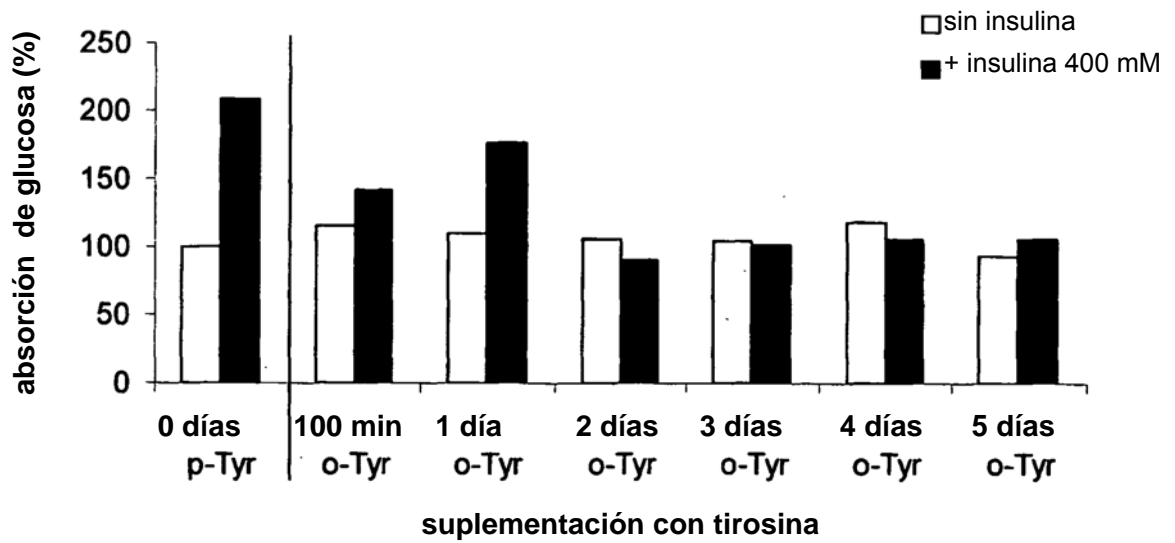


Figura 4

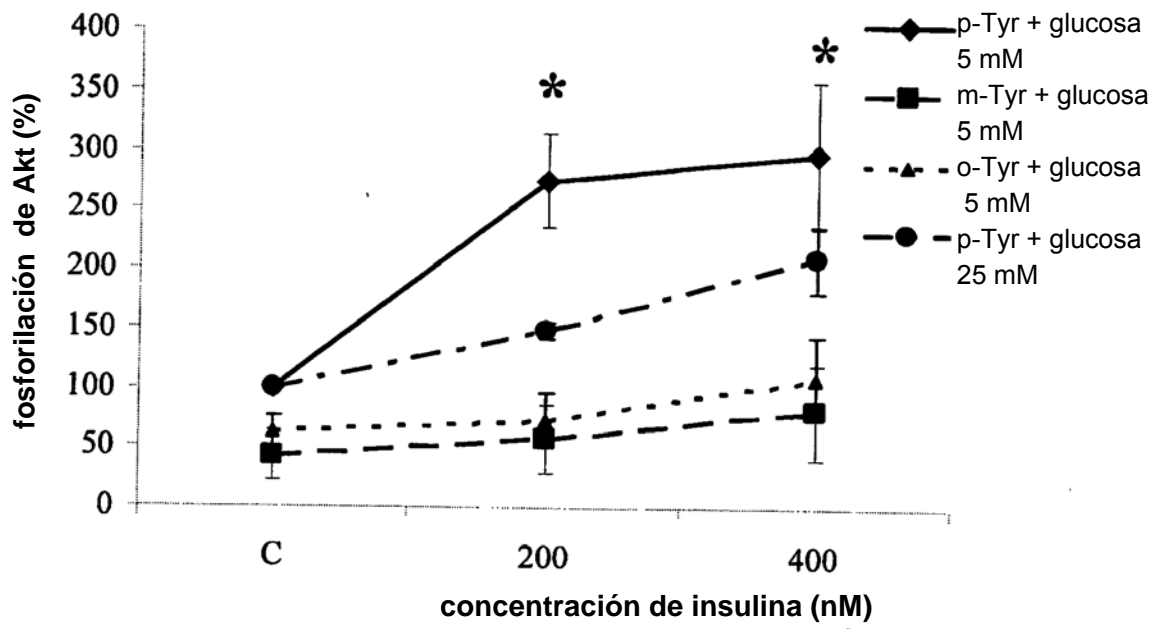


Figura 5

