

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 395**

51 Int. Cl.:

A61K 31/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2005 E 13189553 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2712617**

54 Título: **Tratamiento de la fibrosis usando ligandos de Fxr**

30 Prioridad:

12.03.2004 US 552865 P

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

20.04.2017

73 Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
421 Hudson Street, Suite 212
New York, NY 10014, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

BANDIN ABAD, Dora

ES 2 609 395 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la fibrosis usando ligandos de Fxr

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/552.865, presentada el 12 de marzo de 2004, cuyo contenido se incorpora en el presente documento en su totalidad.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la prevención, al tratamiento y/o a la inversión de la fibrosis. En particular, la presente invención se refiere al uso novedoso de ligandos específicos del receptor X fernesioide (FXR) en pacientes con enfermedades hepáticas, intestinales o renales fibróticas que tampoco padecen una afección colestásica, para inhibir el desarrollo y la progresión de la fibrosis en aquellos tejidos en los que se expresa FXR.

Antecedentes de la invención

20 La fibrosis se caracteriza por una acumulación excesiva de colágeno en la matriz extracelular del tejido afectado. Es un problema clínico antiguo y complejo para el que, en la actualidad, no se dispone de un tratamiento eficaz. La producción de colágeno es un proceso fisiológico altamente regulado, cuya perturbación puede conducir al desarrollo de fibrosis tisular. La formación de tejido fibroso es parte del proceso beneficioso normal de curación tras una lesión. En algunos casos, sin embargo, una acumulación anormal de material fibroso puede interferir gravemente con la función normal del tejido afectado o incluso cuasar la pérdida completa de función del órgano afectado.

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

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

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

El receptor X fernesioide (FXR), también conocido como el receptor de ácido biliar (BAR) y NR1H4, es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores y formas de transcripción activados por ligando, con el receptor de retinoide X (RXR), un receptor heterodimérico esencial para la homeostasis del ácido biliar (Forman et

al., Cell 81:687-693, 1995; Lu *et al., J. Biol. Chem.*, 17:17, 2001). FXR se expresa en diversos tejidos que incluyen el hígado, riñón, intestino, colon, ovario y glándula suprarrenal (Forman *et al., Cell* 81:687-693, 1995).

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

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

Aunque sin el deseo de quedar ligado a teoría alguna, el presente inventor reveló que la activación de FXR puede regular negativamente la síntesis de colágeno y la fibrosis resultante a través de un mecanismo que implica SHP y otros genes diana de FXR. Así pues, los ligandos activadores de FXR son agentes antifibróticos eficaces en tejidos y órganos en los que FXR está presente, tales como hígado, riñón, intestino, etc. La presente divulgación proporciona un nuevo método de prevención, tratamiento y/o inversión de la fibrosis, basado en el sorprendente descubrimiento de propiedades previamente desconocidas de ligandos activadores de FXR.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método de inhibición de la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica subyacente. Este método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando específico para el receptor X farnesiloide (FXR), con el fin de inhibir la fibrosis que podría producirse en un órgano en el que se expresa FXR. El ligando de FXR usado en el método reivindicado no es el ácido quenodesoxicólico (CDCA) ni el ácido ursodesoxicólico (UDCA); como alternativa, el ligando tiene una CE₅₀ no superior a 5 µM en un ensayo de FXR exento de células o en un ensayo de transactivación de FXR basado en células. En una realización preferida, el ligando tiene un CE₅₀ no superior a 1 µM.

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

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

El ligando de FXR es tauro-6ECDCA, 6EUDCA, 6α-MeCDCA, 6α-PrCDCA, fexamina o guggulsterona.

En algunas realizaciones, la fibrosis que va a inhibirse es fibrosis hepática asociada a una enfermedad tal como hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante; enfermedad hepática alcohólica (ALD); enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); enfermedades del hígado inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmunitaria; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de α1-antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; trastorno vascular asociado al síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva o trombosis de la vena porta; o fibrosis hepática congénita.

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

enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis tras radiación o colitis microscópica.

En algunas realizaciones adicionales, la fibrosis que va a inhibirse es fibrosis renal asociada a una enfermedad tal como nefropatía diabética, nefrosclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica del trasplante, nefritis intersticial crónica o enfermedad renal poliquística.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para inhibir la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica. La fibrosis que va a inhibirse se produce en un órgano en el que se expresa el receptor X farnesiloide (FXR). Este kit comprende una cantidad eficaz de un ligando específico de FXR y un material de instrucciones que enseña las indicaciones, dosis y programa de administración del ligando al paciente. El ligando de FXR del kit reivindicado no es el ácido quenodesoxicólico (CDCA) ni el ácido ursodesoxicólico (UDCA); como alternativa, el ligando tiene una CE_{50} no superior a 5 μM en un ensayo de FXR exento de células o en un ensayo de transactivación de FXR basado en células. En una realización preferida, el ligando tiene un CE_{50} no superior a 1 μM .

En algunas realizaciones, el kit se usa para inhibir la fibrosis hepática, fibrosis renal o fibrosis intestinal. En otras realizaciones, el kit comprende tauro-6ECDCA, 6EUDCA, 6 α -MeCDCA, 6 α -PrCDCA, fexaramina o guggulsterona. En otras realizaciones más, el FXR del kit reivindicado está presente en una composición farmacéutica adecuada para la administración oral o intravenosa.

Breve descripción de las figuras

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

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

La Figura 3a muestra los resultados de RT-PCR y RT-PCR cuantitativa, que indican que la exposición de HSC a ligandos de FXR 6-ECDCA (1 μM), CDCA (20 μM) o GW4064 (100 nM) reduce la expresión del colágeno de tipo I como medida mediante la evaluación de la expresión de ARNm de $\alpha 1$ mediante métodos. La Figura 3b muestra resultados de análisis de transferencia Northern, que confirman los resultados del panel a.

La Figura 4 muestra los resultados de ensayos de proliferación de HSC, que indican que 6-ECDCA no previene la proliferación de HSC inducida por trombina, PDGF o $\text{TGF}\beta^1$, como se evalúa mediante la determinación de la incorporación de [^3H]-timidina (paneles a y b) o el recuento de células (panel c). Además, los ligandos de FXR no conducen las HSC a la apoptosis (panel d).

La Figura 5 muestra la inhibición mediada por ligandos de FXR de la liberación de colágeno $\alpha 1$, medida determinando las concentraciones de hidroxiprolina en sobrenadantes de células (paneles a y b).

La Figura 6 muestra que la sobreexpresión de SHP en HSC-T6 anula la expresión de $\alpha 1$ en HSC-T6 en reposo, medida mediante QRT-PCR y análisis de transferencia Northern, y previene la inducción de $\alpha 1$ producida por trombina, $\text{TGF}\beta 1$ y PDGF.

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

La Figura 8 muestra los niveles de deposición de colágeno, hidroxiprolina y ARNm de colágeno de $\alpha 1$ en los hígados de ratas BDL tratadas o no tratadas con 6ECDCA.

Definiciones

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

El término "inhibir" o "inhibición", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier efecto positivo detectable sobre el desarrollo o la progresión de una enfermedad o afección. Dicho efecto positivo puede incluir el retraso o la prevención de la aparición de al menos un síntoma o signo de la enfermedad o afección, alivio o inversión del/de los síntoma/s o signo/s, y la ralentización o prevención del empeoramiento adicional del/de los síntoma/s o signo/s.

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

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

Un "ligando" específico de FXR se refiere a un compuesto natural o sintético que se une a FXR y así puede estimular específicamente la actividad transcripcional de FXR dependiente del ligando diferenciada del nivel basal determinado en ausencia de cualquier ligando. En la presente solicitud, la expresión "un ligando de FXR" es intercambiable con "un ligando activador de FXR".

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

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

Descripción detallada de la invención

Por primera vez, se muestra que los ligandos específicos del receptor X farnenoide (FXR), en particular, aquellos capaces de activar a FXR a una concentración baja, son eficaces en el tratamiento o la prevención de la fibrosis en tejidos u órganos tales como el hígado, el riñón y el intestino, en pacientes que no padecen una afección colestásica.

Sin el deseo de quedar ligado a teoría alguna, el presente inventor descubrió que FXR desempeña un papel importante en la regulación de la síntesis del colágeno, principalmente mediante las acciones de SHP que FXR regula directamente de un modo dependiente del ligando. Por lo tanto, este descubrimiento permite el uso de ligandos activadores de FXR para la prevención, el tratamiento y/o la inversión eficaz de la fibrosis en tejidos en los que se expresa FXR, particularmente en pacientes que no padecen ninguna afección para la que se haya sugerido

previamente el uso de ligandos de FXR, por ejemplo, en afecciones colestásicas en las que el efecto terapéutico anticolestásico de un ligando de FXR también pueda inhibir indirectamente la fibrosis.

I. Identificación de la población de pacientes

5 La presente invención se refiere al uso profiláctico y terapéutico de ligandos de FXR en pacientes que: (1) padecen fibrosis o ciertas enfermedades/afecciones que son conocidas por producir fibrosis en un tejido u órgano en el que se expresa FXR; y (2) no padecen una afección colestásica que pueda producir secundariamente fibrosis hepática, en la que dichos pacientes se tratan con un ligando de FXR para inhibir la fibrosis hepática en curso o prevenir el desarrollo de fibrosis hepática. La siguiente descripción permite determinar si un paciente pertenece a la población adecuada para el tratamiento de acuerdo con la presente invención.

A. Expresión de FXR en un órgano

15 En primer lugar, se debe determinar el estado de expresión de FXR en un órgano o un tejido antes de determinar si se puede usar un ligando de FXR para inhibir eficazmente la fibrosis en este órgano. La detección de la expresión de FXR puede realizarse a dos niveles diferentes: nivel de ácido nucleico y nivel de polipéptido.

1. *Expresión de FXR al nivel de ácido nucleico*

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

2. *Expresión de FXR al nivel de proteína*

35 La expresión de FXR en un órgano se puede confirmar mediante la detección de proteína FXR en una muestra de tejido de este órgano. La secuencia de aminoácidos de FXR humano se puede determinar basándose en su secuencia codificante, por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NM_51023, y se expone en publicaciones tales como el documento WO 00/76523. Se pueden usar diversos ensayos inmunológicos (tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA), transferencia Western e inmunohistoquímica) por los expertos en la materia para medir el nivel de producto génico de FXR, en particular, usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan específicamente con el polipéptido FXR (por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Capítulo 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975). Dichas técnicas requieren la preparación de anticuerpos seleccionando anticuerpos con alta especificidad contra el polipéptido FXR o una parte antigénica del mismo. Los métodos de generación de anticuerpos policlonales y monoclonales están muy establecidos, y sus descripciones se pueden encontrar en la bibliografía, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.

Producción de anticuerpos contra FXR

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

60 Para producir antisueros que contengan anticuerpos con la especificidad deseada, se puede usar el polipéptido de interés (por ejemplo, FXR humano) o un fragmento antigénico del mismo, para inmunizar animales adecuados, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cabras, caballos o monos. Se puede usar un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, de acuerdo con un protocolo de inmunización convencional. Como alternativa, se puede conjugar un péptido antigénico sintético derivado de ese polipéptido en particular con una proteína portadora y, posteriormente, usarse como inmunógeno.

La respuesta inmunitaria del animal a la preparación de inmunógenos se controla tomando muestras de sangre y determinando el título de reactividad con el antígeno de interés. Cuando convenga, se obtienen altos títulos de anticuerpo para el antígeno, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Después, se pueden realizar el fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer los anticuerpos específicamente reactivos hacia el antígeno y la purificación de los anticuerpos, véase, Harlow y Lane, *supra*, y las descripciones generales de purificación de proteínas proporcionadas anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen usando diversas técnicas conocidas para los expertos en la materia. Normalmente, se immortalizan células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente mediante la fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976). Otros métodos alternativos de immortalización incluyen, por ejemplo, la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos muy conocidos en la técnica. Las colonias que se generan a partir de células immortalizadas individuales se rastrean para determinar la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede potenciarse mediante diversas técnicas, que incluyen la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado.

