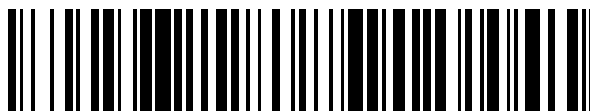


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 101**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2009 PCT/JP2009/063675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11013247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2009 E 09847838 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2460403**

54 Título: **Ratón modelo de esteatohepatitis-cáncer de hígado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2020

73 Titular/es:
SMC GLOBAL ASSET, INC. (100.0%)
2-16-1 Minami-kamata, Ota-ku
Tokyo 144-0035, JP

72 Inventor/es:
YONEYAMA, HIROYUKI y
FUJII, MASATO

74 Agente/Representante:
MILTENYI , Peter

ES 2 738 101 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

Ratón modelo de esteatohepatitis-cáncer de hígado

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un ratón modelo de esteatohepatitis/cáncer de hígado, y a usos del mismo.

Técnica antecedente

10

Anteriormente, se creía que la estosis hepática (enfermedad de hígado graso) no alcohólica, era una enfermedad benigna que no progresaba. Sin embargo, se reveló que, incluso los no bebedores, desarrollaban una inflamación similar a la de la hepatitis alcohólica y que mostraban una histología de tipo fibrosis hepática, y actualmente la estosis hepática no alcohólica se conoce como una enfermedad con mal pronóstico. En particular, los síndromes metabólicos debidos a obesidad, diabetes, o similar, han sido foco de atención en los últimos años. El hecho de que la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) sea uno de dichos síndromes, se está convirtiendo en una opinión generalizada. Sin embargo, el mecanismo es incierto, y no se han establecido métodos y/o agentes eficaces para tratar la EHNA. Esto se debe, en parte, a que la EHNA se produce por enfermedades relacionadas con el estilo de vida de los seres humanos y, por tanto, no se han establecido animales experimentales apropiados.

20

Para el desarrollo de métodos y agentes eficaces para el tratamiento de la EHNA, es esencial aclarar el estado patológico de la misma, que progresa hacia enfermedades letales, tales como la cirrosis hepática y el cáncer de hígado. Sin embargo, los animales experimentales que se utilizan actualmente en la investigación, tal como el ratón modelo de EHNA, incluyen ratones con un solo gen modificado, tales como los ratones que carecen del receptor de leptina (documento no de patente 1), ratones que carecen de Pten (fosfatidil inositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) específica de hepatocitos (documento no de patente 2), y ratones transgénicos dominantes-negativos del receptor del ácido retinoico α (documento no de patente 3), y ratones inducidos con una dieta especial, tal como una dieta carente de metionina/colina (documento no de patente 4). Sin embargo, la patogenia humana difiere de la de los ratones modificados genéticamente en los que una mutación de un solo gen es responsable del desarrollo y de la progresión del estado patológico, y es poco probable que se deba únicamente a la ingesta de un nutriente en particular. Asimismo, la resistencia a la insulina y la fibrosis hepática no pueden controlarse simultáneamente en estos ratones. Asimismo, el índice de ALT (alanina transaminasa), un índice de análisis serobioquímico, está solo ligeramente elevado en los ratones que desarrollan fibrosis y, por lo tanto, se requieren varios cortes tisulares de ratón para evaluar su estado patológico. Por el contrario, se supone que el estado patológico es diferente al del ser humano porque la ALT se eleva a un nivel notablemente alto. Asimismo, el estado patológico se recupera espontáneamente después del tratamiento. Esto hace que sea difícil someter a ensayo los fármacos y evaluar su eficacia. Por tanto, para el desarrollo de métodos y agentes para el tratamiento de la EHNA, es deseable establecer un modelo animal experimental que sea compatible con la afección clínica humana.

40

Aunque se han realizado diversos estudios, no hay animales experimentales que muestren estados patológicos similares a los de los seres humanos. Por tanto, en las circunstancias actuales, es difícil realizar una exploración con detalle para aclarar la patogenia o establecer métodos terapéuticos.

[Documentos de la técnica anterior]

45

[Documento no de patente 1] Sahai A *et al*, Am J Physiol Gastroentest Liver Physiol 287: G1035, 2004

[Documento no de patente 2] Horie Y *et al.*, J Clin Invest 113: 1774, 2004

50

[Documento no de patente 3] Yanagitani A *et al.*, Hepatology 40, 366, 2004

[Documento no de patente 4] Rinella M *et al.*, Journal of Hepatology 40: 47, 2004

Sumario de la invención

55

[Problemas a resolver por la invención]

60

Un objetivo de la presente invención es proporcionar ratones modelo de esteatohepatitis y ratones modelo de cáncer de hígado que muestren hallazgos patológicos similares a los de los seres humanos, y usos de los mismos. Más específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar técnicas para producir ratones modelo que desarrollen hígado graso, esteatohepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática y cáncer de hígado por resistencia a la insulina.

[Medios para resolver los problemas]

65

Los presentes inventores realizaron estudios específicos para lograr los objetivos descritos anteriormente. Los

presentes inventores indujeron la resistencia a la insulina administrando un agente para inducir la inflamación de los órganos, e indujeron el hígado graso en los ratones alimentándolos con una dieta alta en grasas. Como resultado, los presentes inventores desarrollaron satisfactoriamente la esteatohepatitis en ratones. Una observación detallada de los ratones reveló los siguientes hallazgos patológicos:

- 5 (1) deposición de grasa macrovesicular en células hepáticas y balonización de células hepáticas;
- (2) infiltración de células inflamatorias; y
- (3) fibrosis, principalmente alrededor de la vena central.

Los hallazgos patológicos descritos anteriormente son característicos de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) humana. Específicamente, utilizando el método descrito anteriormente, los presentes inventores produjeron, por primera vez y con éxito, ratones que mostraban hallazgos patológicos similares a los de la EHNA humana.

El modelo de ratón de EHNA producido por los presentes inventores, es diferente al de los modelos animales convencionales en los siguientes puntos:

- 15 (1) de manera similar a lo observado en los hallazgos histopatológicos de seres humanos, la degeneración de grasa y la fibrosis de las células hepáticas progresan principalmente alrededor de la vena central en lugar de la vena porta; y
- (2) las imágenes histopatológicas de EHNA humana, se observan con un aspecto "quemado", en las que solo se observa fibrosis hepática, aunque a medida que progresa el estado patológico, se observa deposición de grasa y
- 20 pérdida de células inflamatorias.