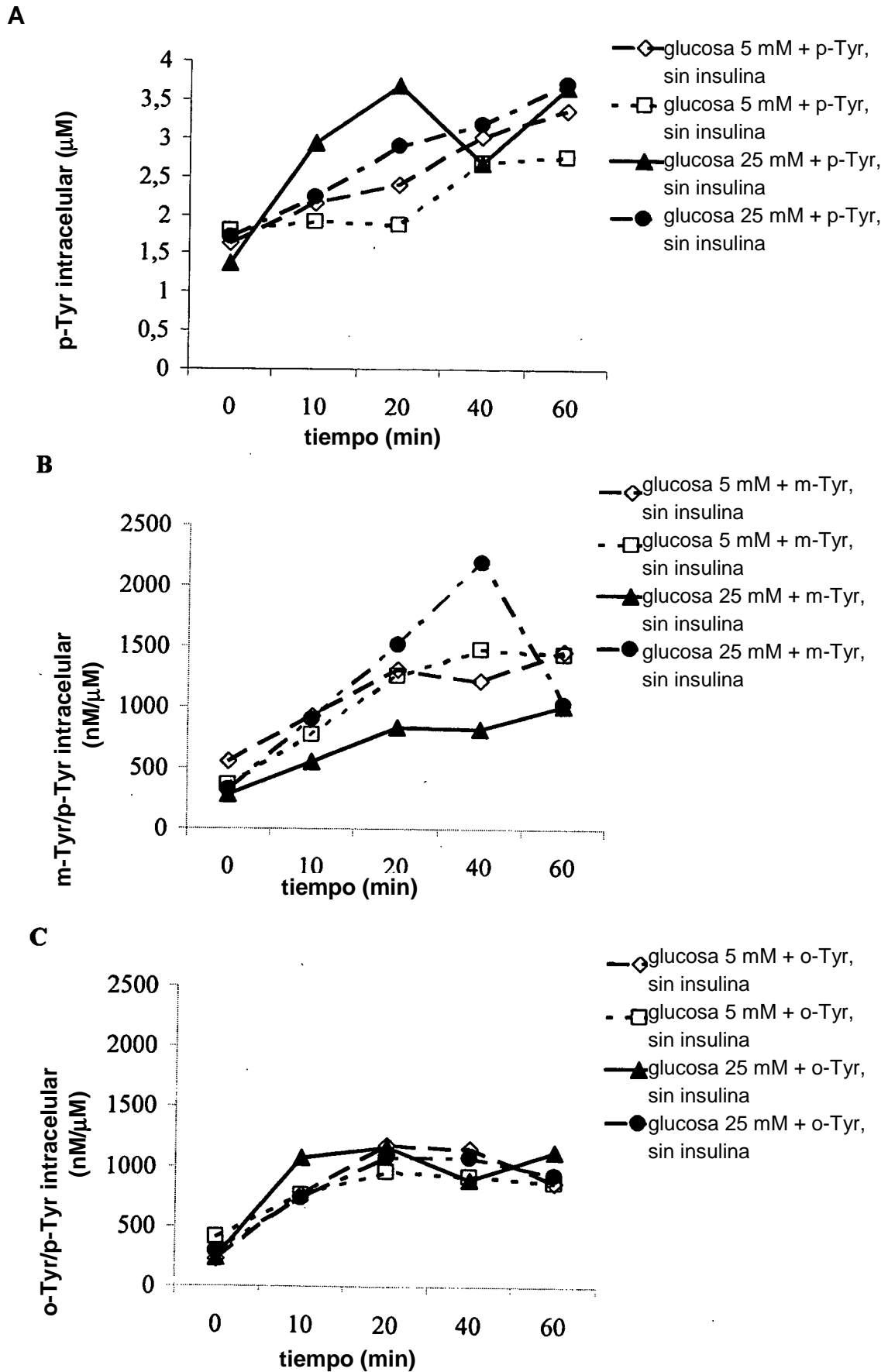
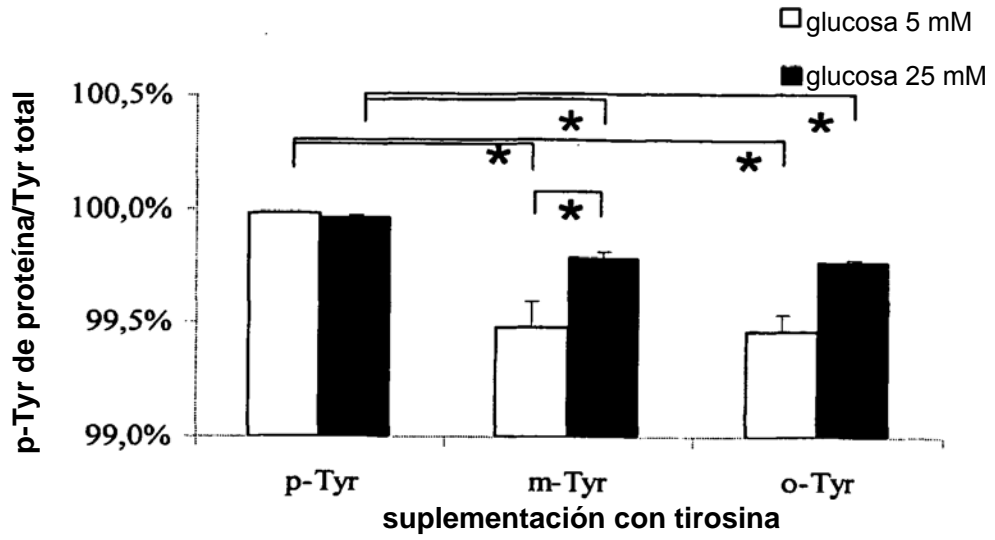
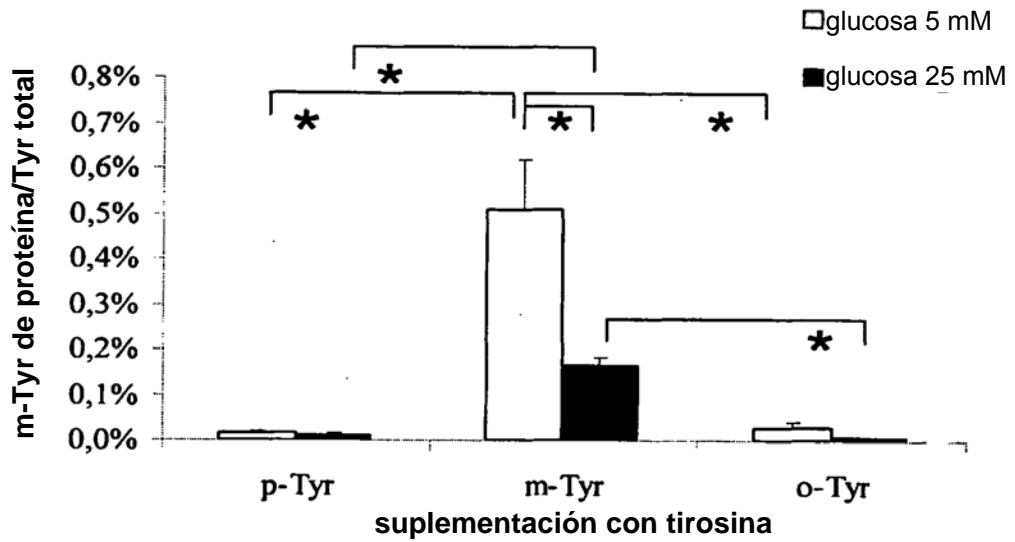