Además, también se pueden producir recombinantemente anticuerpos monoclonales tras la identificación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo con la especificidad deseada (por ejemplo, que reconocen específicamente el FXR humano) o un fragmento de unión de dicho anticuerpo rastreando una biblioteca de ADNc de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general descrito resumidamente por Huse *et al.*, *supra*. Los principios y métodos generales de producción de polipéptidos recombinantes tratados anteriormente son aplicables para la producción de anticuerpos mediante métodos recombinantes.

Inmunoensayos para la detección de la expresión de FXR

Una vez que se dispone de los anticuerpos específicos de FXR, se pueden medir la presencia y la cantidad de FXR en una muestra, por ejemplo, una pequeña parte de tejido, mediante una variedad de métodos de inmunoensayo (tales como ELISA o transferencia Western) proporcionando resultados cualitativos y cuantitativos a un experto. Para consultar una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general, véase, por ejemplo, Stites, *supra*; patentes de EE.UU. n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168.

(a) Marcaje en inmunoensayos

Los inmunoensayos suelen utilizar un agente de marcaje para unirse específicamente a y marcar el complejo de unión formado por el anticuerpo y la proteína diana (por ejemplo, FXR humano). El agente de marcaje puede ser por sí mismo una de las fracciones que comprenden el complejo de anticuerpo/proteína diana, o puede ser una tercera fracción, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo de anticuerpo/proteína diana. Un marcador se puede detectar mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, Texas red, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, y otros comúnmente usados en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio coloreado o de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

En algunos casos, el agente de marcaje es un segundo anticuerpo que porta un marcador detectable. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de un marcador, pero, a su vez, puede estar unido por un tercer anticuerpo marcado específico de los anticuerpos de las especies de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo puede modificarse con una fracción detectable, tal como biotina, a la que se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina marcada con una enzima.

También se pueden usar otras proteínas capaces de unirse específicamente a las regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G, como agentes de marcaje. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de las bacterias estreptocócicas. Presentan una potente reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulina de una variedad de especies (véase, en general, Kronval, *et al. J. Immunol.*, 111:1401-1406 (1973); y Akerstrom, *et al., J. Immunol.*, 135:2589-2542 (1985)).

(b) Formatos de inmunoensayo

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

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

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

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

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

Además, también pueden realizarse ensayos funcionales para detectar la presencia de FXR en una muestra de tejido. Los ensayos para detectar la actividad biológica de FXR se describen en general en un apartado posterior.

B. Diagnóstico de fibrosis

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

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

1. Biopsia de detección de la fibrosis hepática

Se han establecido procedimientos convencionales para obtener biopsias de un órgano dado. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de hígado durante la cirugía exploratoria, pero se obtiene más frecuentemente insertando una aguja de biopsia a través de la piel y en el hígado. Antes de realizar este procedimiento, denominado biopsia hepática percutánea, la persona recibe un anestésico local. Se pueden usar ecografías o CT para localizar la zona anormal de la que vaya a tomarse la muestra.

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

Tras obtenerse una biopsia del hígado, se examina la muestra y se asigna una puntuación para indicar la presencia y el nivel de fibrosis de la muestra. Los sistemas de puntuación usados con mayor frecuencia incluyen el sistema de puntuación METAVIR o HAI modificado (ISHAK). También se puede usar el sistema de puntuación Knodell para analizar la muestra hepática. Los criterios usados en la puntuación de las muestras hepáticas están bien establecidos y son conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, el sistema METAVIR proporciona cinco clasificaciones: F0 indica la ausencia de fibrosis; F1 indica fibrosis porta sin septos; F2 indica fibrosis porta y algún septo; F3 indica fibrosis septal sin cirrosis; y F5 indica la presencia de cirrosis. Véase, por ejemplo, Bedossa y

Poynard, *Hepatology* 24:289-293, 1996.

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

2. Marcadores séricos para la fibrosis hepática

Hay numerosos marcadores séricos conocidos cuyo nivel puede ser indicativo de la presencia y/o gravedad de la fibrosis hepática. Los análisis de sangre que miden marcadores, por ejemplo, ácido hialurónico, laminina, propeptidos de undulina (colágeno de tipo IV) de los tipos I, II y IV, colágenos, lisil oxidasa, prolil hidroxilasa, lisil hidroxilasa, PIIINP, PICP, colágeno VI, tenascina, colágeno XIV, laminina P1, TMP-1, MMP-2, macroglobulina α_2 , haptoglobina, gamma glutamil transpeptidasa, globulina γ , bilirrubina total, apolipoproteína A1, etc., de acuerdo con los métodos establecidos pueden ser, por tanto, útiles para tanto el diagnóstico de la fibrosis como el control de la progresión de la fibrosis en el hígado.

3. Otros marcadores

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

C. Identificación de pacientes con elevado riesgo de desarrollar fibrosis

Dado que el método de la presente invención también es eficaz para la prevención de la aparición de fibrosis o la ralentización de su progresión tras la aparición, los pacientes con elevado riesgo de fibrosis se encuentran dentro de la población de pacientes adecuada para el tratamiento usando el método de la presente invención. Dichos pacientes se identifican basándose en el diagnóstico previo de ciertas enfermedades y afecciones que se sabe que conducen a la fibrosis. Los siguientes apartados describen los medios para diagnosticar algunas de estas enfermedades y afecciones. No obstante, hay enfermedades/afecciones adicionales que se sabe que elevan el riesgo de un paciente de desarrollar fibrosis más adelante y que pueden ser diagnosticadas fácilmente por un médico. El tratamiento de pacientes que padecen cualquiera de estas enfermedades/afecciones con un ligando de FXR para prevenir, inhibir o invertir la fibrosis está dentro de la contemplación del presente inventor y dentro del alcance de la presente invención. Dicho tratamiento se puede garantizar durante un corto período de vida, como se garantiza para un paciente dado con una enfermedad/afección dada y como se ha determinado por un experto en la materia de tratamiento de dichos pacientes.

1. Fibrosis hepática

A continuación, se presentan algunos ejemplos de enfermedades conocidas por aumentar significativamente el riesgo de un paciente de desarrollar fibrosis hepática: (i) infecciones hepáticas crónicas (incluyendo infección viral crónica por hepatitis B y hepatitis C; esquistosomiasis y otras enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante); (ii) enfermedad hepática alcohólica; (iii) enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH); (iv) enfermedades del hígado inducidas por fármacos y sustancias químicas (incluyendo metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida y amiodarona); (v) enfermedad autoinmunitaria (incluyendo hepatitis autoinmunitaria, sarcoidosis y hepatitis lupoide); (vi) enfermedades del almacenamiento resultantes de errores congénitos del metabolismo (incluyendo enfermedad de Wilson, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, enfermedades de almacenamiento de glucógeno tipos III, IV, VI, IX y X, deficiencia de α_1 -antitripsina, síndrome de Zellweger, tirosinemia, fructosemia y galactosemia); (vii) trastornos vasculares (que incluyen síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva y trombosis de la vena porta); y (viii) fibrosis hepática congénita.

Hepatitis B

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

La hepatitis B aguda es una enfermedad de corta duración, de aparición rápida, inicial que se produce como consecuencia de la infección por el VHB. Aproximadamente el 70 % de los adultos con hepatitis B aguda tienen

pocos o ningún síntoma, mientras que el 30 % restante desarrolla síntomas significativos de dos a cuatro meses después de la exposición al VHB. Los síntomas más comunes de la hepatitis B aguda son fatiga, pérdida del apetito, náuseas, vómitos, oscurecimiento de la orina, heces claras y dolor abdominal sobre la región del hígado. La ictericia frecuentemente acompaña a estos otros síntomas.

5 El diagnóstico de la hepatitis B crónica puede hacerse, por definición, solo tras seis meses de la aparición de la hepatitis B aguda. La mayoría de los individuos con infección crónica por hepatitis B permanecen asintomáticos durante muchos años, incluso hasta dos o tres décadas. Durante este tiempo, los análisis de sangre del hígado del paciente normalmente son, como mucho, levemente anómalos, y la inflamación y cicatrización (es decir, la fibrosis) del hígado progresa lentamente. Sin embargo, en ocasiones, estos individuos con hepatitis B crónica inactiva pueden desarrollar agravamientos (reactivación) de los síntomas agudos, análisis de sangre elevados del hígado e inflamación hepática. Estos agravamientos se asemejan a la hepatitis aguda y pueden producir la progresión más rápida de la fibrosis hepática.

15 Además de los síntomas anteriormente descritos, el diagnóstico de la hepatitis B se confirma mediante el análisis de sangre en el que se detectan anticuerpos contra el VHB.

Hepatitis C

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

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

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

40 Actualmente, se dispone de una serie de ensayos de diagnóstico de la infección por el VHC. Se han realizado ensayos de detección para determinar la presencia de anticuerpos contra el VHC en la sangre. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (EIA) es el ensayo de detección inicial convencional para diagnosticar la infección por el VHC midiendo anticuerpos específicos de los antígenos del VHC. Este ensayo, por tanto, se denomina el ensayo de los anticuerpos anti-VHC. Los pacientes que tienen niveles elevados de enzimas hepáticas (ALT/AST) y/o cualquiera de los factores de riesgo para el VHC pueden ser diagnosticados de VHC con más del 95 % de certeza cuando el EIA es positivo.

50 Si un individuo con bajo riesgo de infección por el VHC da positivo mediante el EIA, se realiza la prueba confirmatoria usando un ensayo especializado que asimismo analiza los anticuerpos contra las proteínas del VHC. Este ensayo se denomina ensayo de inmunotransferencia recombinante (RIBA).

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

Enfermedad hepática alcohólica

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

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

5

Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se refiere a un amplio espectro de enfermedades del hígado que van desde el hígado graso simple (esteatosis) a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la cirrosis. Todas las etapas de la NAFLD tienen en común la acumulación de grasa en los hepatocitos. En la NASH, la acumulación de grasa está asociada con grados variables de inflamación (hepatitis) y cicatrización (fibrosis) del hígado. La NAFLD y NASH se producen en individuos que no consumen cantidades excesivas de alcohol. Sin embargo, en muchos aspectos, el cuadro histológico de una biopsia de NAFLD es similar al que se puede observar en la enfermedad hepática causada por el alcoholismo. La NAFLD y la NASH se consideran las enfermedades de hígado graso primarias. Las enfermedades de hígado graso secundarias incluyen aquellas que se producen en otros tipos de enfermedad hepática. Así pues, la enfermedad hepática alcohólica (ALD) es la enfermedad de hígado graso secundaria más frecuente. El hígado graso secundario también puede producirse en la hepatitis C viral crónica (VHC), hepatitis B viral crónica (VHB), hepatitis autoinmunitaria crónica (AIH) y enfermedad de Wilson.

Los síntomas de la NAFLD y la NASH son idénticos. Por lo general, no son espectaculares y tienden a ser inespecíficos (como también se puede observar en otras enfermedades). Los síntomas son mínimos en la mayoría de los pacientes, que, no obstante, pueden experimentar dolor abdominal vago del cuadrante superior derecho ocasional. Este dolor es característicamente sordo y persistente, sin un patrón de manifestación predecible. No es un dolor intenso, repentino e intenso, como podría ocurrir, por ejemplo, con los cálculos biliares. Se cree que el dolor abdominal en la NAFLD y NASH se debe al estiramiento del recubrimiento del hígado (cápsula) cuando el hígado se agranda y/o cuando hay inflamación en el hígado. A diferencia de la ALD, la hepatitis B o la hepatitis C, en la NAFLD o NASH, no se observan los síntomas de la insuficiencia hepática aguda grave (por ejemplo, ictericia, fatiga intensa, pérdida del apetito, náuseas, vómitos y confusión). La obesidad y las afecciones relacionadas (por ejemplo, diabetes, hipertensión) se observan frecuentemente entre los que padecen NAFLD o NASH, y los signos clásicos de resistencia a la insulina suelen dominar en la exploración física de la NAFLD y NASH. La acantosis pigmentaria, una pigmentación oscura de la piel de las axilas y del cuello, puede ser un signo de resistencia a la insulina y se observa frecuentemente en niños con NASH. Cuando se palpa el hígado, normalmente se siente normal. Sin embargo, cuando se acumulan grandes cantidades de grasa en el hígado, puede alargarse bastante con un borde redondeado, blando, que el doctor puede palpar con facilidad.