El modelo de ratón de la presente invención es característico ya que se produce sin modificación genética. Asimismo, los ratones modelo de la presente invención, desarrollan infaliblemente (100 %) un estado patológico similar al de la progresión y pronóstico de la EHNA humana a un curso constante, y son los primeros ratones modelo que muestran el mismo curso de progresión de estado patológico en seres humanos. Además, los ratones modelo de la presente invención tienen un efecto notablemente beneficioso ya que la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática, la esteatohepatitis, la fibrosis hepática y la cirrosis hepática, pueden observarse, todas ellas, al mismo tiempo.

Por otra parte, los presentes inventores descubrieron recientemente que los ratones modelo de EHNA descritos anteriormente, desarrollaban cáncer de hígado después de cirrosis hepática mientras continuaban criando. Este es el mismo cambio de estado patológico que el observado en seres humanos. Por tanto, los animales preparados por los métodos de la presente invención son muy útiles como ratones modelo de cáncer de hígado humano.

El cáncer de hígado humano produce abultamiento de la superficie del hígado. Sin embargo, animales modelo convencionales para el cáncer de hígado, que se preparan mediante la administración de una sustancia química, desarrollan cáncer de hígado que no produce abultamiento de la superficie del hígado. Por ahora, los ratones modelo de la presente invención, que se preparan sin modificación genética ni administración de fármacos, muestran abultamiento de la superficie del hígado de una manera similar al caso del cáncer de hígado humano. Por tanto, el modelo de la presente invención es un modelo mucho más cercano al cáncer de hígado humano. Asimismo, la cirrosis hepática no se desarrolla mediante la administración de sustancias químicas, mientras que los ratones modelo de la presente invención desarrollan carcinoma de células hepáticas de aspecto acordonado de tipo masivo. Asimismo, en los ratones modelo de la presente invención, se observa que la infiltración de células inflamatorias y el desarrollo de cáncer de hígado causado por cirrosis, desplaza a las células hepáticas normales. En el modelo, el origen del cáncer de hígado es la esteatosis hepática macrovesicular que muestra un estado patológico muy similar al de la EHNA humana. El cáncer de hígado se desarrolla por fibrosis hepática y cirrosis hepática. Por tanto, el modelo de ratón de la presente invención es muy útil, ya anteriormente no había informes del mismo.

Como se describe anteriormente, los presentes inventores produjeron satisfactoriamente ratones modelo de esteatohepatitis y cáncer de hígado que mostraban hallazgos patológicos similares a los de los seres humanos, y así completaron la presente invención. Utilizando estos ratones modelo, es posible explorar, de manera eficaz, sustancias para tratar o prevenir enfermedades y evaluar, de manera eficaz, la eficacia de sustancias medicinales.

La presente invención se refiere a ratones modelo que se desarrollan esteatosis hepática, esteatohepatitis, fibrosis hepática, cirrosis y cáncer de hígado por resistencia a la insulina, y más específicamente, la presente invención proporciona:

1. Un método para producir un modelo de ratón, que comprende las etapas de:

- 60 (a) administrar a un ratón un inhibidor de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa para inducir resistencia a la insulina; y
- (b) criar el ratón con una dieta alta en grasas para inducir posteriormente esteatosis hepática, esteatohepatitis, fibrosis hepática y cirrosis hepática.

65 2. El método del punto 1, que adicionalmente comprende las etapas de:

- (c) criar adicionalmente el ratón con una dieta alta en grasas para inducir cáncer de hígado.
3. Un modelo de ratón, que se produce mediante el método del punto 1 o 2.
- 5 4. El modelo de ratón del punto 3, que se caracteriza estructuralmente por la siguiente morfología patológica:
- (a) carcinoma de células hepáticas de aspecto acordonado de tipo masivo;
- (b) infiltración de células inflamatorias; o
- 10 (c) cáncer de hígado producido por cirrosis, desarrollado de tal manera que desplaza a las células hepáticas normales.
5. Un método de detección de una sustancia para tratar o prevenir la esteatohepatitis no alcohólica o el cáncer de
- 15 hígado, que comprende las etapas de:
- (a) administrar una sustancia de ensayo al modelo de ratón del punto 3 o 4; y
- (b) evaluar un efecto terapéutico sobre la esteatohepatitis no alcohólica o el cáncer de hígado.
- 20 6. Un método para evaluar la eficacia de una sustancia medicinal frente al tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica o del cáncer de hígado, que comprende las etapas de:
- (a) administrar una sustancia medicinal de ensayo al modelo de ratón del punto 3 o 4; y
- 25 (b) evaluar un efecto terapéutico sobre la esteatohepatitis no alcohólica o el cáncer de hígado.
7. El uso del modelo de ratón del punto 3 o 4 como un modelo de esteatohepatitis no alcohólica o de cáncer de
- 30 hígado.

Además, en el presente documento se desvela:

- [1] Un modelo animal no humano de esteatohepatitis producido mediante la administración de un agente para inducir la inflamación de órganos;
- 35 [2] El animal no humano de [1], en el que la esteatohepatitis es una esteatohepatitis no alcohólica;
- [3] un modelo animal no humano de diabetes producido mediante la administración de un agente para inducir la inflamación de órganos;
- [4] el animal no humano de uno cualquiera de [1] a [3], en el que el agente para inducir la inflamación de órganos es un inhibidor de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa;
- 40 [5] el animal no humano de uno cualquiera de [1] a [4], que comprende la etapa de inducir esteatosis hepática, mediante la administración de un agente para inducir, en el animal, la inflamación de órganos, y criar el animal con una dieta alta en grasas;
- [6] el animal no humano de uno cualquiera de [1] a [5], en el que el mamífero no humano es un ratón;
- [7] un método para producir un modelo animal no humano de esteatohepatitis, que comprende la etapa de inducir
- 45 inflamación en un órgano del animal no humano;
- [8] un método de detección de una sustancia para tratar o prevenir la esteatohepatitis, que comprende las etapas de:
- (a) administrar una sustancia de ensayo al modelo animal no humano de esteatohepatitis de [1]; y
- (b) evaluar un efecto de mejora sobre la esteatohepatitis;
- [9] un método para evaluar la eficacia de una sustancia medicinal frente a la mejora en la esteatohepatitis, que
- 50 comprende las etapas de:
- (a) administrar una sustancia medicinal de ensayo al modelo animal no humano de esteatohepatitis de [1]; y
- (b) evaluar un efecto de mejora sobre la esteatohepatitis;
- [10] un método de detección de una sustancia para tratar o prevenir un trastorno diabético, que comprende las etapas de:
- 55 (a) administrar una sustancia de ensayo al modelo animal no humano de un trastorno diabético de [3]; y
- (b) evaluar un efecto de mejora sobre el trastorno diabético;
- [11] un método para evaluar los riesgos de que se produzcan efectos secundarios de un agente farmacéutico para tratar o prevenir un trastorno diabético, que comprende las etapas de:
- (a) administrar un agente farmacéutico de ensayo al modelo animal no humano de un trastorno diabético de [3]; y
- 60 (b) evaluar los riesgos de que se produzcan efectos secundarios del agente farmacéutico para tratar o prevenir un trastorno diabético;
- [12] un modelo animal no humano de cáncer de hígado, que se produce criando adicionalmente el animal no humano de uno cualquiera de [1] a [6];
- [13] el animal no humano de [12], que se caracteriza estructuralmente por la siguiente morfología patológica:
- 65 (a) carcinoma de células hepáticas de aspecto acordonado de tipo masivo;
- (b) infiltración de células inflamatorias; o