Figura 6

A



B



C

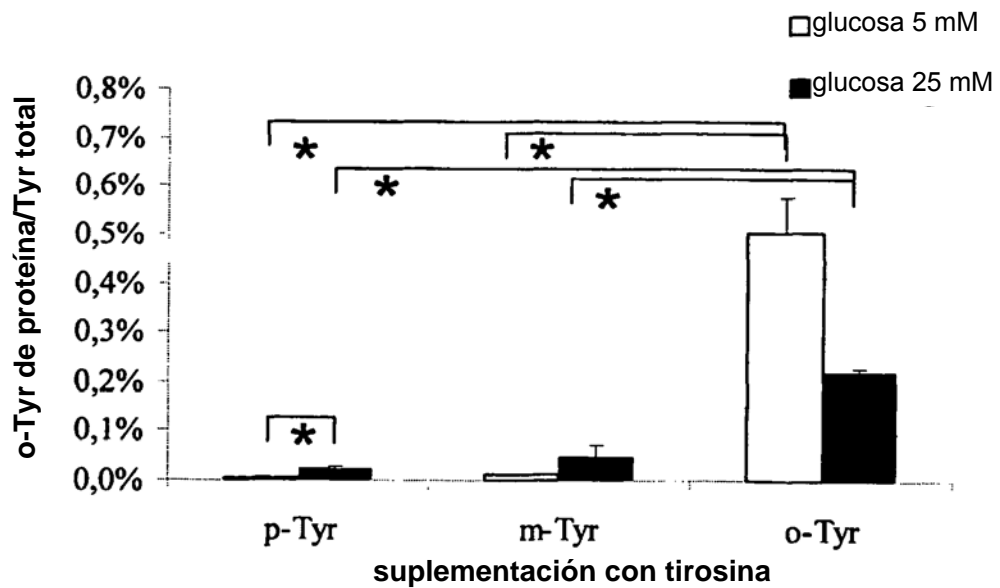


Figura 7

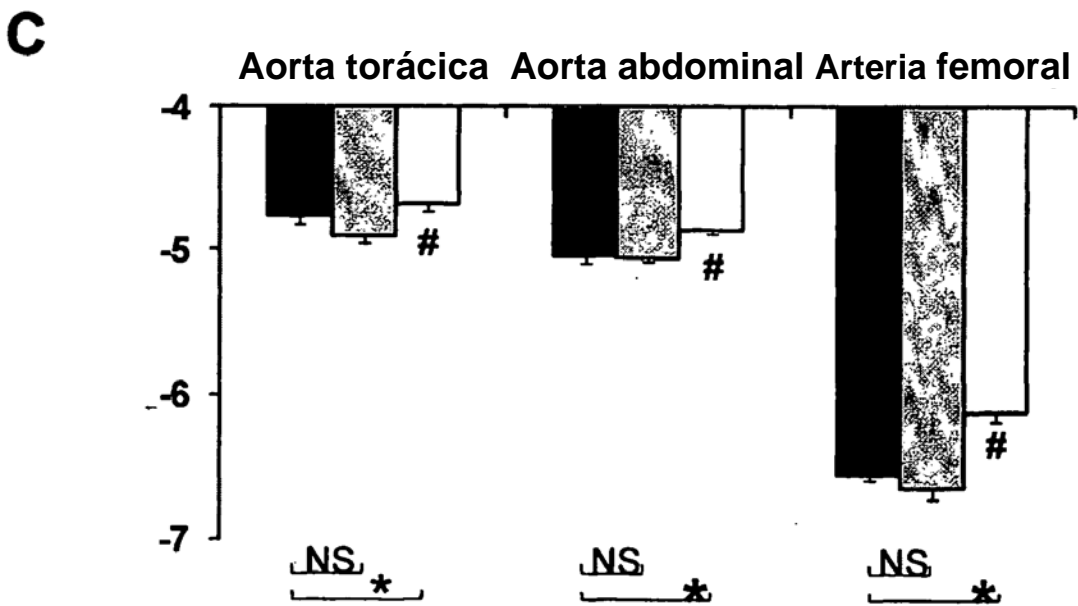
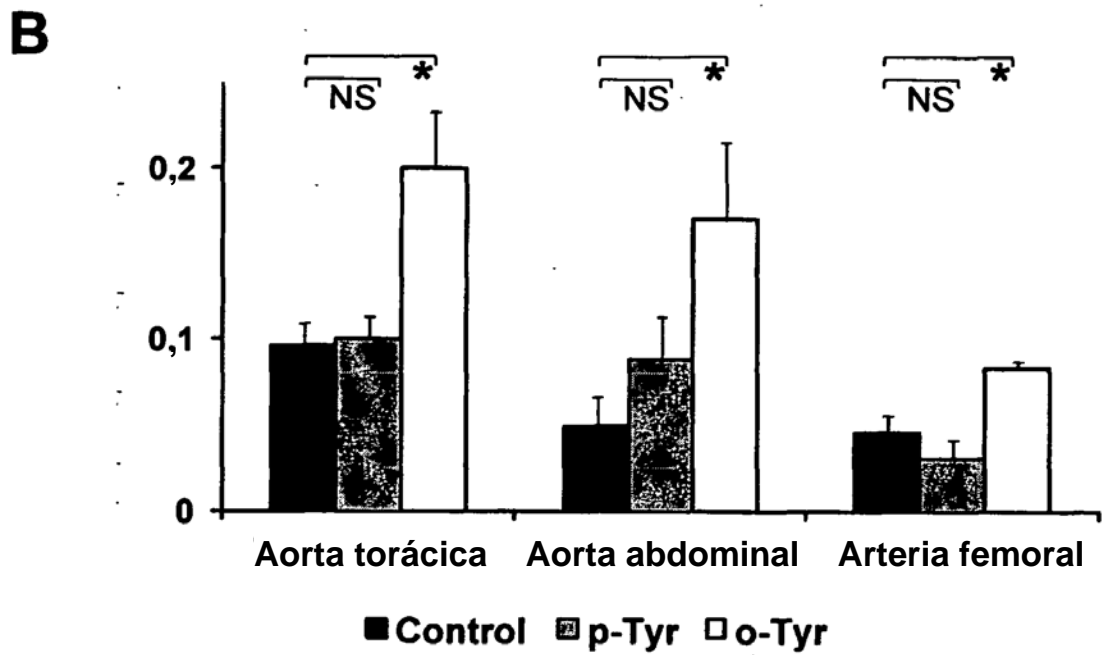
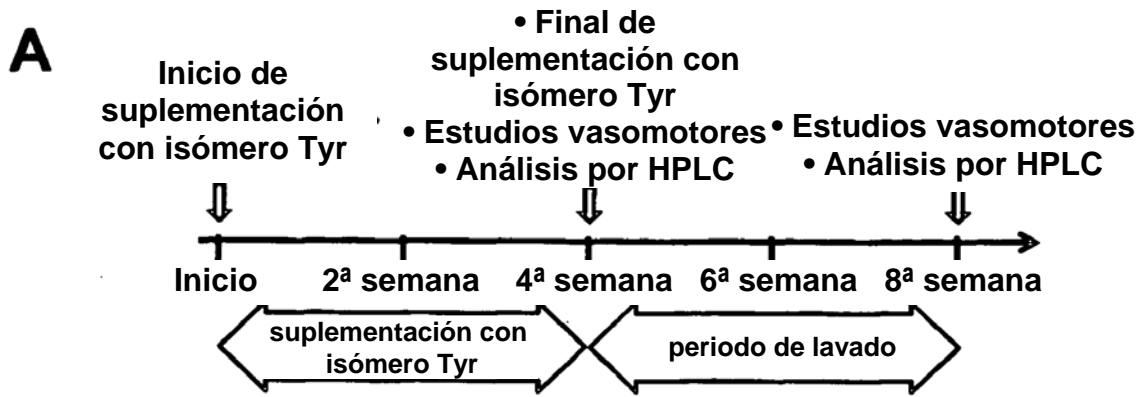
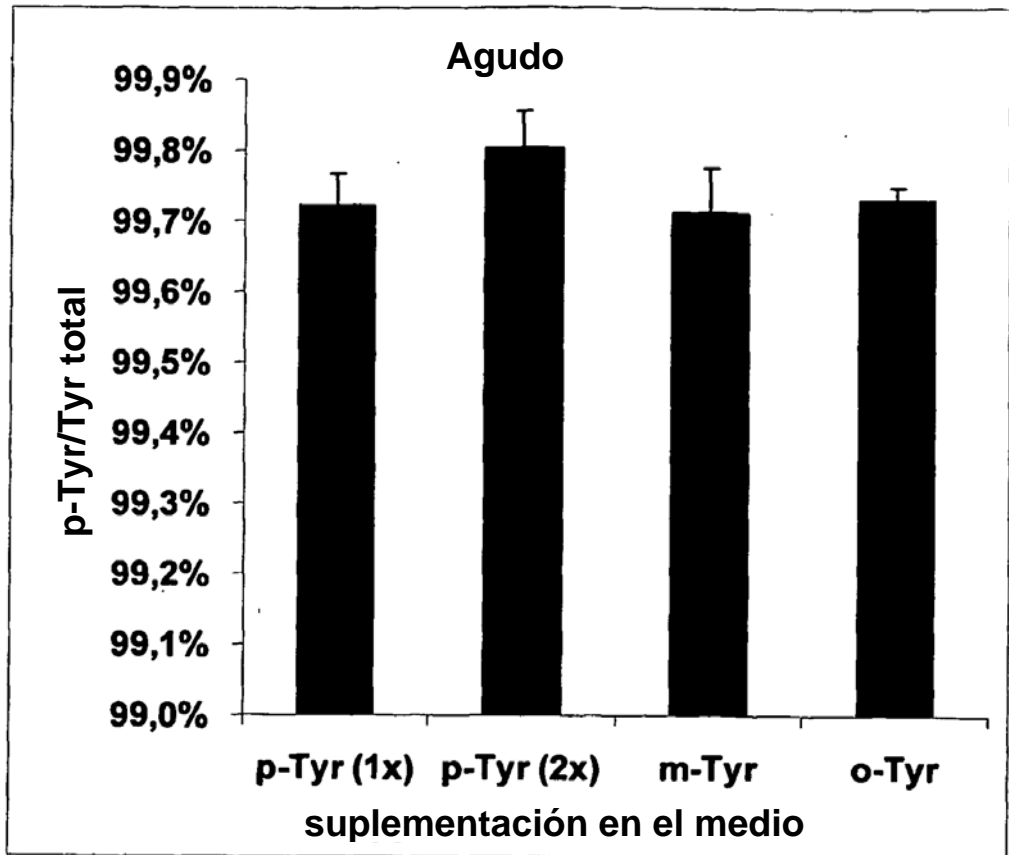