Además de los síntomas descritos anteriormente, el diagnóstico de la NAFLD o NASH se realiza basándose en los siguientes criterios: signos clínicos y/o bioquímicos de resistencia a la insulina; ALT crónicamente elevada; signos de hígado graso con ultrasonidos; exclusión de otras causas de elevación de ALT e hígado graso. Sin embargo, solo una biopsia de hígado puede establecer un diagnóstico definitivo y determinar la gravedad de la NAFLD o la NASH.

40

Enfermedades hepáticas parasitarias

Se conocen diversas enfermedades parasitarias que dañan el hígado y conducen a fibrosis o incluso a cirrosis. La clonorchiasis, por ejemplo, es una infección producida por el trematodo del hígado *Clonorchis sinensis*. Los pacientes inicialmente infectados con este parásito normalmente no tienen síntomas hasta que la carga de gusanos alcanza más de 500. Los síntomas comunes son escalofríos, diarrea, fiebre, dolor abdominal inferior, ictericia e hinchazón del hígado. Para diagnosticar la enfermedad, se debe realizar un historial médico que incluya cuestiones sobre la dieta, viajes, regiones en las que se ha residido con anterioridad. Una exploración física debe incluir una leve palpación del hígado. Otras pruebas adicionales incluyen la endoscopia y el examen de muestras de heces para determinar si hay huevos.

50

O. tenuicollis (*O. felineus*) y *O. viverrini* son otros dos parásitos que están estrechamente relacionados con *Clonorchis sinensis*, y pueden conducir a un daño hepático permanente. Los métodos de diagnóstico son similares a los descritos anteriormente. Se requiere una minuciosa comparación de la morfología de los huevos y los gusanos adultos para distinguir las infecciones por estos parásitos.

55

La esquistosomiasis es otra enfermedad parasitaria del hígado, del tubo gastrointestinal y de la vejiga producida por los esquistosomas, gusanos trematodos que parasitan las personas que entran en contacto con agua contaminada.

Hay tres especies principales de estos gusanos trematodos (trematodos) -- *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* y *S. mansoni* -- que producen la enfermedad en seres humanos. En unos días tras la infección, un paciente puede desarrollar urticaria o picor en la piel. Puede comenzar a sufrir fiebre, escalofríos, tos y dolores musculares en el plazo de 1 a 2 meses desde la infección, aún cuando la mayoría de las personas no tienen síntomas en la fase temprana de la infección. Los huevos de los parásitos se trasladan al hígado o pasan al intestino o a la vejiga. Raramente, los huevos se encuentran en el cerebro o en la médula espinal, y pueden producir convulsiones, parálisis o inflamación de la médula espinal. Para las personas que se infectan repetidas veces

65

durante muchos años, el parásito puede dañar el hígado, los intestinos, los pulmones y la vejiga.

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

Hepatitis autoinmunitaria

La hepatitis autoinmunitaria, también conocida como hepatitis lupoide, implica la inflamación del hígado producida por células inmunitarias que confunden las células normales del hígado con un tejido o patógeno foráneo. Una persona con hepatitis autoinmunitaria tiene autoanticuerpos que circulan en el torrente sanguíneo, que hacen que el sistema inmunitario ataque al hígado. Esta enfermedad está asociada con otras enfermedades autoinmunitarias, que incluyen: tiroiditis, diabetes de tipo 1, colitis ulcerosa, anemia hemolítica y glomerulonefritis proliferativa.

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

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

Sarcoidosis

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

Enfermedades hepáticas neonatales

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

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

Enfermedad de Wilson

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

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

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

Hemocromatosis

La hemocromatosis es un trastorno heredado de acumulación excesiva de hierro en el organismo. Es común entre la

población blanca, afectando aproximadamente a 1 de cada 400 individuos de ascendencia europea. Se cree que los pacientes con hemocromatosis absorben de su dieta excesivas cantidades de hierro, que, con el tiempo, se van acumulando en el hígado, en la médula ósea, en el páncreas, en la piel y en los testículos.

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

10 Los depósitos de hierro en la glándula pituitaria y los testículos producen el encogimiento de los testículos e impotencia. Los depósitos de hierro en el páncreas producen una reducción de la producción de insulina, produciendo diabetes mellitus. Los depósitos de hierro en el músculo del corazón pueden producir insuficiencia cardíaca, además de ritmos anormales del corazón. La acumulación de hierro en el hígado produce cicatrización del hígado (fibrosis y cirrosis) y un alto riesgo de desarrollar cáncer de hígado.

15 La detección inicial de la hemocromatosis implica pruebas de niveles de hierro y ferritina en sangre, siendo la última una proteína de la sangre que sirve de indicador de la cantidad de hierro almacenada en el organismo. Los niveles de hierro y ferritina en sangre son altos en pacientes con. Dado que la ferritina también puede elevarse en ciertas infecciones, tales como la hepatitis viral y otras inflamaciones del cuerpo, el aumento de ferritina solo no basta para diagnosticar con exactitud la hemocromatosis.

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

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

Enfermedades de almacenamiento de glucógeno

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

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

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

50 La enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo IV (enfermedad de Andersen) se caracteriza por la ausencia de enzima de ramificación (α -1,4 a α -1,6), con el resultado de que el glucógeno construido en GSD de tipo

IV tiene ramas externas muy largas y es insoluble. Como el glucógeno anormal se acumula en las células, la muerte celular conduce al daño del órgano. Los lactantes nacidos con GSD IV parecen normales al nacer, pero son diagnosticados con hígados agrandados y retraso del crecimiento dentro de su primer año. Los lactantes que sobreviven más allá de su primer cumpleaños desarrollan cirrosis del hígado a la edad 3 a 5 y mueren como resultado de una insuficiencia hepática crónica. El diagnóstico de esta enfermedad se ayuda de la detección de la estructura del glucógeno anormal característica.

La enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo VI (enfermedad de Hers) se produce por deficiencia de la fosforilasa hepática, que bloquea la primera etapa de la glucogenólisis. A diferencia de la mayoría de las otras GSD, que implican mutaciones autosómicas, la GSD de tipo VI está ligada al cromosoma X. En esta enfermedad, la deficiencia de fosforilasa produce una alta cantidad de glucógeno en el hígado. Los síntomas incluyen agrandamiento del hígado, hipoglucemia, cetosis, hiperuricemia, hiperlipemia, etc. La baja glucemia en sangre es uno de los síntomas clave. Se puede producir un retardo leve del crecimiento en los jóvenes afectados.

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

Una enzima que activa la glucógeno fosforilasa para estimular la rotura del glucógeno en diversos tejidos, PhK, es una enzima tetramérica que consiste en cuatro subunidades diferentes (α , β , γ y δ) que son responsables de diversos subtipos de GSD IX, que se diferencian tanto en el tejido afectado (hígado/músculo/RBC/tejido cardíaco) como en el modo de herencia. Se han clonado genes para las subunidades α , β y γ cartografiadas en el cromosoma X (α), cromosoma 16q12 (β) y cromosoma 7p12 (γ).

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

La forma recesiva autosómica de la deficiencia de PhK afecta tanto al hígado como al músculo dependiendo de si la mutación se ha producido en la subunidad α o β de la enzima. Los síntomas podrían variar desde la miopatía leve con calambres musculares hasta la forma miopática grave.

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

Deficiencia de α 1-antitripsina

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

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

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher se produce por un defecto genético en una enzima glucocerebrosidasa. Esta enzima ayuda al cuerpo a degradar el glucocerebrósido químico. La enzima defectuosa en pacientes con enfermedad de Gaucher conduce a la acumulación de glucocerebrósido en el bazo, en el hígado y en los ganglios linfáticos. La enfermedad de Gaucher es más común en los asquenazíes (judíos de origen europeo), sin embargo, se han descrito variantes en todos los grupos étnicos. Dependiendo del tipo exacto de la enfermedad, los pacientes afectados pueden tener grados variables de los síntomas. El signo temprano más frecuente de la enfermedad de Gaucher es el agrandamiento del bazo. Se puede asociar a fatiga, anemia y un número bajo de plaquetas. La participación ósea

grave puede conducir a dolor y colapso (necrosis aséptica) del hueso de las caderas, hombros y columna vertebral. Puede producirse mala función pulmonar y cerebral, e incluso convulsiones.

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

10 Síndrome de Zellweger

10 El síndrome de Zellweger es un trastorno genético, también denominado síndrome cerebrohepatorrenal, caracterizado por la reducción o ausencia de peroxisomas en las células hepáticas, en los riñones y en el cerebro. El síndrome de Zellweger pertenece a un grupo de trastornos denominados leucodistrofias, que afectan todas a la vaina de mielina, la cubierta grasa que actúa de aislante sobre las fibras nerviosas del cerebro. Las características más comunes del síndrome de Zellweger incluyen un hígado agrandado, altos niveles de hierro y cobre en sangre, y alteraciones de la visión. Algunos lactantes afectados pueden mostrar retraso en el crecimiento prenatal. Los síntomas al nacer pueden incluir falta de tono muscular y una incapacidad para moverse. Otros síntomas pueden incluir características faciales inusuales, retraso mental, convulsiones y una incapacidad para succionar y/o tragar. También pueden producirse ictericia y hemorragia gastrointestinal.

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

20 Tirosinemia

20 La tirosinemia hereditaria es un error metabólico congénito genética asociado a una enfermedad del hígado grave en la infancia. La enfermedad se hereda de un modo recesivo autosómico. Las características clínicas de la enfermedad tienden a clasificarse en dos categorías: en la forma aguda de la enfermedad, las anomalías aparecen en el primer mes de vida. Los bebés pueden mostrar poco aumento de peso, agrandamiento del hígado y del bazo, abdomen distendido, inflamación de las piernas y elevada tendencia a sangrar, particularmente hemorragias nasales. La ictericia puede o puede no ser importante. En una forma más crónica de la tirosinemia, el agrandamiento del hígado y el bazo son importantes, el abdomen está distendido con líquido, el aumento de peso puede ser bajo, y se producen vómitos y diarreas frecuentemente. Los pacientes afectados normalmente desarrollan cirrosis y sus complicaciones. En pacientes mayores, hay un aumento del riesgo de padecer cáncer de hígado.

25 En el diagnóstico de esta enfermedad, se suelen usar pruebas hepáticas. Con frecuencia, se encuentran bajo nivel de albúmina y factores de coagulación en suero. Las enzimas transaminasas del hígado pueden ser de levemente a moderadamente elevadas, pero la bilirrubina aumenta en un grado variable. Debido al defecto bioquímico, pueden medirse productos anormales en la orina que confirman el diagnóstico. Éstos son ácido parahidroxifenil-láctico y ácido parahidroxifenilpirúvico. Además, se encuentran succinilacetona y succinilacetato en la orina. Puede haber hipoglucemia y muestras de pérdida de ciertas sustancias en la orina, incluyendo azúcar, proteínas y aminoácidos. El defecto bioquímico básico es una anomalía en una enzima clave en el metabolismo de un aminoácido esencial, la fenilalanina. La enzima es fumarilacetato hidrolasa (FAH), que se reduce esencialmente en pacientes afectados. Es posible el diagnóstico prenatal y puede realizarse midiendo succinilacetona en el líquido amniótico o fumarilacetato hidrolasa (FAH) en células del líquido amniótico.

30 Fructosemia

30 La fructosemia, también conocida como intolerancia a la fructosa o deficiencia de la fructosa aldolasa B, es una enfermedad metabólica producida por la ausencia de una enzima, la 1-fosfofructaldolasa (es decir, fructosa aldolasa B). La intolerancia a la fructosa hereditaria se hereda como una enfermedad recesiva autosómica. Puede ser tan común como 1 de cada 20.000 en algunos países europeos. En personas intolerantes a la fructosa, la ingestión de fructosa (azúcar de la fruta) y de sacarosa (azúcar de caña o de remolacha, azúcar de mesa) produce complejos cambios químicos que no pueden corregirse debido a la ausencia de la enzima 1-fosfofructaldolasa. La ingestión de fructosa produce hipoglucemia profunda y daño hepático progresivo. El diagnóstico de esta afección se basa en los síntomas de intolerancia a la fructosa, en los resultados obtenidos mediante ensayos que miden el nivel de fructosa aldolasa B y análisis genéticos para identificar la mutación (mutaciones) en el gen.