(c) cáncer de hígado producido por cirrosis, desarrollado de tal manera que desplaza a las células hepáticas normales;

[14] un método de detección de una sustancia para tratar o prevenir el cáncer de hígado, que comprende las etapas de:

5 (a) administrar una sustancia de ensayo al modelo animal no humano para el cáncer de hígado de [12] o [13]; y

(b) evaluar un efecto terapéutico sobre el cáncer de hígado; y

[15] un método para evaluar la eficacia de una sustancia medicinal frente al tratamiento del cáncer de hígado, que comprende las etapas de:

(a) administrar una sustancia medicinal de ensayo al modelo animal no humano de cáncer de hígado de [12] o [13]; y

10 (b) evaluar un efecto terapéutico sobre el cáncer de hígado.

[Efectos de la invención]

15 Para producir animales experimentales que desarrollen estados patológicos similares a los de los seres humanos, se indujo resistencia a la insulina en ratones, y la esteatosis hepática se indujo alimentándolos con una dieta alta en grasas.

Se sacrificaron ratones de diferentes edades y cada órgano, principalmente el hígado, se analizó histopatológicamente (tinción con HE, tinción de grasa, inmunotinción para macrófagos y fibroblastos). La Puntuación de Actividad de NAFLD (ENA; referencia: "Kleiner DE *et al.*, *Hepatology*. Junio de 2005; 41(6): 1313-21 "), se calculó para evaluar con detalle las características patológicas. La EHNA de los animales modelo de la presente invención, también puede evaluarse utilizando la misma Puntuación de Actividad de NAFLD que la de los de seres humanos. Por tanto, los animales modelo de la presente invención son muy útiles como animales modelo de EHNA.

25 Asimismo, utilizando el sistema FUJIFILM DRI-CHEM, se realizaron pruebas serobioquímicas. El análisis de expresión de genes se realizó utilizando PCR con transcriptasa inversa en tiempo real (Takara).

Como se describe anteriormente, los presentes inventores produjeron satisfactoriamente animales modelo de esteatohepatitis (por ejemplo, animales modelo de EHNA) y animales modelo de cáncer de hígado que mostraban hallazgos patológicos similares a los de los seres humanos.

La presente invención proporciona técnicas sencillas para producir, de manera estable, animales que desarrollen, en un estadio temprano, un estado patológico similar al de la EHNA humana, que conduce a esteatosis hepática, esteatohepatitis, fibrosis hepática y cirrosis hepática, seguido del desarrollo espontáneo de cáncer de hígado como resultado de la progresión del estado patológico, induciendo resistencia a la insulina en animales experimentales, tales como ratones, y abasteciéndolos con una dieta alta en grasas.

Asimismo, en los animales pueden observarse simultáneamente trastornos diabéticos (nefritis diabética, retinopatía, hiperlipidemia y arteriosclerosis). Por tanto, la presente invención también proporciona técnicas para producir animales experimentales que permitan observar al mismo tiempo los estados patológicos del síndrome metabólico.

Por ahora, en ratones ob/ob y en ratones db/db, que se utilizan habitualmente como un modelo de EHNA, el estado patológico no se desarrolla de manera uniforme con el envejecimiento. Para evaluar con precisión el estado de la enfermedad de EHNA, es necesario controlar el estado patológico de los ratones, lo que hace que los experimentos sean engorrosos y complicados. Asimismo, las lesiones patológicas no siempre son irreversibles. Esto ha dificultado la evaluación de la eficacia (Horie Y *et al.* *J clin Invest* 113: 1774-1783, 2004; Yanagitani A *et al.*, *Hepatology* 40: 366-375, 2004; Anstee QM *et al.*, *Int J Exp Path* 87: 1-16, 2006). Por ahora, en los animales modelo de la presente invención, el período que conduce al estado patológico maduro es constante y su progresión es irreversible. Por tanto, los ratones modelo de la presente invención pueden utilizarse para resolver los problemas descritos anteriormente.

Los ratones modelo de la presente invención pueden utilizarse en ensayos preclínicos para investigar diversos agentes terapéuticos, y son muy útiles en el desarrollo de agentes y en la búsqueda de dianas terapéuticas.

55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un resultado de un ensayo serobioquímico en los ratones de la presente invención.

La figura 2 muestra fotografías de un resultado de tinción de grasa del hígado de un ratón de la presente invención.

La figura 3 muestra fotografías de un resultado de inmunotinción de hígado de un ratón de la presente invención.

60 La figura 4 muestra fotografías de un resultado de tinción con HE del hígado de un ratón de 20 semanas de vida de la presente invención.

La figura 5 muestra fotografías de un resultado de tinción con HE del hígado de ratones C57BL/6J y un gráfico de Puntuación de Actividad de NAFLD.

65 La figura 6 muestra fotografías de un resultado de inmunotinción con F4/80 de páncreas y tejido adiposo de ratones C57BL/6J.

La figura 7 muestra fotografías de un resultado de inmunotinción con F4/80 y ER-TR7 de ratones BALB/c y C3H/HeN

de 8 semanas de vida.

La figura 8 muestra fotografías de cáncer de hígado en ratones C3H/HeN de 20 semanas de vida.

La figura 9 muestra fotografías de resultados reproducibles de ratones modelo de EHNA criados con otras dietas hiperlipídicas.

5 La figura 10 muestra fotografías y gráficos de resultados de ensayos farmacológicos utilizado los ratones modelo de EHNA. 1 muestra fotografías del resultado de análisis histológicos. 2 muestra fotografías del resultado de análisis de expresión de genes.

La figura 11 muestra fotografías de la aparición de complicaciones diabéticas. 1 muestra fotografías de nefropatía diabética, mientras que 2 muestra fotografías de retinopatía diabética (imágenes de inmunotinción de nuevos vasos

10 sanguíneos; CD31).

Modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a ratones modelo de esteatohepatitis producidos mediante la inducción de
15 resistencia a la insulina.

En una realización preferida, la presente invención proporciona ratones modelo de esteatohepatitis (en este documento a veces denominados "animales modelo de la presente invención") preparados mediante la
20 administración de agentes para inducir la inflamación de órganos.