Figura 8

A



B

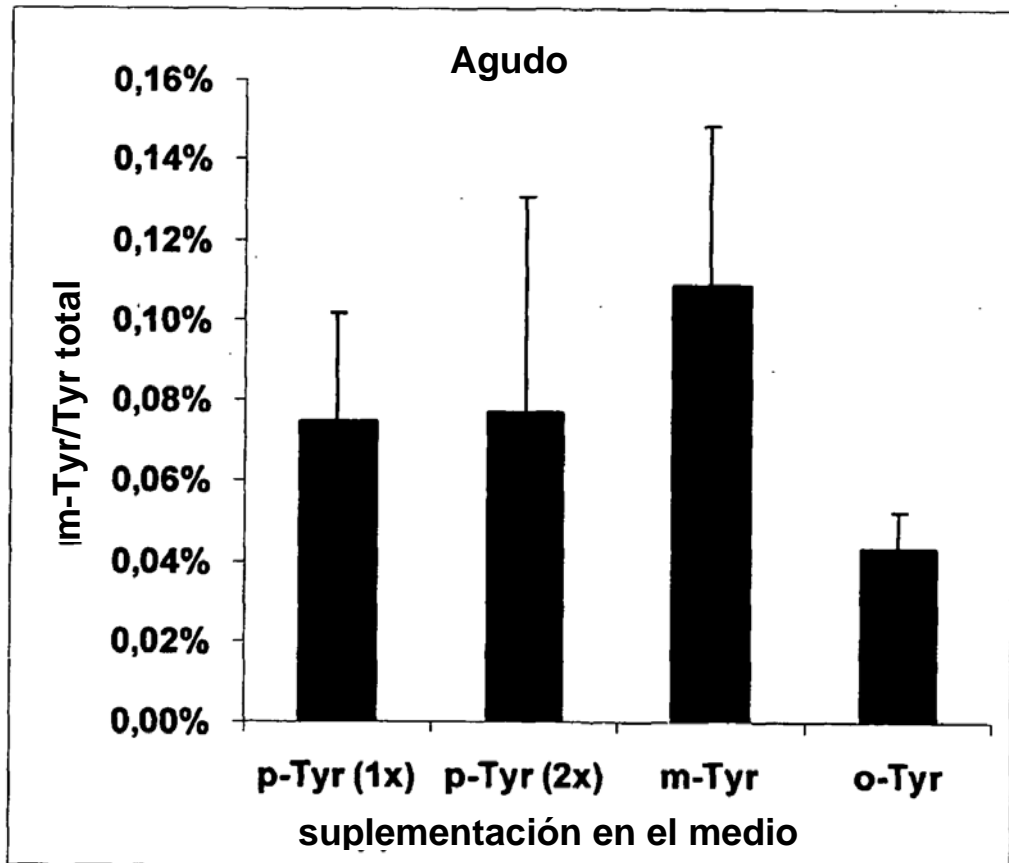


Figura 9

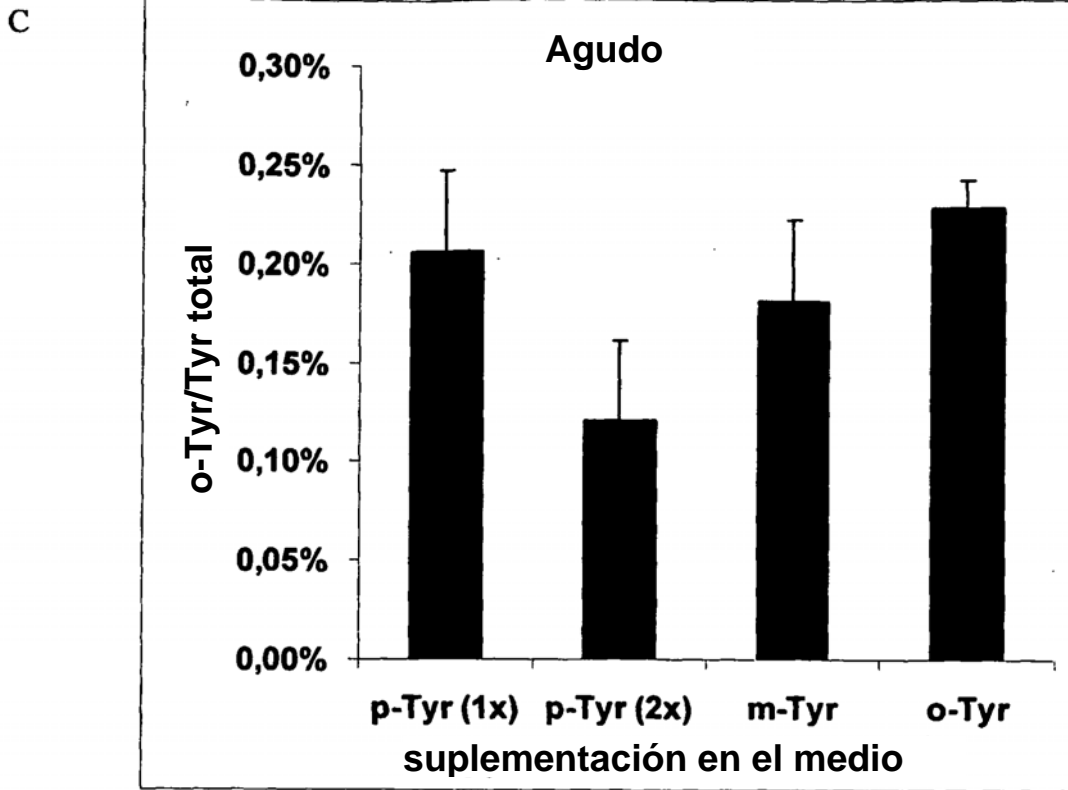


Figura 9

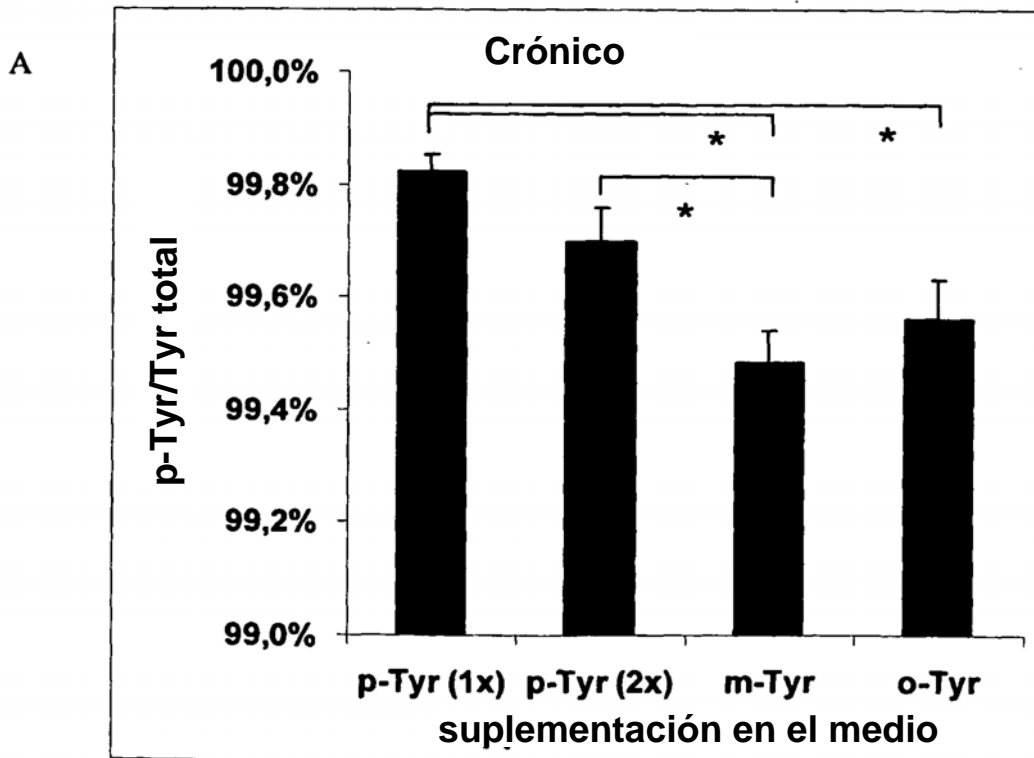
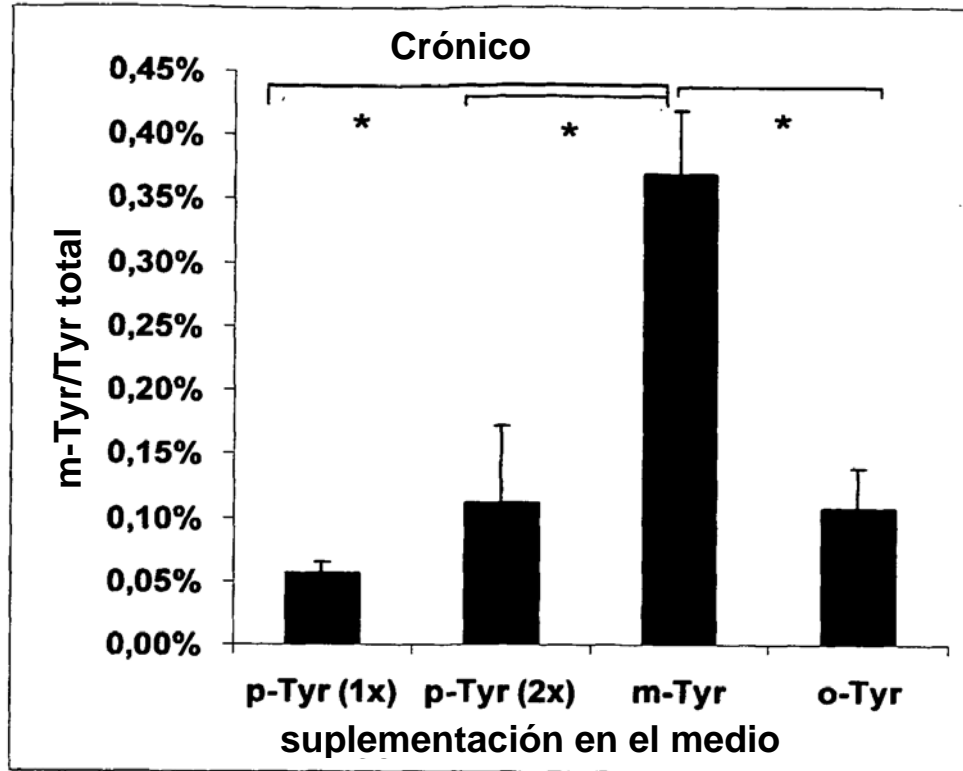