35 Galactosemia

35 La galactosemia es una enfermedad rara hereditaria que conduce no solo a cirrosis en lactantes, sino lo que es más grave, a una enfermedad precoz que resulta devastadora si no se diagnostica rápidamente. Esta enfermedad se produce por niveles elevados de galactosa en sangre como consecuencia de una deficiencia de la enzima hepática, GALT (galactosa-1-fosfato uridil transferasa), necesaria para su metabolismo. La galactosemia se hereda como un

rasgo recesivo autosómico. Hay dos formas de la enfermedad, deficiencia de GALT (galactosemia clásica) y deficiencia de galactosa quinasa. De las dos, la deficiencia de GALT es la más grave. El gen GALT está en el cromosoma 9p13.

5 Las personas con galactosemia son incapaces de metabolizar el azúcar simple galactosa. Si un lactante con galactosemia recibe leche, la galactosa se acumula en el sistema del lactante causando daño hepático, cerebral, renal y ocular. Los individuos con galactosemia no pueden tolerar ninguna forma de leche (humana o de otro tipo) ni ningún otro alimento que contenga galactosa. La exposición a productos lácteos producirá daño hepático, retraso mental, formación de cataratas e insuficiencia renal. Por lo general, un lactante recién nacido con galactosemia, tras ser alimentado con leche, desarrollará ictericia, vómitos, letargo, irritabilidad y convulsiones. El hígado se agranda y la glucemia puede ser baja. La alimentación continuada con productos lácteos al lactante conduce a cirrosis hepática, formación de cataratas en el ojo produciendo ceguera parcial y retraso mental.

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

20 El diagnóstico se basa normalmente en la demostración de una falta de actividad de la enzima GALT en los eritrocitos. El diagnóstico prenatal también es viable mediante la medición directa de la enzima. También es posible la prueba basada en el ADN para diagnosticar la afección.

Afección inflamatoria crónica

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

30 Los signos clínicos de esta enfermedad pueden variar de leves a graves. Los síntomas típicos pueden incluir fatiga, pérdida de peso, náuseas, vómitos, aumento de la micción y defecación, acumulación de líquido en el abdomen (ascitis), ictericia, sangre en las heces y comportamiento neurológico anormal. El diagnóstico definitivo de la enfermedad hepática inflamatoria crónica se realiza mediante el examen de una muestra de biopsia.

Desarreglo vascular

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

Toxicidad a fármacos

45 Las toxinas tales como el alcohol, los fármacos o los venenos pueden producir hepatitis directamente (dañando el tejido hepático) o indirectamente (reduciendo las defensas o estimulando una respuesta autoinmunitaria); ambos casos pueden conducir a fibrosis hepática.

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

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

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

65 En general, los pacientes con riesgo de desarrollar fibrosis hepática debido a su exposición a fármacos o toxinas se identifican por revisión de sus antecedentes médicos y el control continuado en su función hepática.

Fibrosis hepática congénita

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

2. Fibrosis intestinal

Se conocen varias enfermedades que aumentan el riesgo de un paciente a desarrollar fibrosis intestinal, que incluyen: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis posterior a la radiación y colitis microscópica.

Enfermedad de Crohn

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

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

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

La ileítis terminal de Crohn e ileo-colitis son los tipos más comunes de enfermedad de Crohn. Hasta un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn puede tener una o más de las siguientes afecciones que implican la zona anal:

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

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

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

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

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

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

Colitis ulcerosa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 Colitis tras la radiación

La colitis tras la radiación es un tipo de irritación del colon persistente que se produce en pacientes que se han expuesto previamente a una cantidad significativa de irradiación, tales como aquellos que han recibido radioterapia para tratar el cáncer. Aunque los síntomas generales son similares a los de las afecciones de colon irritado no relacionadas con la radiación, tales como el dolor y la diarrea crónica, los pacientes que padecen colitis tras la radiación se identifican fácilmente basándose en sus antecedentes médicos.

15 Colitis microscópica

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

25 *3. Fibrosis renal*

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

35 Nefropatía diabética

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

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

45 En general, la nefropatía diabética produce una alteración progresiva de la función renal. En su forma grave, esta enfermedad puede conducir a insuficiencia renal y enfermedad renal terminal, y un paciente puede requerir diálisis renal crónica o un trasplante de riñón. La nefropatía diabética también se denomina glomerulonefritis intercapilar.

50 Nefroesclerosis hipertensiva

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

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

60 Glomerulonefritis crónica

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

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

5 Hay varias afecciones diferentes que pueden producir glomerulonefritis o ser consecuencia de la glomerulonefritis. Algunas de estas afecciones se describen más adelante. Un ejemplo de una afección relacionada con la glomerulonefritis es la nefropatía por IgA, una enfermedad renal en la que la IgA se deposita dentro de los glomérulos del riñón. Los depósitos de IgA previenen este proceso de filtración, conduciendo a los síntomas de
10 sangre y proteína en la orina e inflamación de las manos y de los pies. Esta enfermedad produce inflamación glomerular que, en última instancia, produce la alteración o incluso la pérdida completa de la función renal.

Las enfermedades autoinmunitarias también pueden dar lugar a glomerulonefritis. Un ejemplo es la nefritis lúpica (o glomerulonefritis secundaria al lupus). En otros casos, las infecciones por bacterias (por ejemplo, estreptococos) o virus (por ejemplo, VIH o VHB), particularmente, en niños menores de diez años, pueden producir glomerulonefritis
15 posteriores a la infección.

La glomerulonefritis también se refiere a glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), una enfermedad que se produce cuando se forma tejido cicatricial en algunos de los glomérulos del riñón. El término "focal" significa que algunos de los glomérulos cicatrizan, mientras que otros siguen normales. El término "segmentaria" significa que solo se daña parte de un glomérulo individual. Los síntomas de la FSGS incluyen orina espumosa, hinchazón del cuerpo (es decir, edema generalizado por la retención de líquidos), aumento de peso y falta de apetito.
20

Puede hacerse un diagnóstico basándose en: un análisis de orina, que muestre proteína, con o sin pequeñas cantidades de sangre; una biopsia renal, que muestre evidencia de cicatrización; y una prueba de microscopía de inmunofluorescencia, que muestre depósitos de IgM.
25

Hay dos tipos de glomerulonefritis membranoproliferativa, que son trastornos renales con síntomas similares que producen alteración o reducción de la función renal, producida por inflamación y cambios en la estructura microscópica de células renales. Los síntomas incluyen: sangre en la orina, oscurecimiento de la orina, orina turbia, reducción en el volumen de orina, hinchazón de cualquier parte del cuerpo, cambios en el estado mental (por ejemplo, reducción de la vigilia, reducción de la concentración). Una exploración física revelará estos síntomas en un grado variable. El diagnóstico se ayuda del análisis de orina y se confirma por biopsias de riñón.
30

La glomerulonefritis rápidamente progresiva es una forma de enfermedad renal que produce daño en las estructuras internas de los riñones y la pérdida rápida de la función, con anomalías en forma de media luna que se muestran sobre una biopsia del riñón. Los síntomas comunes incluyen: edema, orina oscura o de color humo, sangre en la orina, reducción del volumen de orina, fiebre, dolores musculares, dolores de las articulaciones, falta de aliento, tos, malestar general, dolor abdominal, pérdida del apetito, diarrea y similares. Para diagnosticar esta afección, una exploración física combinada con análisis de sangre y análisis de orina puede revelar muchos de los síntomas anteriores, además de BUN y creatinina elevados, reducción de la eliminación de creatinina y/o presencia de anticuerpos anti-membrana basal glomerular y anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos (ANCA). Una biopsia de riñón confirma la glomerulonefritis en forma de media luna.
35

La esclerodermia es una enfermedad autoinmunitaria del tejido conjuntivo, también denominada esclerosis sistémica. Esta afección se caracteriza por fibrosis en la piel y en los órganos del cuerpo. El diagnóstico de la esclerodermia se basa en el hallazgo de las características clínicas de las enfermedades. Casi todos los pacientes con esclerodermia tienen análisis de sangre que sugieren autoinmunidad, anticuerpos antinucleares (ANA). Un determinado anticuerpo, el anticuerpo anticentrómero, se encuentra casi exclusivamente en la forma limitada, o CREST, de la esclerodermia. El anticuerpo anti-Sc1 70 (anticuerpo anti-topoisomerasa I) se observa casi siempre en pacientes con la forma difusa de la esclerodermia.
40
45
50

La vasculitis es un término general para un grupo de enfermedades no comunes que caracterizan la inflamación de los vasos sanguíneos, conduciendo a daños en las paredes de diversos vasos sanguíneos. Los análisis de sangre o de líquidos corporales de un paciente con vasculitis activa, en general, indican inflamación en el cuerpo. Dependiendo del grado de participación del órgano, una variedad de pruebas de la función del órgano pueden ser anormales y, por tanto, indicativas de la afección. El diagnóstico de la vasculitis se establece, al final, después de que una biopsia del tejido afectado (por ejemplo, de riñón) demuestre el patrón de inflamación de los vasos sanguíneos. Dependiendo de la situación, una alternativa a la biopsia puede ser una prueba de rayos X de los vasos sanguíneos, por ejemplo, un angiograma.
55
60

La granulomatosis de Wegener (WG) es una enfermedad rara que afecta a muchos órganos diferentes que incluyen el aparato respiratorio (senos, nariz, tráquea y los pulmones) y los riñones. Una de las principales características de la enfermedad es una inflamación de los vasos sanguíneos (o vasculitis). La inflamación estrecha los vasos sanguíneos y reduce la circulación sanguínea a los órganos afectados, dañando posteriormente los tejidos y órganos afectados.
65

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

El análisis de sangre de pacientes con WG frecuentemente muestra anemia (bajo número de glóbulos rojos) y altos números de leucocitos. Si los riñones se ven afectados, se observan glóbulos rojos en la orina cuando se visualizan bajo un microscopio. Además, los análisis de sangre destinados a medir la función renal pueden mostrar anomalías. Se usa radiografía del tórax para determinar si los pulmones están afectados. La biopsia renal y el TAC de senos o pulmones también son herramientas importantes que se usan en el diagnóstico de la WG.

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

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

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

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

Glomerulopatía crónica del trasplante

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

Nefritis intersticial crónica

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

Un examen de un paciente que padece nefritis intersticial puede revelar edema o sobrecarga de fluido, o signos de empobrecimiento del volumen, con ruidos anormales oídos cuando se escucha con un estetoscopio el corazón o los pulmones. La tensión arterial es comúnmente alta. Un análisis de orina frecuentemente muestra pequeñas cantidades de proteína y, algunas veces, glóbulos rojos, células tubulares renales y otras anomalías. Se suelen

observar WBC y cilindros de WBC en la orina (particularmente, eosinófilos). Los CBC pueden demostrar eosinofilia (superior al número de eosinófilos normal). La gravedad específica de la orina y la osmolalidad muestran que hay un fallo en la concentración de la orina, incluso cuando se limita la ingestión de agua. El pH de la orina puede mostrar un fallo en la acidificación apropiada de la orina. Los gases de la sangre arterial y la química de la sangre pueden mostrar acidosis metabólica. Se usan los niveles de BUN y de creatinina para evaluar el nivel de funcionamiento del riñón. RBC - la orina muestra un alto nivel de glóbulos rojos que indican enfermedad renal. Finalmente, una biopsia de riñón puede confirmar el diagnóstico de nefritis intersticial, y usarse para evaluar el grado de daño renal.

Enfermedad renal poliquística

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

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

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

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

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

Los métodos de generación de imágenes más potentes tales como TAC e IRM también pueden detectar los quistes. El avance en la tecnología molecular también ha hecho de las pruebas de ADN una posibilidad de confirmar un diagnóstico de PKD dominante autosómica antes de que se desarrollen los quistes.