Los ratones modelo de la presente invención se preparan administrando, a animales experimentales, agentes para inducir la inflamación de órganos y después alimentándolos preferentemente con una dieta alta en grasas.

Adicionalmente, en el presente documento se desvelan animales no humanos, preferentemente vertebrados no
25 humanos, más preferentemente mamíferos no humanos, y aún más preferentemente roedores. Como ejemplos de animales que pueden utilizarse para preparar animales modelo se incluyen ratones, ratas, conejos, perros, pollos y monos (a estos animales a veces también se les conoce simplemente como "animales experimentales").

El acervo genético de los animales que se utilizarán para producir animales modelo no está particularmente limitado;
30 y es posible utilizar animales con cualquier origen genético. En general, preferentemente pueden utilizarse animales de tipo silvestre.

En la presente invención, los agentes para inducir la inflamación de órganos (en el presente documento a veces también denominados simplemente "agentes") no están particularmente limitados, siempre y cuando tengan una
35 actividad para inducir directa o indirectamente inflamación en diversos órganos. Los órganos para inducir inflamación incluyen, por ejemplo, páncreas, tejidos adiposos y tejidos musculares. Los agentes para inducir inflamación de órganos también incluyen agentes que inducen directa o indirectamente inflamación en tejidos periféricos.

Los agentes para inducir inflamación de órganos incluyen preferentemente inhibidores de la N-acetil-β-D-
40 glucosaminidasa.

En una realización preferida, los ratones modelo de la presente invención se producen administrando inhibidores de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa a los ratones experimentales descritos anteriormente. Dichos inhibidores incluyen,
45 por ejemplo, estreptozotocina y Pugnac.

Como alternativa, los ácidos nucleicos que tienen una actividad de inhibición de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa, también pueden utilizarse como un agente de la presente invención. Específicamente, dichos ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, los ARNi que suprimen la expresión del gen de la O-GlcNAcasa (GenBank n.º de registro
50 NM_023799.3), los antisentido del gen y las ribozimas que se dirigen al gen.

En la producción de los ratones modelo de la presente invención, la forma de dosificación de los agentes para inducir la inflamación de órganos no está particularmente limitada. Por ejemplo, la forma de dosificación incluye, por ejemplo, administración subcutánea (inyección subcutánea, etc.), administración intravenosa, administración oral y administración intraperitoneal.
55

La dosis del agente a administrar no está limitada, y es típicamente de 50 a 500 µg, preferentemente de 100 a 300 µg, y más preferentemente de 200 µg cuando el agente es estreptozotocina.

El momento para administrar el agente es el siguiente. Habitualmente, el agente se administra de uno a cinco días después del nacimiento (período neonatal, preferentemente de uno a cinco días de vida, y más preferentemente dos días) y preferentemente dos días después del nacimiento.
60

Como se describe anteriormente, la resistencia a la insulina puede inducirse administrando los agentes. Después de la administración de los agentes como se describe anteriormente, los animales se crían para producir animales modelo de la presente invención. En general, los animales se alimentan preferentemente con una dieta alta en grasas. Dichas dietas hiperlipídicas incluyen diversas dietas generales para animales que están disponibles en el
65

comercio.

Los ingredientes principales de las dietas hiperlipídicas descritas anteriormente incluyen, por ejemplo, grasa cruda, proteína cruda, fibra cruda, ceniza cruda, extracto sin nitrógeno y agua. Las dietas hiperlipídicas de la presente invención no están particularmente limitadas; sin embargo, el contenido de grasa cruda es del 20 % o más, y preferentemente del 30 % o más; y la proporción de las calorías procedentes de grasa con respecto a las calorías totales es habitualmente del 50 % o más, y preferentemente del 60 % o más. Como ingredientes que se incluyen en la formulación de las dietas hiperlipídicas se incluyen, por ejemplo, sebo de vacuno en polvo, caseína láctea, clara de huevo en polvo, L-cistina, aceite de cártamo, celulosa cristalina, maltodextrina, lactosa y sacarosa. Estas sustancias se muestran como un ejemplo de los ingredientes de las dietas hiperlipídicas, y no están necesariamente contenidas en las dietas.

Las dietas hiperlipídicas descritas anteriormente incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, aquellas que tienen un mayor contenido de grasa cruda (por ejemplo, mayor en aproximadamente un 30 % o más) que las dietas normales. Como ejemplos de dichas dietas hiperlipídicas se incluyen las que están disponibles en el comercio como dietas para animales de laboratorio, tales como la dieta alta en grasas High Fat Diet32 (CLEA Japón Inc.) y D12492 (Research Diets).

Por ejemplo, cuando los animales son ratones, la alimentación con la dieta alta en grasas descrita anteriormente, comienza habitualmente a las 2 a 6 semanas de vida, preferentemente a las 3 a 5 semanas, y más preferentemente a las 4 semanas de vida. Además, por ejemplo, en el caso de los ratones, la cantidad de dieta alta en grasas que se administra cada vez es de aproximadamente 3 a 6 g. En general, los ratones se alimentan preferentemente con la dieta alta en grasas durante una semana o más.

Los expertos en la técnica pueden regular (ajustar) adecuadamente la cantidad de dieta alta en grasas dependiendo del tipo, tamaño, peso, o similares, de los animales experimentales que van a utilizarse. La esteatosis hepática, puede inducirse alimentándolos con una dieta alta en grasas. Por tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona ratones modelo de esteatohepatitis, que comprende la etapa de inducir esteatosis hepática, administrando a los animales agentes para inducir la inflamación de órganos y alimentándolos con una dieta alta en grasas.

Los animales producidos por el método descrito anteriormente desarrollan síntomas de esteatohepatitis y son útiles como ratones modelo de esteatohepatitis. Los ratones modelo de la presente invención tienen la característica de desarrollar simultáneamente estados patológicos que se observan en animales preparados por los métodos de la presente invención. Se prefiere que los ratones modelo desarrollen simultáneamente resistencia a la insulina y/o fibrosis hepática. Sin embargo, dichos estados patológicos no se limitan a estos ejemplos.

En una realización preferida, los animales modelo de la presente invención son característicos por que los estados patológicos del síndrome metabólico, pueden observarse al mismo tiempo, ya que los trastornos diabéticos (nefritis diabética, retinopatía, hiperlipidemia y arteriosclerosis) pueden observarse simultáneamente en los animales modelo de la presente invención.

Asimismo, dado que los animales modelo de la presente invención tienen la característica de que el estado patológico no se recupera espontáneamente, los animales pueden utilizarse adecuadamente para someter a ensayo y evaluar la eficacia de fármacos.