Figura 10



B



C

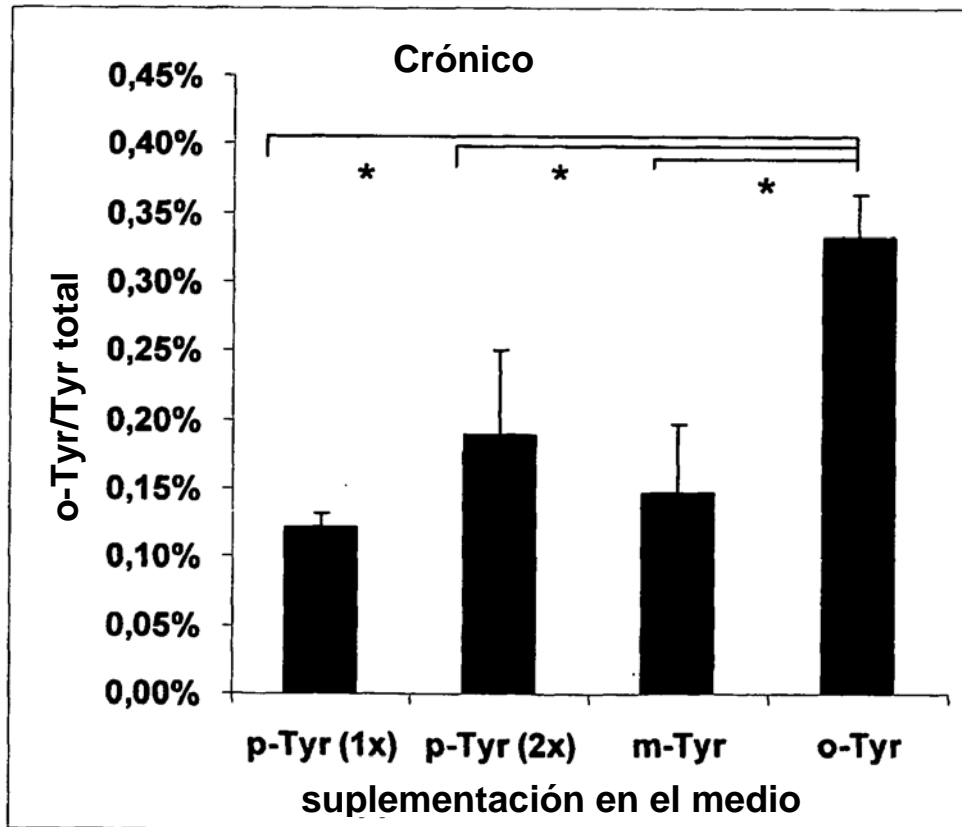


Figura 10



Aorta abdominal

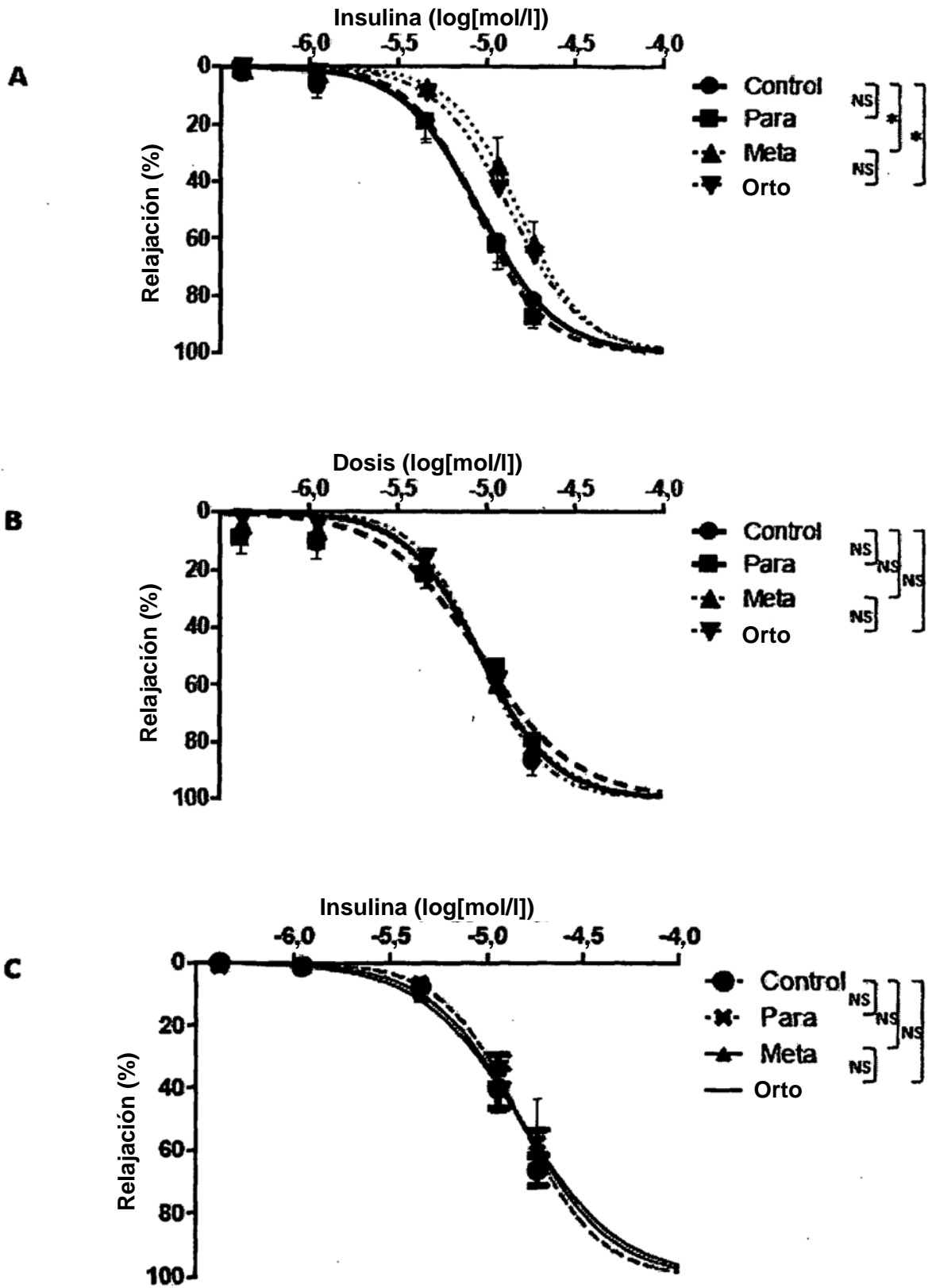