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

Los síntomas de la PKD recesiva autosómica pueden comenzar en los primeros meses de vida, incluso en el útero, de manera que se suele denominar "PKD infantil". Los niños nacidos con PKD recesiva autosómica normalmente desarrollan insuficiencia renal en el transcurso de unos cuantos años. La gravedad de la enfermedad varía. Los bebés con los peores casos mueren horas o días después de nacer. Los niños con una versión infantil pueden tener suficiente función renal para realizar las actividades normales durante algunos años. Las personas con la versión juvenil pueden vivir en su adolescencia y veintena, y normalmente también padecen problemas hepáticos.

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

En el diagnóstico de esta enfermedad, la ecografía del feto o del recién nacido puede revelar quistes en los riñones,

pero no distingue entre los quistes de la PKD recesiva autosómica y de la dominante autosómica. Una ecografía de los riñones de parientes puede ser útil para hacer el diagnóstico correcto. Por ejemplo, un padre o abuelo con quistes de PKD dominante autosómica podría ayudar a confirmar el diagnóstico de la PKD dominante autosómica en un feto o un niño. Es sumamente raro, aunque no imposible, que una persona con PKD recesiva autosómica sea padre. Dado que la PKD recesiva autosómica tiende a formar cicatrices en el hígado, la ecografía del hígado también ayuda en el diagnóstico.

Al igual que el diagnóstico de la PKD dominante autosómica, la PKD recesiva autosómica también puede diagnosticarse de manera definitiva basándose en el análisis del ADN.

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

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

II. Exclusión de afecciones colestásticas

A. Afecciones colestásticas

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

B. Diagnóstico de las afecciones colestásticas

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

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

La cirrosis biliar primaria (PBC) es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación y destrucción progresiva lenta de los conductos biliares pequeños del hígado. La inflamación y la destrucción interfieren con la secreción de bilis, producen cicatrización y, finalmente, conducen a cirrosis. En las fases tempranas de la PBC, el principal problema es la formación de sustancias (como ácidos biliares, colesterol) en la sangre, que normalmente se eliminan en la bilis. Muchos pacientes con PBC no tienen síntomas de enfermedad y se diagnostican al encontrarse una anomalía en el análisis de sangre habitual del hígado. El picor y la fatiga son síntomas comunes. Otros signos incluyen ictericia, depósitos de colesterol en la piel, acumulación de líquido en los tobillos y en el abdomen, y oscurecimiento de la piel. Otros varios síntomas se suelen asociar con la PBC. El más común es la alteración del funcionamiento de las glándulas lacrimales y salivares, causando ojos o boca seca. También se pueden presentar artritis y problemas de tiroides. Pueden desarrollarse cálculos renales y cálculos biliares. Pueden producirse ablandamiento y fragilidad de los huesos, que conducen a fracturas en las etapas finales de la enfermedad.

El diagnóstico de PBC se basa en varias indicaciones: el paciente puede tener síntomas (tales como picor) que sugieren daño de los conductos biliares; análisis de laboratorio, tales como el análisis de la actividad de fosfatasa alcalina, pueden confirmar el diagnóstico. El ensayo para determinar los anticuerpos antimitocondriales (AMA) es particularmente útil, ya que es positivo en casi todos los pacientes con PBC. Raras veces, los conductos biliares se radiografían para descartar otras posibles causas de enfermedad de los conductos biliares, tales como obstrucción. Una biopsia de hígado es útil para confirmar el diagnóstico, y dar información sobre la gravedad y el grado del daño hepático.

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

En un paciente que padece colangitis esclerosante primaria (PSC), los conductos biliares de dentro y fuera del hígado se inflaman y cicatrizan. A medida que aumenta la cicatrización, los conductos se bloquean, lo que conduce a la acumulación de bilis en el hígado y al daño de las células hepáticas. Se ha especulado sobre diversas causas de la PSC, incluyendo la infección bacteriana o viral, o anomalías del sistema inmunitario.

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

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

La colestasis hereditaria es una forma heredada de afección colestásica, una enfermedad recesiva autosómica. Con muchos síntomas similares a aquellos del tipo no hereditario de colestasis, dicha afección se diagnostica y distingue del tipo no hereditario basándose en la aparición temprana de los síntomas y en los antecedentes médicos familiares. La prueba genética es el método más fiable para identificar pacientes con dicha afección. Por ejemplo, se han identificado ATP8B1 (FIC1) y ABCB11 (BSEP) como dos genes que participan en la colestasis hereditaria (véase, por ejemplo, van Mil *et al.*, *Semin Liver Dis.* 21:535-44, 2001; Chen *et al.*, *J Pediatr.* 140:119-24, 2002).

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

La colestasis asociada a la nutrición parenteral total es un tipo de colestasis que se produce en pacientes que reciben el 100 % de su nutrición por vía parenteral. Aunque las características clínicas pueden ser similares a otras afecciones colestásicas, estos pacientes son fáciles de identificar, ya que están recibiendo nutrición líquida mediante un catéter por vía intravenosa.

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

La fibrosis quística (FQ), producida por un defecto genético heredado de un modo recesivo autosómico, es una enfermedad crónica, progresiva y frecuentemente mortal de las glándulas mucosas del cuerpo. Las características clínicas de esta enfermedad incluyen: infecciones crónicas de los pulmones, enfisema, insuficiencia respiratoria progresiva, problemas gastrointestinales (incluyendo páncreas e hígado), insuficiencia pancreática (sin secreción de tripsina y otras enzimas digestivas en el intestino), obstrucción intestinal al nacer, deficiencia continua de enzimas pancreáticas, obstrucción de los conductos biliares, constricción del conducto biliar común, cirrosis del hígado, episodios recurrentes de dolor en la parte inferior derecha del abdomen, adenocarcinoma del íleon, problemas del corazón tales como cardiopatía pulmonar, y problemas reproductivos tales como infertilidad masculina. Los ensayos de laboratorio son necesarios para diagnosticar la FQ. Un paciente con FQ suele presentar resultados positivos del

análisis del sudor, carece de tripsina en las heces (y alto nivel de tripsina en suero sanguíneo). Se ha identificado el gen implicado en la FQ, por lo que la prueba del ADN es la herramienta de diagnóstico más fiable para dicha afección.

5 III. Ligandos de FXR

A. Ensayos para identificar los ligandos de FXR

10 Se han establecido varios sistemas de ensayo para identificar los ligandos de FXR, en particular, aquellos con alta potencia para activar FXR. Por ejemplo, se puede ensayar un compuesto candidato en un ensayo de reclutamiento de correguladores exentos de células para determinar si el compuesto es un ligando activador de FXR y su eficacia. En resumen, este sistema utiliza la unión entre FXR y una proteína o péptido corregulador. Los correguladores son proteínas nucleares conocidas por ser reclutadas para FXR tras la unión de FXR a su ligando (por ejemplo, SRC1).
 15 El reclutamiento dependiente del ligando de una proteína o péptido corregulador para FXR se mide mediante diversos métodos tales como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización por fluorescencia o ensayos de proximidad luminiscente. Se puede usar bien FXR humano o FXR de rata con este fin. Para una descripción detallada de dicho sistema de ensayo, véanse, por ejemplo, Maloney *et al.*, *J. Med. Chem.*, 43:2971-2974, 2000; Pellicciari *et al.*, *J. Med. Chem.*, 45:3569-3572, 2002; Cui *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 277:25963-25969, 2002; y Jones *et al.*, *Methods Enzymol.*, 364:53-71, 2003.

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

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

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

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

45 Los compuestos de estructuras químicas similares o distintas han demostrado su capacidad para unirse específicamente a FXR. Por ejemplo, los documentos W000/40965, W000/76523, W003/015771, W003/015777, W003/016280, W003/016288, W003/030612 y W003/043581 proporcionan una lista larga de dichos compuestos como posibles candidatos para ligandos de activación de FXR.

B. Ejemplos de ligandos de activación de FXR conocidos

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

65

IV. Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de ligando de FXR para tratar la fibrosis en aplicaciones tanto profilácticas como terapéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos de administración de fármacos, véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por diversas vías, por ejemplo, oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Las vías de administración citadas de las composiciones farmacéuticas son oral, subcutánea e intravenosa a dosis diarias de aproximadamente 0,01-5.000 mg, preferentemente 5-500 mg, del ligando de FXR para un ser humano adulto de 70 kg al día. Las dosis apropiadas se pueden administrar en una sola dosis diaria o como dosis divididas presentadas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día.

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

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir la formulación del compuesto activo de un ligando de FXR con material de encapsulación como vehículo que proporciona una cápsula en la que el ligando de FXR (con o sin otros vehículos) está rodeado por el vehículo, de forma que el vehículo esté así en asociación con el compuesto. De una manera similar, también se pueden incluir sellos. Se pueden usar comprimidos, polvos, sellos y cápsulas como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

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

Las soluciones estériles se pueden preparar disolviendo el componente activo (por ejemplo, un ligando de FXR) en el sistema de disolventes deseado, y haciendo pasar, a continuación, la solución resultante a través de un filtro de membrana para su esterilización o, como alternativa, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tales, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9, y lo más preferentemente de 7 a 8.

Las composiciones farmacéuticas que contienen ligandos de FXR se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece fibrosis de un órgano en el que se expresa FXR, en una cantidad suficiente para prevenir, curar, invertir, o al menos ralentizar o detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este

uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección, y del peso y estado general del paciente, pero, en general, varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg del compuesto al día para un paciente de 70 kg, usándose más comúnmente dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto al día para un paciente de 70 kg.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas que contienen ligandos de FXR se administran a un paciente susceptible a o, de otro modo, en riesgo de desarrollar fibrosis en un órgano en el que se expresa FXR, por ejemplo, hígado, riñón, intestino, etc., en una cantidad suficiente para retardar o prevenir la aparición de los síntomas de la fibrosis. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades exactas del ligando de FXR dependen de nuevo del estado de salud y del peso del paciente, pero, en general, varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.000 mg para un paciente de 70 kg al día, más comúnmente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg para un paciente de 70 kg al día.

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se pueden llevar a cabo con niveles y patrón de dosis que se seleccionan mediante el médico tratante. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de un ligando de FXR suficiente para inhibir eficazmente la fibrosis en el paciente, tanto terapéutica como profilácticamente.

V. KITS

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

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente a modo ilustrativo, y no a modo de limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no fundamentales que se podrían cambiar o modificar para producir resultados esencialmente similares.

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

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

Los ácidos biliares actúan como moléculas de señalización que regulan su propia biosíntesis y transporte uniéndose al y activando el receptor X farnesiloide (FXR), también conocido como NR1H4, y el receptor de ácido biliar (BAR), un receptor nuclear expresado en tejidos expuestos a los ácidos biliares, tales como hígado, intestino, vesícula biliar y riñón. El FXR altera la transcripción uniendo secuencias de ADN compuestas de dos repeticiones invertidas por un nucleótido (IR-1) como un heterodímero con el receptor de ácido 9-cis-retinoico (9-cis-RA) (RXR, también conocido como NR2B1). En los hepatocitos, tras la activación, FXR inicia una transcripción de una cohorte de genes que sirve para reducir la concentración de ácidos biliares dentro del hepatocito. En concreto, el FXR activado induce la expresión de los genes que codifican BSEP, proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos (MDR3; ABCB4) y MRP2. Además, la activación de FXR tanto por sus ligandos naturales (por ejemplo, ácido quenodesoxicólico, CDCA) como por los ligandos sintéticos (por ejemplo, 6ECDCA y GW4064) conduce a una represión de la retroalimentación del polipéptido cotransportador de Na^+ /taurocolato (NTCP; SLC10A1), CYP7A1 y CYP8B1. Estos genes codifican la colesterol 7 α -hidroxilasa y la estero 12 α -hidroxilasa, ambos de los cuales son fundamentales para la síntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol. La supresión dependiente de FXR de CYP7A1 está mediada por el represor transcripcional, componente heterodimérico corto (SHP; NR0B2), un receptor nuclear atípico que carece de un dominio de unión al ADN. Así pues, tras la activación, FXR induce directamente la expresión de SHP,

que, a su vez, interacciona con el homólogo 1 del receptor del hígado (LRH-1; NR5A2), un regulador positivo conocido de CYP7A1 y reprime su actividad transcripcional. Los estudios realizados en ratones que alojan un gen SHP afectado han confirmado la importancia de la cascada de FXR-SHP-LRH-1 en la supresión de CYP7A1 (véase, por ejemplo, Forman *et al.*, *Cell* 81:687-693, 1995; Seol *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 9:72-85, 1995; Sinal *et al.*, *Cell* 102:731-744, 2000; Ananthanarayanan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 28857-28865, 2001; Holt *et al.*, *Genes Dev.*, 17:1581-91, 2003; Kast *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277:2908-2915, 2002; Goodwin *et al.*, *Mol. Cell* 6:517-526, 2000; y Lu *et al.*, *Mol. Cell* 6:507-515, 2000).