En una realización preferida de los ratones modelo de la presente invención, la esteatohepatitis descrita anteriormente es hepatitis no alcohólica (HNA). Específicamente, la presente invención proporciona animales modelo de hepatitis no alcohólica (HNA), que se preparan administrando agentes para inducir la inflamación de órganos. Los animales desarrollan regularmente, a un curso constante, estados patológicos con progresión y pronóstico similares a los de la HNA humana.

En una realización preferida, los ratones modelo de hepatitis no alcohólica de la presente invención tienen al menos uno (preferiblemente, todos) de los siguientes hallazgos patológicos:

- (1) deposición de grasa macrovesicular en células hepáticas y balonización de células hepáticas;
- (2) infiltración de células inflamatorias; y
- (3) fibrosis, principalmente alrededor de la vena central.

Por consiguiente, en una realización preferida, los ratones modelo de la presente invención se caracterizan estructuralmente por las morfologías patológicas descritas anteriormente.

A medida que la crianza continuaba, los animales modelo de esteatohepatitis descritos anteriormente desarrollaron cirrosis hepática que condujo a cáncer de hígado. Por tanto, los animales modelo de esteatohepatitis de la presente invención también son útiles, por ejemplo, como animales (materiales de partida) para producir ratones modelo de cirrosis hepática o ratones modelo de cáncer de hígado. Específicamente, la presente invención proporciona materiales para preparar ratones modelo de cirrosis hepática o de cáncer de hígado, que comprende los ratones modelo de esteatohepatitis de la presente invención.

Asimismo, en el presente documento también se desvelan métodos para producir animales modelo de la presente invención como se describe anteriormente. En una realización preferida, la presente invención proporciona métodos para producir animales modelo de esteatohepatitis, que comprenden la etapa de administrar agentes para inducir la inflamación de órganos a animales no humanos.

Asimismo, utilizando los ratones modelo de la presente invención pueden detectarse sustancias para tratar o prevenir la esteatohepatitis. Específicamente, la presente invención proporciona métodos de detección de sustancias para tratar o prevenir la esteatohepatitis, que comprende las etapas de:

- 10 (a) administrar una sustancia de ensayo a un ratón modelo de esteatohepatitis de la presente invención; y
 (b) evaluar su efecto de mejora sobre la esteatohepatitis.

Las sustancias de ensayo que se utilizarán en estos métodos no están particularmente limitadas. Por ejemplo, dichas sustancias incluyen compuestos individuales tales como compuestos naturales, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, proteínas y péptidos, así como bibliotecas de compuestos, productos de expresión de genotecas, extractos celulares, sobrenadantes de cultivos celulares, productos de microorganismos fermentadores, extractos de organismos marinos y extractos vegetales, pero no se limita a los mismos.

Los métodos para administrar sustancias de ensayo o las sustancias medicinales de la presente invención no están particularmente limitados; sin embargo, pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral o por inyección. Cuando dicha sustancia de ensayo es una proteína, por ejemplo, puede construirse un vector vírico que lleve un gen que codifique la proteína y puede introducirse en los animales modelo de la presente invención utilizando su capacidad de infección.

25 En la etapa (b), el efecto de mejora sobre la esteatohepatitis puede evaluarse determinando si la esteatohepatitis se mejora al evaluar los hallazgos patológicos de los animales modelo.

Los hallazgos patológicos de la esteatohepatitis incluyen, por ejemplo, los hallazgos patológicos descritos anteriormente (morfologías patológicas). En el presente documento, "mejora" significa que los síntomas de la esteatohepatitis se alivian o se restablecen a la normalidad. Utilizando como indicador los hallazgos patológicos descritos en el presente documento, los expertos en la técnica pueden evaluar adecuadamente si los síntomas de la esteatohepatitis mejoran en los ratones modelo.

En la presente invención, las sustancias que producen el efecto de mejora en la etapa (b) anterior, pueden seleccionarse como sustancias para tratar o prevenir la esteatohepatitis.

Asimismo, utilizando los animales modelo de la presente invención, puede evaluarse la eficacia de sustancias medicinales sobre la mejora de la esteatohepatitis. Específicamente, la presente invención proporciona métodos para evaluar la eficacia de sustancias medicinales sobre la mejora de la esteatohepatitis, que comprende las etapas de:

- 40 (a) administrar una sustancia medicinal de ensayo a un ratón modelo de esteatohepatitis de la presente invención; y
 (b) evaluar su efecto de mejora sobre la esteatohepatitis.

El tipo de sustancias medicinales que pueden evaluarse para determinar su eficacia mediante los métodos descritos anteriormente no está particularmente limitado; y dichas sustancias medicinales incluyen, por ejemplo, diversos agentes farmacéuticos conocidos (compuestos de bajo peso molecular, proteínas, ácidos nucleicos, o similares).

50 Cuando una sustancia medicinal de ensayo ejerce un efecto de mejora sobre la esteatohepatitis, se considera que la sustancia medicinal tiene un efecto terapéutico sobre la esteatohepatitis.

Asimismo, los animales modelo de la presente invención se caracterizan por mostrar trastornos diabéticos (nefritis diabética, retinopatía, o similares), que se desarrollan como una complicación de la diabetes, simultáneamente junto con esteatohepatitis. Por tanto, los ratones modelo de la presente invención son útiles como animales modelo de diabetes.

55 Específicamente, la presente invención proporciona animales no humanos modelo de diabetes preparados mediante la administración de agentes para inducir la inflamación de órganos. Utilizando los animales modelo de diabetes de la presente invención, pueden desarrollarse agentes para tratar o prevenir trastornos diabéticos (nefritis diabética, la retinopatía, o similares). Por ejemplo, pueden detectarse compuestos candidatos para tratar o prevenir trastornos diabéticos, administrando sustancias de ensayo a los ratones modelo de diabetes de la presente invención, y evaluando su efecto de mejora sobre los trastornos diabéticos.

En una realización preferida, la presente invención proporciona métodos de detección de sustancias para tratar o prevenir trastornos diabéticos, que comprende las etapas de:

- 65 (a) administrar una sustancia de ensayo a un modelo animal no humano de trastorno diabético de la presente invención; y

(b) evaluar su efecto de mejora sobre el trastorno diabético.

Muchos pacientes con EHNA también son diabéticos y se cree que desarrollan diversas complicaciones. Los animales modelo de la presente invención desarrollan complicaciones diabéticas y, por lo tanto, son muy útiles como animales modelo, porque los riesgos, tales como los efectos secundarios descubiertos en ensayos clínicos, pueden evaluarse en fases tempranas utilizando los animales modelo.

Específicamente, la presente invención proporciona métodos para evaluar los riesgos de que los agentes farmacéuticos produzcan efectos secundarios utilizando los animales modelo de diabetes de la presente invención.