Figura 12

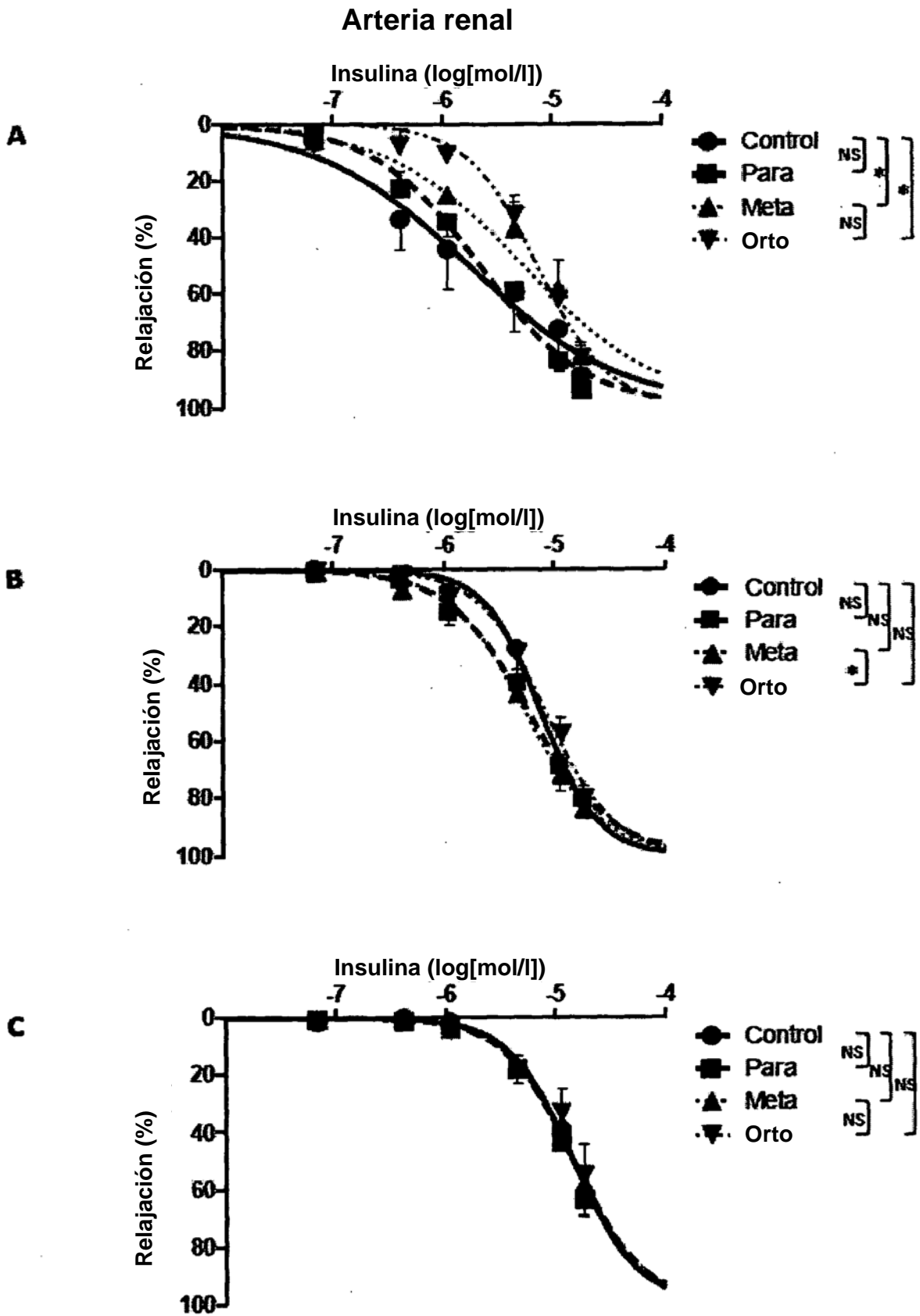


Figura 13

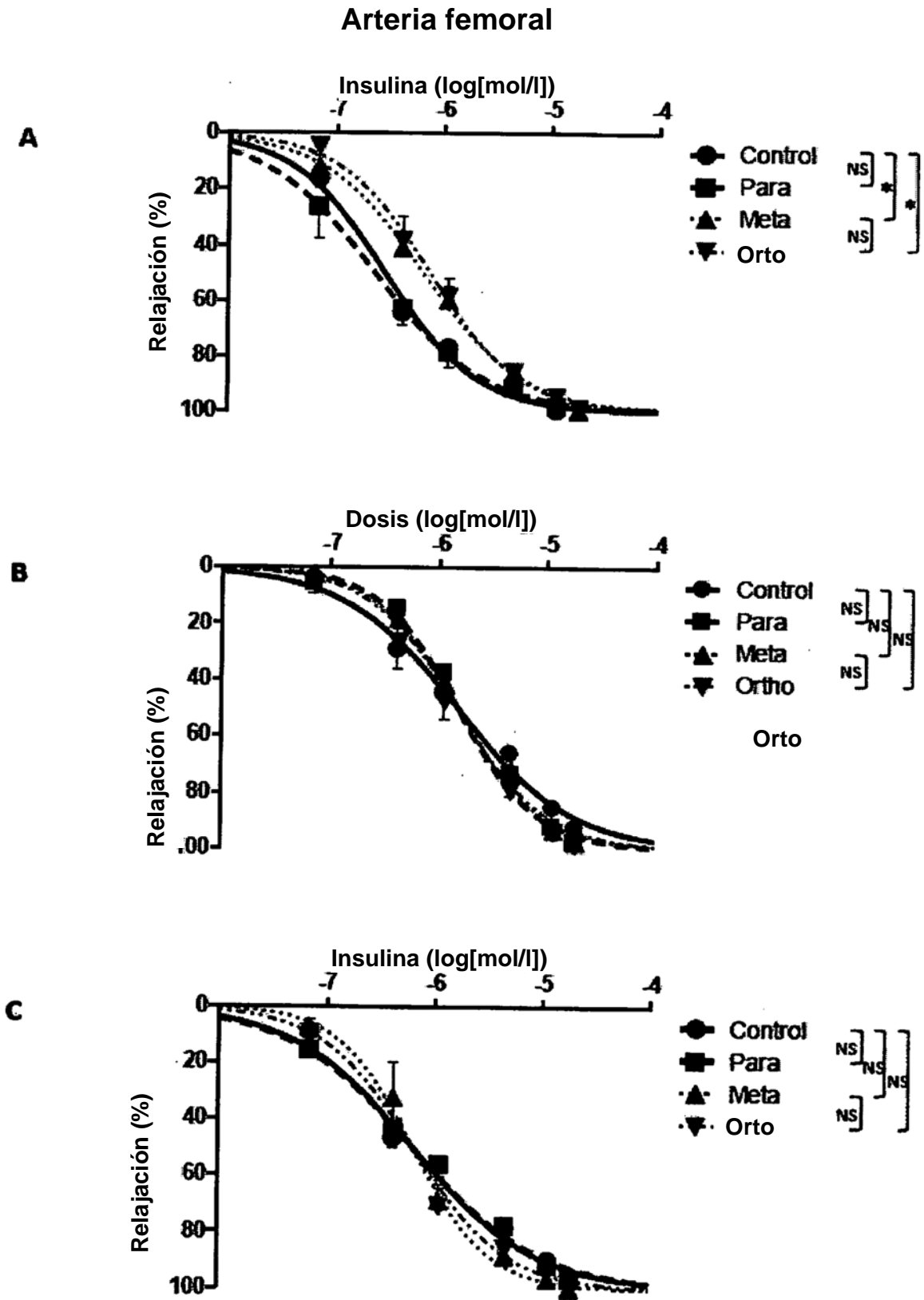


Figura 14