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

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

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

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

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

Como se ilustra en la Figura 5, los ligandos de FXR también inhiben la liberación de colágeno $\alpha 1$, medida determinando concentraciones de hidroxiprolina en sobrenadantes celulares, una medida de liberación de colágeno desde las HSC.

Dado que el gen $\alpha 1$ carece de un IR que pueda ser usado por FXR para unirse al promotor de $\alpha 1$, los presentes inventores han investigado mediadores que participan en la inhibición de la expresión de $\alpha 1$ inducida por ligandos de FXR en HSC, y han encontrado pruebas de que la inducción de SHP es estrictamente necesaria para que los ligandos de FXR puedan inhibir la expresión de $\alpha 1$. De hecho, como se ilustra en la Figura 6, la sobreexpresión de SHP en HSC-T6 suprime la expresión de $\alpha 1$ en HSC-T6 en reposo, medida mediante QRT-PCR (Panel a) y análisis de transferencia Northern (Panel b), y previene la inducción de $\alpha 1$ producida por trombina, TGFP1 y PDGF.

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

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

Materiales y métodos

PCR en tiempo real

Se realizó la cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-

RT-PCR). Se aisló ARN total (reactivo TRIzol-Invitrogen) de células estrelladas hepáticas de rata (HSC) o línea celular T6 privada durante 24 h, y se estimuló con ligando de FXR 6ECDCA 1 μ M durante 18 horas. Se purificó un μ g de ARN del ADN genómico mediante el tratamiento con DNasa I (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente. Se inactivó la DNasa I a 95 °C durante 5 minutos en presencia de EDTA 2,5 mM. Se transcribió el de
 5 forma inversa aleatoria con Superscript III (Invitrogen) en 20 μ l de volumen de reacción. Se usaron cien ng de molde en 25 μ l de volumen final. La reacción de PCR en tiempo real contenía los siguientes reactivos: 0,3 μ M de cada cebador y 12,5 μ l de 2 x mezcla maestra para PCR SYBR Green (Bio-Rad). Todas las reacciones se realizaron por triplicado y las condiciones de los ciclos térmicos fueron: 2 minutos a 95 °C, seguido de 50 ciclos a 95 °C durante 10
 10 segundos, y 60 °C durante 30 segundos en el instrumento iCycler iQ (Biorad, Hercules, CA). Se calculó el valor medio de los duplicados para cada muestra y se expresó como ciclo umbral (CT: número de ciclos a los que cada reacción de PCR alcanza un umbral de fluorescencia predeterminado, fijado dentro del intervalo lineal de todas las reacciones). Entonces, se calculó la cantidad de expresión génica como la diferencia (ΔC_T) entre el valor de C_T de la muestra para el gen diana y el valor de C_T medio de esa muestra para el control endógeno (Actina). Se calculó la expresión relativa como la diferencia ($\Delta\Delta C_T$) entre los valores de ΔC_T de la muestra de ensayo y de la muestra de control (WT) para cada gen diana. Se expresó el valor de cuantificación relativo y se muestra como $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Todos
 15 los cebadores de PCR se diseñaron usando el software PRIMER3-OUTPUT, usando datos de secuencias publicadas de la base de datos NCBI. Cebadores: SHP de rata: 5' cctggagcagccctcgt 3' y 5' aacctgtatgcaaaccgagga 3'; FXR de rata: 5' tggactcatacagcaaacagaga 3' y 5' gtctgaaaccctggaagtctttt 3'; Col1A1 de rata: 5' tctccaagagcagggttc 3' y 5' ggtagcttcggctcatgc 3'; c-Jun de rata: 5' gaagcagagcatgaccttga 3' y 5' gacgtgagaaggtccgagtt 3'; JunD de rata: 5' atctgggctgctcaaactc 3' y 5' gccacctagggtagaggaa 3'; actina de rata: 5' ttaatgctcacgcacgatttc 3' y 5' taccactggcattgttgatg 3'.

Análisis de transferencia Northern

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

Análisis de transferencia Western

Se privaron de suero cultivos confluentes de líneas celulares HSC o T6 durante 48 h y, a continuación, se incubaron durante 18 h a 37 °C en DMEM con o sin bien trombina (10 unidades/ml), 6ECDCA (1 μ M). Se prepararon lisados
 40 totales por solubilización de células en tampón de muestra SDS-Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol al 10 %, SDS al 2 %, azul de bromofenol al 0,015 %) y se sometieron 3-4 x 10⁵ células a electroforesis sobre geles de poliacrilamida al 10 %. Entonces, se transfirieron las proteínas separadas a membranas de nitrocelulosa (BioRad), y se sondaron las membranas con anticuerpos primarios contra c-Jun, JunD, SHP, FXR, α SMA (Santa Cruz Biotechnology). Se añadió el conjugado de anti-inmunoglobulina G-peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad) como anticuerpo secundario, y se visualizaron bandas de proteínas específicas usando quimioluminiscencia potenciada
 45 (ECL; Amersham corp.) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Ensayo de coimmunoprecipitación

Para preparar extractos para la inmunoprecipitación, primero se lavaron células HSC primarias o T6 y T6 con sobreexpresión de células SHP tres veces con PBS helado y, a continuación, se lisaron por sonicación en tampón E1A (HEPES 50 mM, pH 7, NaCl 250 mM, NP-40 al 0,1 %, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 mg/ml de leupeptina, 1 mg/ml de aprotinina y 1 mg/ml de pepstatina A). Se aclararon los lisados de detritos de membrana por centrifugación a 13.000 g durante 10 min, y se ajustaron las concentraciones de proteína de los extractos de sobrenadante a 1 mg/ml. Se inmunoprecipitaron proteínas totales de uno a cuatro mg de o 10⁷ lisados
 50 celulares con anti-SHP, anti-JunD o anti-c-Jun (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) o anti-CD28 como anticuerpo sin correlacionar (control) durante la noche a +4 °C en presencia de 10 μ l de proteína A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotechnology, Piscataway, New Jersey). Se lavó el inmunoprecipitado resultante 5 veces con E1A y, a continuación, se sometió a SDS-PAGE y se inmunotransfirió con anticuerpos (inversos) usados en inmunoprecipitados.
 60

Transducción del gen SHP mediado por vector viral en linfocitos T6

Se clonó la secuencia codificante de SHP de hepatocito primario de rata. En resumen, se retro- transcribió un μ g de ARN total con transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) en 20 μ l de reacción usando hexámeros aleatorios
 65 0,3 μ M. Se usaron doscientos de molde de ADNc para amplificar la secuencia codificante de SHP con ADN

polimerasa Pfu (Stratagene) en 50 μ l de reacción de PCR usando cebadores específicos 5'-CATGAGCACCAGCCAACCAG-3' y 5'-CTGGAACAGGTCACCTGAGC-3'. Se clonó la secuencia codificante de SHP primero en el vector pCR2.1 (clonación TOPO-TA - Invitrogen) y, a continuación, se subclonó en el vector retroviral PINCO. Se cultivaron células empaquetadoras modificadas 293T (ϕ NX) en medio DMEM con 10 % de SBF y se transfectoron transitoriamente con fosfato de calcio con la quimera PINCO-SHP y PINCO solo como control negativo. 48 horas después de la transfección, se recuperó el sobrenadante viral y se usó para infectar células T6. El vector PINCO conduce el gen EGFP (proteína de fluorescencia verde esmeralda) que permite la separación de las células infectadas (verde) de las células no infectadas. Se obtuvo una población pura de células T6 que expresa SHP por separación en FACS (clasificador celular activado por fluorescencia). La expresión de SHP se detectó mediante análisis de transferencia Western.

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

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

Al final del estudio, se sacrificaron las ratas supervivientes bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p) y se sangraron terminalmente mediante punción cardiaca. Se centrifugó la sangre a 7.250 g durante 20 minutos a 4 °C; se almacenó el suero resultante a -20 °C hasta el análisis (un máximo de 2 semanas). En el momento de la muerte, se confirmó que la ligadura de los conductos biliares estaba intacta con dilatación proximal del conducto biliar común. Tras la determinación del peso, se congelaron de forma instantánea las muestras de hígado en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C para el análisis posterior. Para el examen histológico, se fijaron partes de los lóbulos derecho e izquierdo del hígado (10-15 mg/cada uno) de cada animal en formalina al 10 %, se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina o rojo sirio. Para la tinción con rojo sirio, se incubaron las secciones durante 30 minutos en rojo sirio F3B al 0,1 % (Sigma Chemical Co.) que contenía ácido pírico saturado y Fast Green al 0,1 %. Tras aclarar dos veces con agua destilada, se deshidrataron las secciones brevemente con etanol al 70 % y se cubrieron con cubreobjetos. Se cuantificó la densidad superficial del colágeno de las muestras de hígado usando un sistema de análisis de imágenes computerizado como se ha descrito previamente (Imagen Acquisition System Ver. 005, Delta Sistemi, Roma, Italia). Se midió la densidad superficial del colágeno en las muestras con ocultación a un aumento de visualización de la pantalla de vídeo de acuerdo con el método descrito por Rockey y Chung (Rockey, D. C., Chung, J. J. *J. Clin. Invest.* 98:1381-1388, 1996) y se expresó como un porcentaje (la proporción del área superficial de colágeno por superficie de campo analizado total). Se usó la media de la puntuación tomada de 10 campos aleatorios para generar una única puntuación para cada hígado de animal.

Como se ilustra en la Figura 8, la administración *in vivo* de 6ECDCA produjo la reducción significativa de la deposición de colágeno en el hígado, medida por la puntuación de la tinción con rojo sirio (Figura 8a), el contenido de hidroxiprolina del hígado (Figura 8b) y ARNm de α 1 del hígado por RT-PCR (Figura 8c). El análisis cuantitativo de colágeno teñido con rojo sirio en el hígado demostró una reducción en el contenido de colágeno del hígado del 62 % tras el tratamiento con 6ECDCA. En la Figura 8, los datos son la media \pm EE; * indica $p < 0,01$ frente a la operación simulada y **, $p < 0,01$ frente a BDL. "Central" y "porta" se refieren a las zonas de la vena central y del espacio porta, así como la zona parenquimal que rodea inmediatamente estos espacios. "Todo" se refiere a todas las zonas hepáticas, visualizadas con un aumento bajo.