10 En una realización preferida, la presente invención se refiere a métodos para evaluar el riesgo de que los agentes farmacéuticos produzcan efectos secundarios para tratar o prevenir trastornos diabéticos, que comprende las etapas de:

(a) administrar un agente farmacéutico de ensayo al modelo animal no humano de trastorno diabético de la presente invención; y

15 (b) evaluar los efectos secundarios del agente farmacéutico para tratar o prevenir el trastorno diabético.

Asimismo, los presentes inventores descubrieron, por primera vez, que a medida que continuaba la crianza, los animales modelo de esteatohepatitis de la presente invención descritos anteriormente, desarrollaban cirrosis hepática que condujo a cáncer de hígado. Por tanto, la presente invención proporciona ratones modelo de cirrosis hepática y animales modelo de cáncer de hígado, que se preparan continuando la crianza de los animales modelo de esteatohepatitis descritos anteriormente.

20 En una realización preferida, la presente invención se refiere a ratones modelo de cáncer de hígado que se preparan continuando la crianza de los animales modelo de esteatohepatitis preparados mediante la administración de agentes para inducir la inflamación de órganos.

Los ratones modelo de esteatohepatitis de la presente invención descritos anteriormente, desarrollan posteriormente cirrosis hepática. Los animales modelo de cáncer de hígado pueden producirse criando adicionalmente a los animales. En la producción de dichos ratones modelo, habitualmente el período de crianza después de haberse desarrollado la cirrosis hepática es, por ejemplo, de 2 a 20 semanas o más, y preferentemente de 10 semanas o más, cuando el animal experimental es un ratón.

30 Los animales modelo de cáncer de hígado de la presente invención se caracterizan estructuralmente, por ejemplo, por al menos una (preferentemente todas) las características seleccionadas de los siguientes hallazgos patológicos (morfologías patológicas):

(a) carcinoma de células hepáticas de aspecto acordonado de tipo masivo;

(b) infiltración de células inflamatorias; y

(c) cáncer de hígado producido por cirrosis, desarrollado de tal manera que desplaza a las células hepáticas normales.

40 Los ratones modelo de cáncer de hígado que tienen las características descritas anteriormente presentan las morfologías patológicas descritas anteriormente, y por lo tanto, son estructuralmente diferentes de los animales modelo de cáncer de hígado convencionales preparados mediante la administración de sustancias químicas (sustancias cancerígenas).

45 Las sustancias para tratar o prevenir el cáncer de hígado pueden seleccionarse utilizando los animales modelo de cáncer de hígado descritos anteriormente de la presente invención.

50 En una realización preferida, los métodos descritos anteriormente de la presente invención, incluyen métodos de detección de sustancias para tratar o prevenir el cáncer de hígado, que comprende las etapas de:

(a) administrar una sustancia de ensayo a un animal modelo de cáncer de hígado de la presente invención; y

(b) evaluar su efecto terapéutico sobre el cáncer de hígado.

55 En los métodos anteriormente descritos, el efecto terapéutico puede evaluarse adecuadamente, por ejemplo, utilizando como indicador los hallazgos patológicos de cáncer de hígado descritos anteriormente. Por ejemplo, cuando el carcinoma de células hepáticas de aspecto acordonado de tipo masivo se elimina en un animal modelo de la presente invención al que se le administra una sustancia de ensayo, se considera que la sustancia de ensayo tiene efecto terapéutico sobre el cáncer de hígado.

60 Asimismo, de acuerdo con la presente invención, la eficacia de las sustancias medicinales puede evaluarse en el tratamiento del cáncer de hígado utilizando ratones modelo de cáncer de hígado de la presente invención. En una realización preferida, los métodos incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden las etapas de:

(a) administrar una sustancia medicinal de ensayo a un modelo de ratón de cáncer de hígado de la presente invención; y

65 (b) evaluar su efecto terapéutico sobre el cáncer de hígado.

Ejemplos

A continuación, en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los Ejemplos, pero sin limitarse a los mismos.

5 [Ejemplo 1] Preparación de animales modelo de EHNA y de animales modelo de cáncer de hígado

(a) Preparación de ratones modelo de EHNA

Se criaron hembras de ratón C57BL6J/JJcl, C3H/HeNJcl y BALB/cByJJcl (CLEA Japan Inc.) y C57BL6J/NCrCrij
 10 (Charles River Japón, Inc.), que después de gestar parieron. Dos días después del nacimiento, se indujo inflamación pancreática en los ratones C57BL6J/Jcl, BALB/cByJJcl y C3H/HeNJcl (CLEA Japón Inc.) macho, con citotoxicidad específica para la N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (O-GlcNAcase) en células β pancreáticas (por ejemplo, administrando por vía subcutánea 10 mg/ml de estreptozotocina (SIGMA) a 20 μ l /cabeza). Por tanto, la resistencia a la insulina se indujo suscitando directa o indirectamente la inflamación en tejidos periféricos. Los ratones se criaron
 15 con una dieta CE-2 (CLEA Japón Inc.) y agua estéril hasta las cuatro semanas de vida y se destetaron. Después, los ratones se criaron hasta las 20 semanas de vida con agua estéril y dieta alta en grasas (CLEA Japón Inc.) o con D12492 (Research Diets), que tenía un mayor contenido de grasa cruda (o un 30 % o más) que la dieta normal.

(b) Evaluación histológica

20 Después de que los ratones de diferentes edades se mantuvieran en ayunas durante 24 horas, se sacrificaron utilizando anestesia con éter y se extrajo su sangre. Cada órgano se congeló en compuesto OCT (Sakura Fine Technical) y después se cortó en secciones para realizar el análisis patológico. Un ensayo serobioquímico mostró que todos los niveles de glucemia en ayunas, de alanina aminotransferasa (ALT) y de grasa neutra, fueron más altos
 25 en este modelo en comparación con el grupo de animales normales. Por tanto, los animales modelo desarrollaron resistencia a la insulina e hiperlipemia (Fig. 1). Histológicamente, a las cinco semanas de vida se observó esteatosis hepática grave con balonización de los hepatocitos. A las ocho semanas de vida, la grasa se eliminó casi por completo del hígado y, por lo tanto, la progresión del estado histopatológico fue muy similar a la de la EHNA humana de aspecto quemado (Fig. 2). A las seis semanas, en el hígado se observó acumulación e infiltración de células
 30 inflamatorias, incluidos macrófagos, y la fibrosis progresó alrededor de la vena central del hígado. El resultado obtenido, observando cambios adicionales con el tiempo, mostró que, a las ocho semanas, las venas centrales se conectaban a medida que progresaba la fibrosis, y a las diez semanas (Fig. 3), se observó cirrosis hepática con formación de nódulos en regeneración. Asimismo, la ENA se calculó basándose en los datos histopatológicos. El resultado mostró que, en el estadio de EHNA, la puntuación fue, en promedio, de 5. Por tanto, se demostró que el
 35 efecto farmacológico podría evaluarse controlando cambios de esta puntuación (Fig. 5).