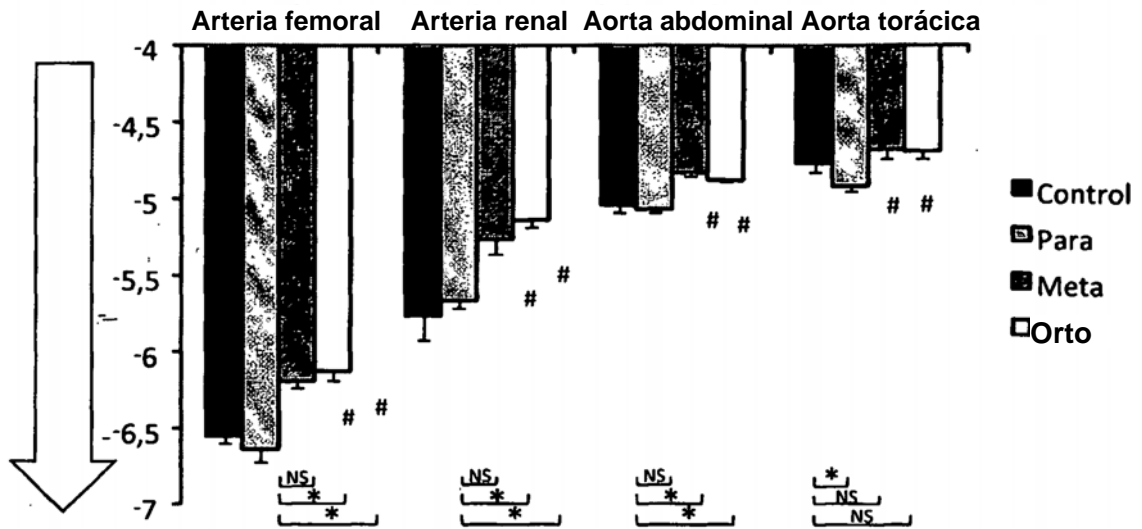


Figura 15

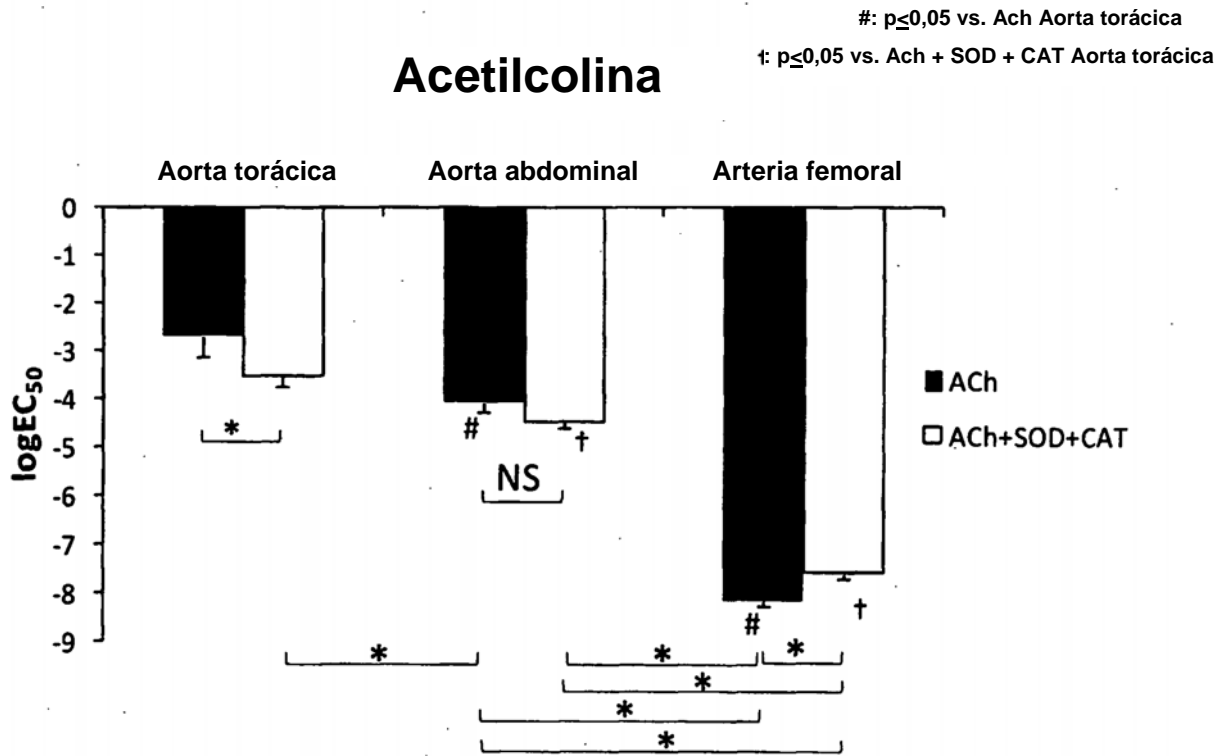


Figura 16

ABSORCIÓN DE GLUCOSA

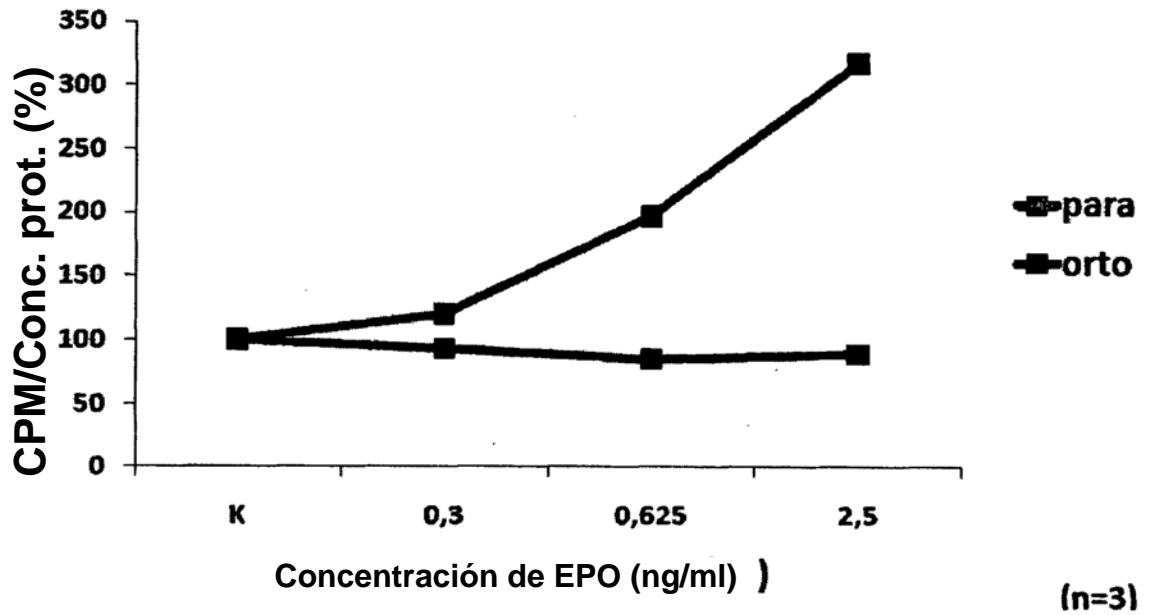