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

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

REALIZACIONES

- 5 1. Un método de inhibición de la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica, método que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando específico para el receptor X fernesioide (FXR), en el que la fibrosis que se inhibe se produce en un órgano donde se expresa FXR, con la condición de que el ligando no es el ácido quenodesoxicólico (CDCA) o ácido ursodesoxicólico (UDCA).
- 10 2. Un método de inhibición de la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica, método que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando específico del receptor X fernesioide (FXR), en el que la fibrosis que se inhibe se produce en un órgano donde se expresa FXR, y en el que el ligando tiene una CE_{50} no superior a $5 \mu M$ en un ensayo de FXR exento de células o en un ensayo de transactivación de FXR a base de células.
- 15 3. El método de la realización 2, en el que el ligando tiene una CE_{50} no superior a $1 \mu M$.
4. El método de la realización 1 o 2, en el que la afección colestásica se define como aquella que tiene niveles en suero anormalmente elevados de fosfatasa alcalina, 7-glutamyl transpeptidasa (GGT) y 5' nucleotidasa.
- 20 5. El método de la realización 4, en el que la afección colestásica se define además como aquella que presenta al menos un síntoma clínico.
6. El método de realización 5, en el que el síntoma es el picor (prurito).
- 25 7. El método de la realización 1 o 2, en el que la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis intestinal.
8. El método de la realización 1 o 2, en el que la afección colestásica se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria y colestasis intrahepática gestacional.
- 30 9. El método de la realización 1 o 2, en el que el sujeto no padece una afección colestásica asociada con una enfermedad o un afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer de hígado y biliar primario, cáncer metastásico, septicemia, nutrición parenteral total crónica, fibrosis quística o enfermedad hepática granulomatosa.
- 35 10. El método de la realización 1 o 2, en el que el ligando se selecciona del grupo que consiste en tauro-6ECDCA, 6EUDCA, 6α -MeCDCA, 6α -PrCDCA, fexaramina y guggulsterona.
- 40 11. El método de la realización 1 o 2, en el que el sujeto tiene fibrosis hepática asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante; enfermedad hepática alcohólica (ALD); enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); enfermedades del hígado inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmunitaria; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de $\alpha 1$ -antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; trastorno vascular asociado al síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva o trombosis de la vena porta; o fibrosis hepática congénita.
- 45 12. El método de la realización 1 o 2, en el que el sujeto tiene fibrosis intestinal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis tras la radiación y colitis microscópica.
- 50 13. El método de la realización 1 o 2, en el que el sujeto tiene fibrosis renal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefrosclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía de trasplante crónica, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.
- 55 14. Un kit de inhibición de la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica, en el que la fibrosis que se inhibe se produce en un órgano donde se expresa el receptor X fernesioide (FXR), kit que comprende:
- 60 una cantidad eficaz de un ligando específico de FXR, con la condición de que el ligando no sea el ácido quenodesoxicólico (CDCA) o ácido ursodesoxicólico (UDCA); y
un material de instrucciones que enseña las indicaciones, la dosis y la pauta de administración del ligando para el paciente.
- 65

15. Un kit de inhibición de la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica, en el que la fibrosis que se inhibe se produce en un órgano donde se expresa el receptor X fernesioide (FXR), kit que comprende:
- 5 una cantidad eficaz de un ligando específico de FXR, en el que el ligando tiene una ECK) no superior a 5 μ M en un ensayo de FXR exento de células o en un ensayo de transactivación de FXR a base de células; y un material de instrucciones que enseña las indicaciones, la dosis y la pauta de administración del ligando para el paciente.
16. El kit de la realización 15, en el que el ligando tiene una CE_{50} no superior a 1 μ M.
- 10 17. El kit de la realización 14 o 15, en el que la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis intestinal.
- 15 18. El kit de la realización 14 o 15, en el que el ligando se selecciona del grupo que consiste en tauro-6ECDCA, 6EUDCA, 6 α -MeCDCA, 6 α -PrCDCA, fexaramina y guggulsterona.
19. El kit de la realización 14 o 15, en el que el ligando se presenta en una composición farmacéutica adecuada para la administración oral o intravenosa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido tauro-6-etil-quenodesoxicólico, ácido 6-etil-urso-desoxicólico, ácido 6- α -metil-quenodesoxicólico, ácido 6- α -propil-quenodesoxicólico, fexamina y guggulsterona para su uso en un método de inhibición de la fibrosis en un sujeto que no padece una afección colestásica, en el que la fibrosis que se inhibe se produce en un órgano donde se expresa FXR.
- 10 2. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en ácido tauro-6-etil-quenodesoxicólico, ácido 6-etil-urso-desoxicólico, ácido 6- α -metil-quenodesoxicólico, ácido 6- α -propil-quenodesoxicólico.
- 15 3. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es ácido tauro-6-etil-quenodesoxicólico.
- 20 4. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la afección colestásica se define como aquella que tiene niveles en suero anormalmente elevados de fosfatasa alcalina, 7-glutamyl transpeptidasa (GGT) y 5' nucleotidasa.
- 25 5. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la afección colestásica se define además como aquella que presenta al menos un síntoma clínico, siendo preferentemente el síntoma picor (prurito).
- 30 6. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis intestinal, teniendo preferentemente el sujeto:
- 35 (i) fibrosis hepática asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores al trasplante; enfermedad hepática alcohólica (ALD); enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); enfermedades del hígado inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmunitaria; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de α_1 -antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; trastorno vascular asociado al síndrome de Budd-Chiari, enfermedad veno-oclusiva o trombosis de la vena porta; y fibrosis hepática congénita; o
- 40 (ii) fibrosis intestinal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis tras la radiación y colitis microscópica; o
- 45 (iii) fibrosis renal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefrosclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía de trasplante crónica, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.
7. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la afección colestásica se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria y colestasis intrahepática gestacional.
8. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto no padece una afección colestásica asociada con una enfermedad o un afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer de hígado y biliar primario, cáncer metastásico, septicemia, nutrición parenteral total crónica, fibrosis quística y enfermedad hepática granulomatosa.