La patogenia de la EHNA en este modelo de ratón es que la inflamación pancreática desencadena inflamación crónica en tejidos periféricos tales como hígado y tejidos adiposos; se desarrolla resistencia a la insulina; y la inflamación sistémica persistente conduce a esteatosis hepática (Fig. 6). Después, a medida que envejecían los
 40 ratones, los nódulos en regeneración se agrandaban. A las 20 semanas (Fig. 4), se observó infiltración de células inflamatorias, aumento de hepatocitos atípicos y desarrollo de cáncer, que desplazaba a las células hepáticas normales. Por otra parte, en ratones de otras líneas (Figuras 7 y 8), también pueden desarrollarse lesiones que son histológicamente compatibles con la lesión por EHNA, que conducen a cáncer de hígado. Las lesiones por EHNA eran reproducibles incluso si se cambiaba el tipo de dieta alta en grasas (Fig. 9).

45 Asimismo, como un ensayo de terapia para EHNA, durante dos semanas, al modelo de la presente invención, se le administró por vía oral un antagonista de receptores de angiotensina (ARA), que es un agente antihipertensivo. De acuerdo con un informe clínico (Georgescu EF *et al.* 15: 942), la comparación entre el grupo al que se le administró ARA y el grupo no tratado, mostró una mejoría histológica en el hígado y efectos de mejora sobre la inflamación y la fibrosis, que se detectaron mediante un ensayo genético, lo que sugiere que el resultado es muy parecido a los
 50 resultados clínicos (Fig. 10).

Asimismo, en el modelo de ratón de la presente invención, la inflamación del tejido adiposo también se induce al mismo tiempo y esto potencia la resistencia a la insulina. La hiperglucemia crónica persistente resultante causa
 55 microangiopatía y, como tal, conduce a complicaciones diabéticas (nefropatía diabética, retinopatía y neuropatía). Después, se estudiaron con detalle lesiones patológicas en otros órganos. Como resultado, a las diez semanas, se observó fibrosis glomerular e intersticial, que se caracterizaba por la acumulación de macrófagos inflamatorios y fibroblastos dentro y alrededor de los glomérulos renales, y por tanto, los animales desarrollaron nefropatía diabética (Fig. 11). Asimismo, a las 20 semanas de vida, utilizando un anticuerpo CD31, se evaluó la neovascularización en
 60 los ojos. En los ratones modelo de la presente invención, se observó hiperplasia sanguínea neovascular en la retina, lo que sugería que los ratones desarrollaban retinopatía diabética (Fig. 11).

Por tanto, la presente invención proporciona animales modelo de EHNA que desarrollan esteatosis hepática que conduce a cáncer de hígado. El uso de dichos animales modelo facilita el análisis de la patogenia y el estado
 65 patológico de la EHNA humana, y el desarrollo de técnicas y agentes para el tratamiento de la EHNA humana.

Aplicabilidad industrial

Las causas de la acumulación de grasa en el hígado incluyen el alcoholismo, la obesidad, la diabetes, las anomalías del metabolismo de los lípidos, los agentes farmacéuticos y la desnutrición grave. Sin embargo, en líneas generales, las causas se clasifican como debidas o no al alcoholismo. La esteatosis hepática alcohólica conduce a hepatitis, fibrosis hepática y cirrosis hepática. Por ahora, se ha creído que la esteatosis hepática no alcohólica es un estado patológico que no progresa. Sin embargo, a finales de los 90, a medida que aumentaba la población obesa y se conocía el concepto de la enfermedad, se reveló que la esteatosis hepática no alcohólica era una enfermedad de alta incidencia junto con la hepatitis tipo C y la hepatitis alcohólica en Europa y en los Estados Unidos. Se informó que el estado patológico progresaba a cirrosis hepática y finalmente a cáncer de hígado, lo que generó interés por la enfermedad. En Japón, la población obesa con obesidad también está aumentando constantemente debido a la baja secreción de insulina predispuesta genéticamente y a las dietas occidentalizadas y falta de actividad física. En estas circunstancias, el número de pacientes diagnosticados con EHNA está aumentando y es por ello que existe una imperiosa necesidad de desarrollar y establecer métodos y agentes para tratar dicha enfermedad.

El modelo de la presente invención es muy similar al estado patológico de la EHNA humana en cuanto a progresión de la enfermedad, y puede utilizarse para determinar el estadio para analizar las fases de la resistencia a la insulina, esteatosis hepática, esteatohepatitis, fibrosis hepática y cirrosis hepática, dependiendo del sujeto que vaya a tratarse. Asimismo, buscando factores patógenos implicados en la progresión de cada fase, la presente invención también puede contribuir al desarrollo de métodos o agentes completamente nuevos para el tratamiento de la EHNA humana, fibrosis hepática y cirrosis hepática, así como biomarcadores para las enfermedades. Además, la presente invención es aplicable para evaluar la farmacocinética en lesiones por EHNA. Por otra parte, el modelo de la presente invención finalmente conduce a cáncer de hígado. Por tanto, la presente invención permite la detección de agentes supresores del cáncer o similares, la investigación del mecanismo de aparición del cáncer de hígado y de productos farmacéuticos que se dirijan a moléculas en el desarrollo del cáncer de hígado.

Además de las enfermedades descritas anteriormente, también pueden analizarse al mismo tiempo trastornos diabéticos. Por tanto, se espera que la presente invención contribuya en gran medida a desarrollar métodos y agentes para enfermedades hepáticas, a aclarar las relaciones entre los estados patológicos sistémicos en un animal sujeto, así como a desarrollar métodos/agentes terapéuticos y biomarcadores.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un modelo de ratón, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) administrar a un ratón un inhibidor de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa para inducir resistencia a la insulina; y
 - (b) criar el ratón con una dieta alta en grasas para inducir posteriormente hígado graso, esteatohepatitis, esteatohepatitis, fibrosis hepática y cirrosis hepática.
2. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende las etapas de:
 - 10 (c) criar adicionalmente el ratón con una dieta alta en grasas para inducir cáncer de hígado.
3. Un modelo de ratón, que se produce por el método de la reivindicación 1 o 2.
- 15 4. El modelo de ratón de la reivindicación 3, que se caracteriza estructuralmente por la siguiente morfología patológica:
 - (a) carcinoma de células hepáticas de aspecto acordonado de tipo masivo;
 - (b) infiltración de células inflamatorias; o
 - 20 (c) cáncer de hígado producido por cirrosis, desarrollado de tal manera que desplaza a las células hepáticas normales.
5. Un método de cribado de una sustancia para tratar o prevenir la esteatohepatitis no alcohólica o el cáncer de hígado, que comprende las etapas de:
 - 25 (a) administrar una sustancia de ensayo al modelo de ratón de la reivindicación 3 o 4; y
 - (b) evaluar un efecto terapéutico sobre la esteatohepatitis no alcohólica o el cáncer de hígado.
6. Un método para evaluar la eficacia de una sustancia medicinal frente al tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica o del cáncer de hígado, que comprende las etapas de:
 - 30 (a) administrar una sustancia medicinal de ensayo al modelo de ratón de la reivindicación 3 o 4; y
 - (b) evaluar un efecto terapéutico sobre la esteatohepatitis no alcohólica o el cáncer de hígado.
- 35 7. El uso del modelo de ratón de la reivindicación 3 o 4 como modelo de esteatohepatitis no alcohólica o de cáncer de hígado.