Figura 17

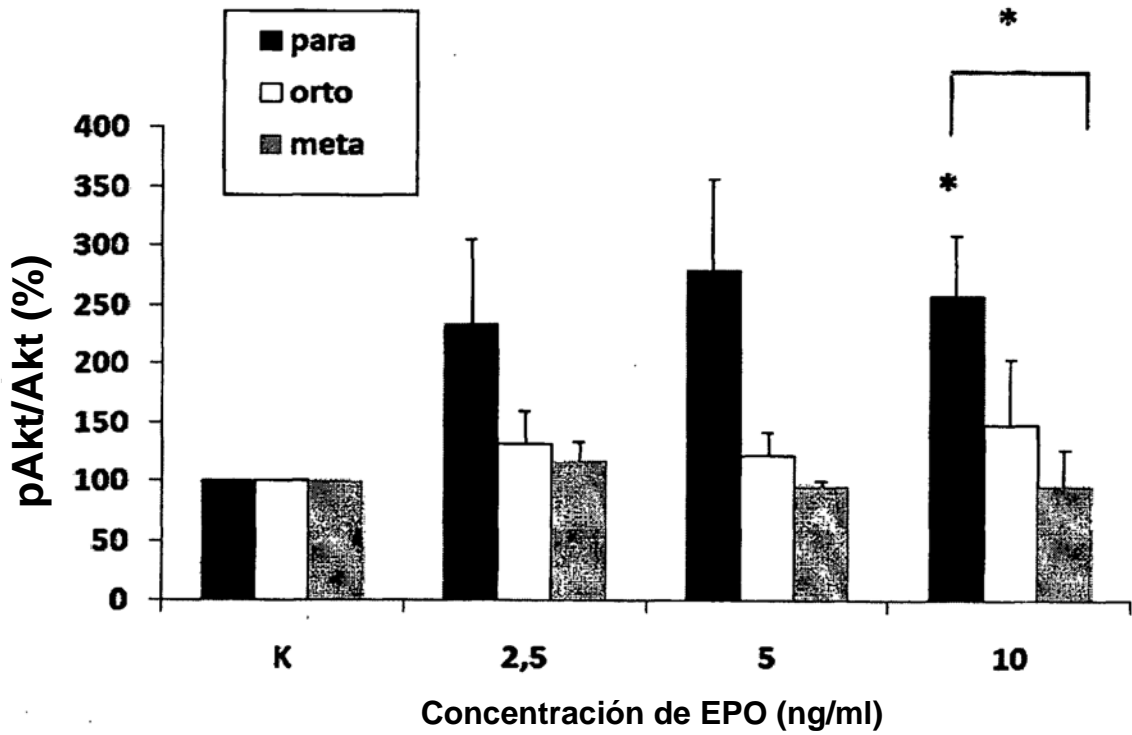


Figura 18

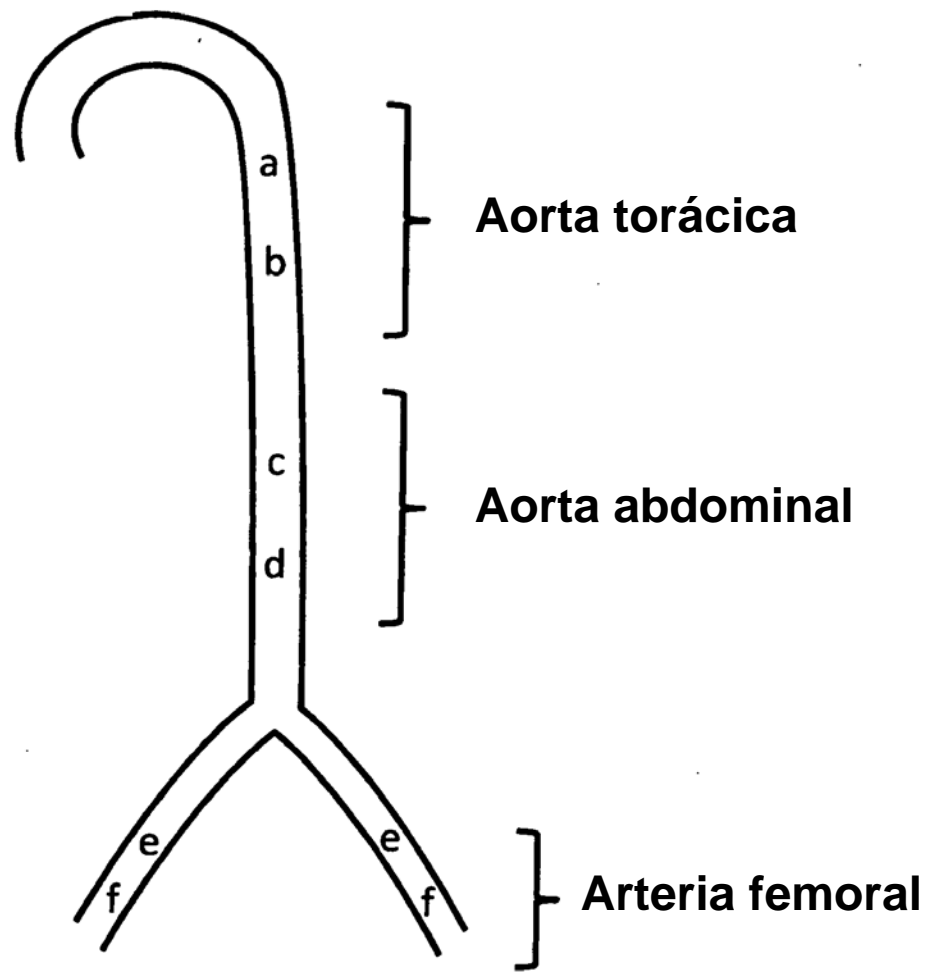


Figura 19