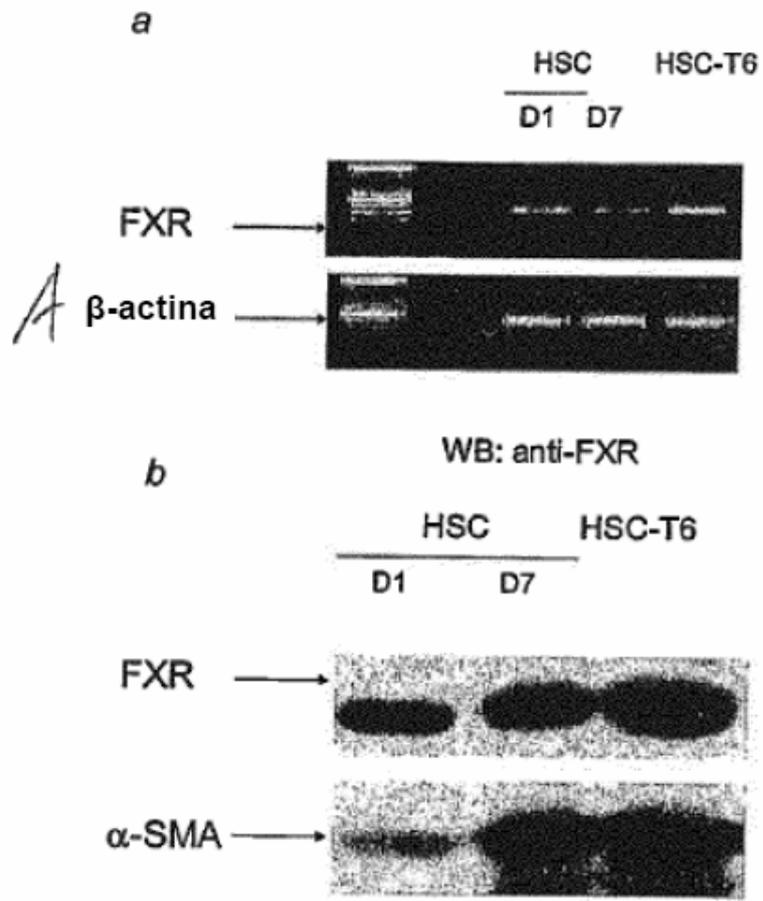


Figura 1

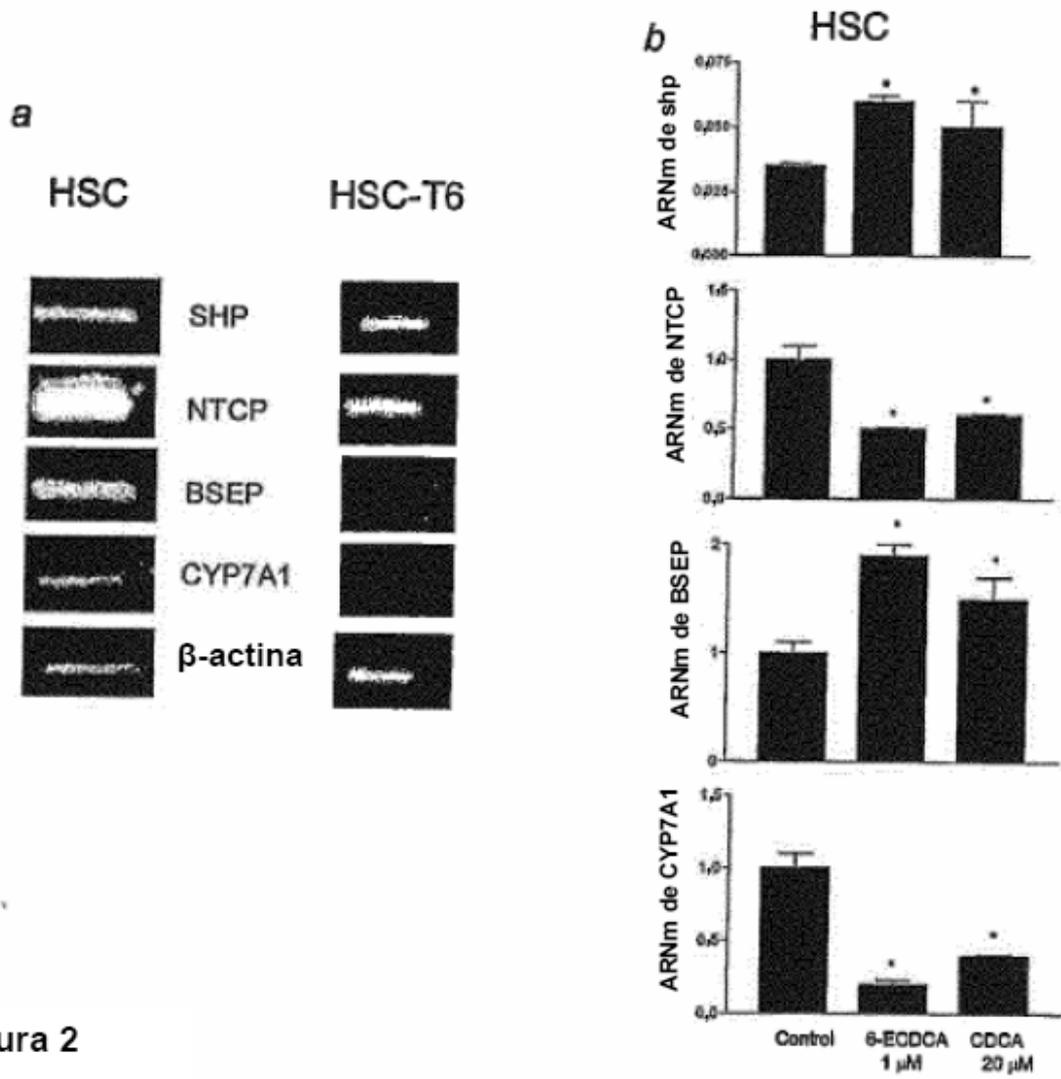


Figura 2

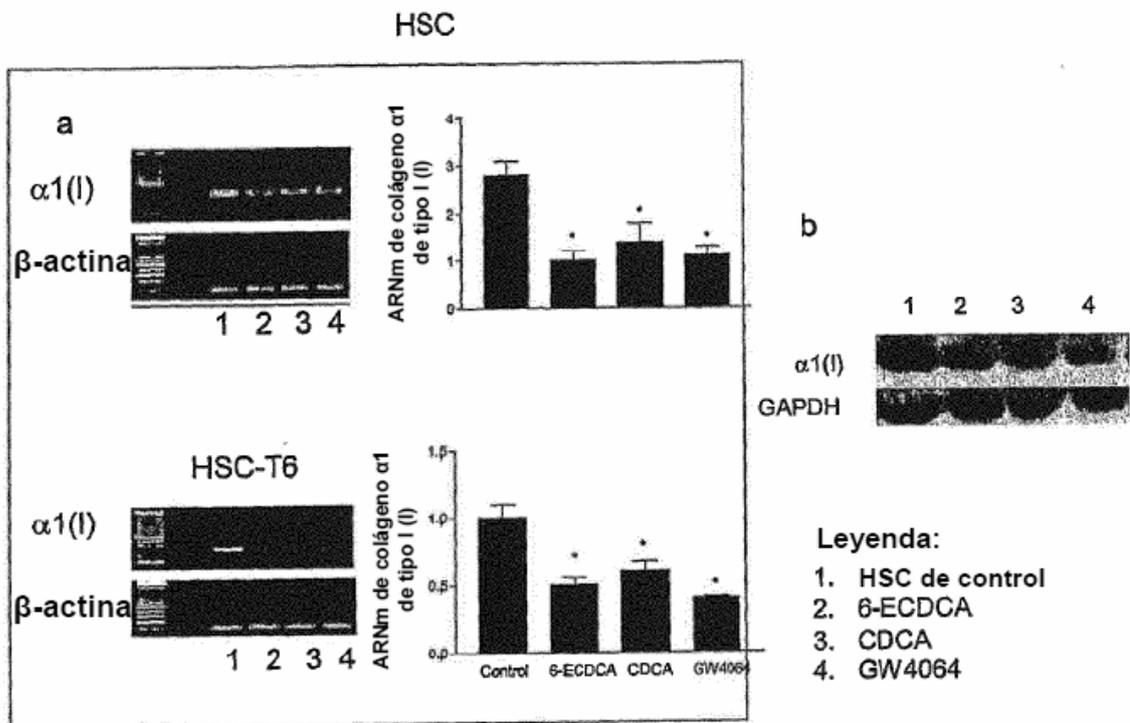


Figura 3

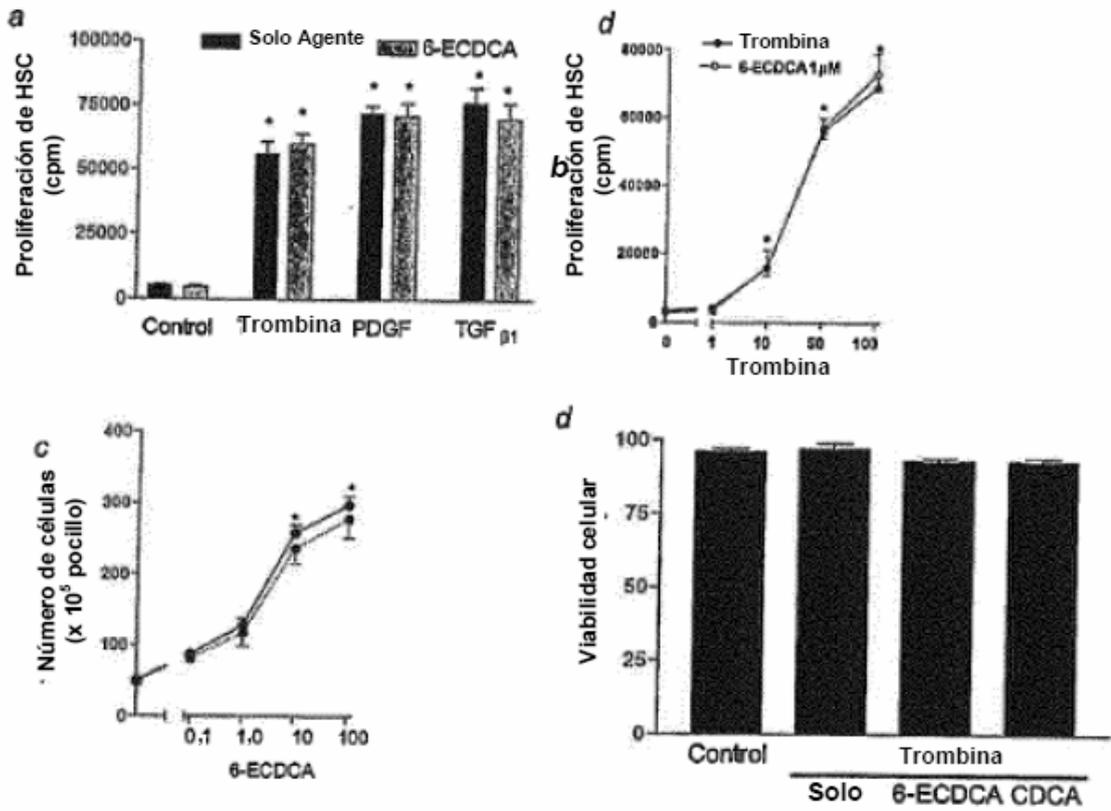


Figura 4

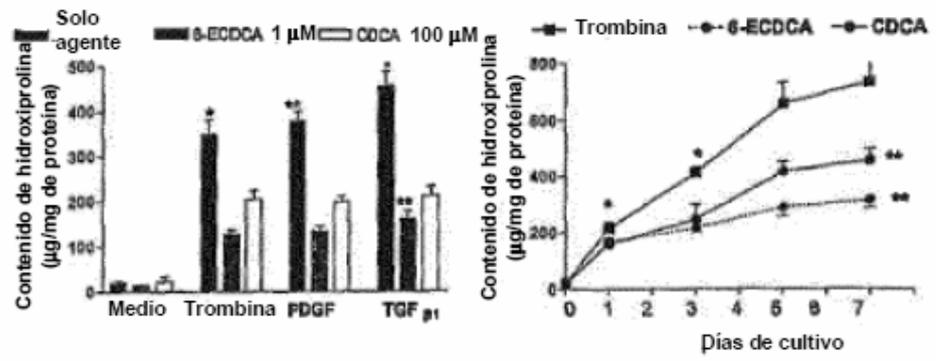


Figura 5

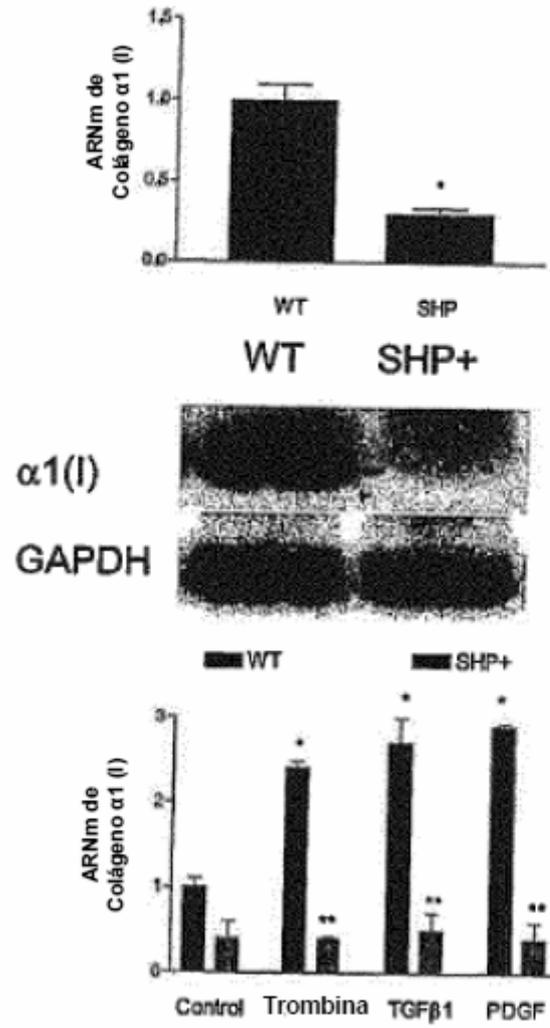
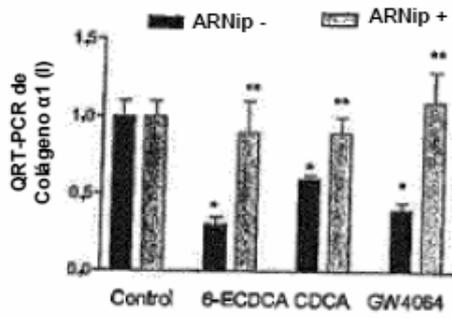


Figura 6

Silenciamiento de SHP por el ARNip



Leyenda:

1. Control
2. Trombina
3. TGF β 1
4. ARNip solo
5. ARNip + trombina
6. ARNip + TGF TGF β 1

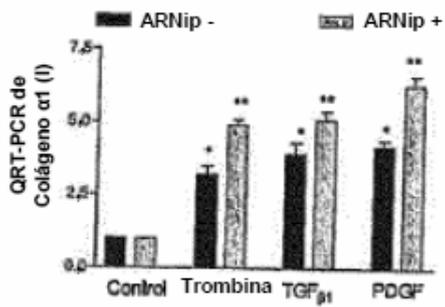


Figura 7

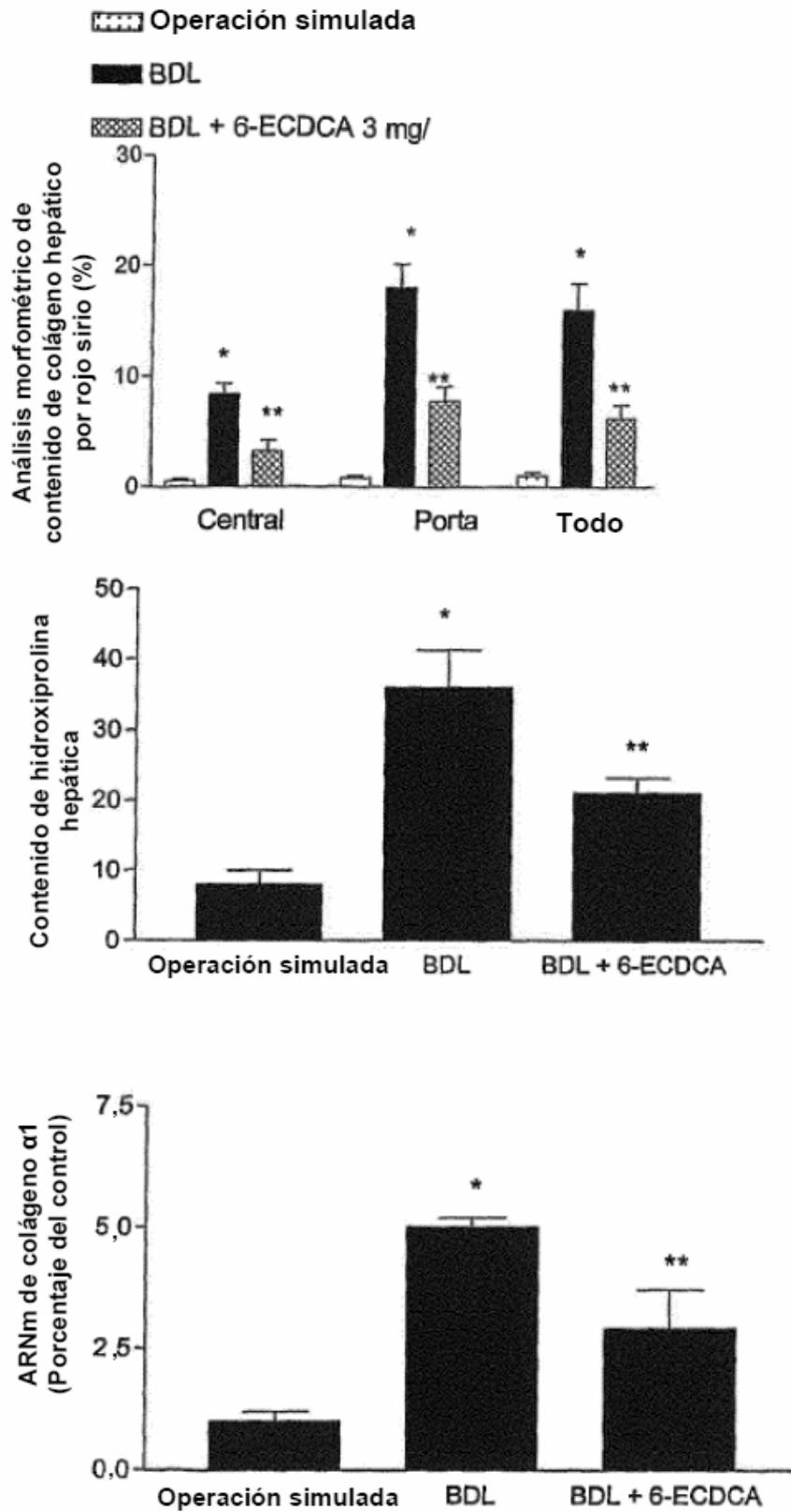


Figura 8