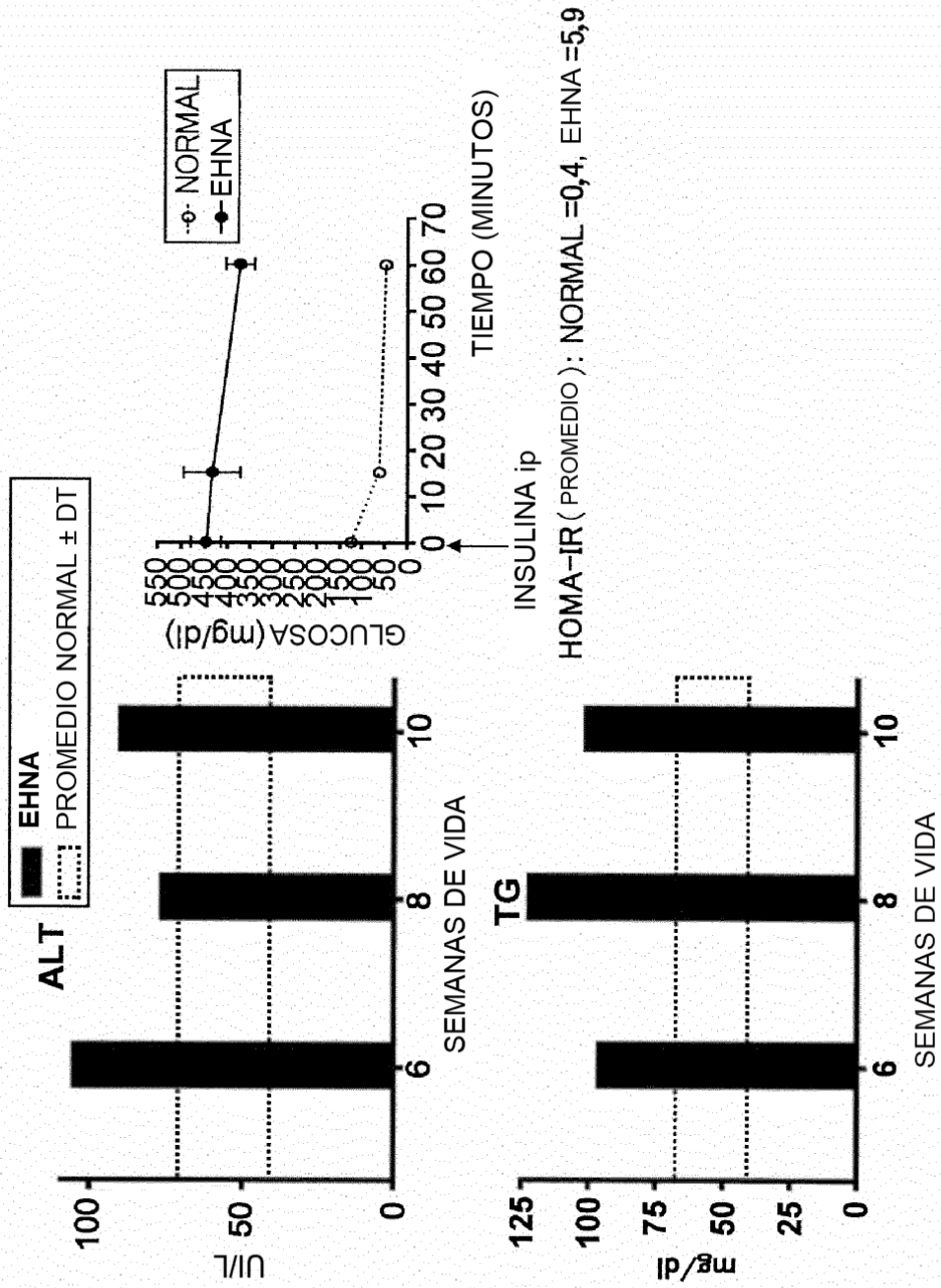


FIG. 1

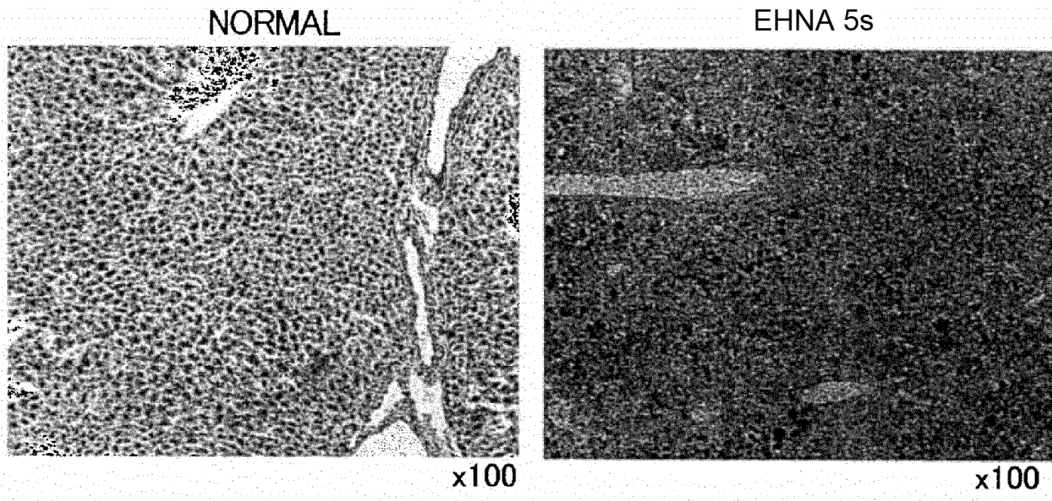


FIG. 2

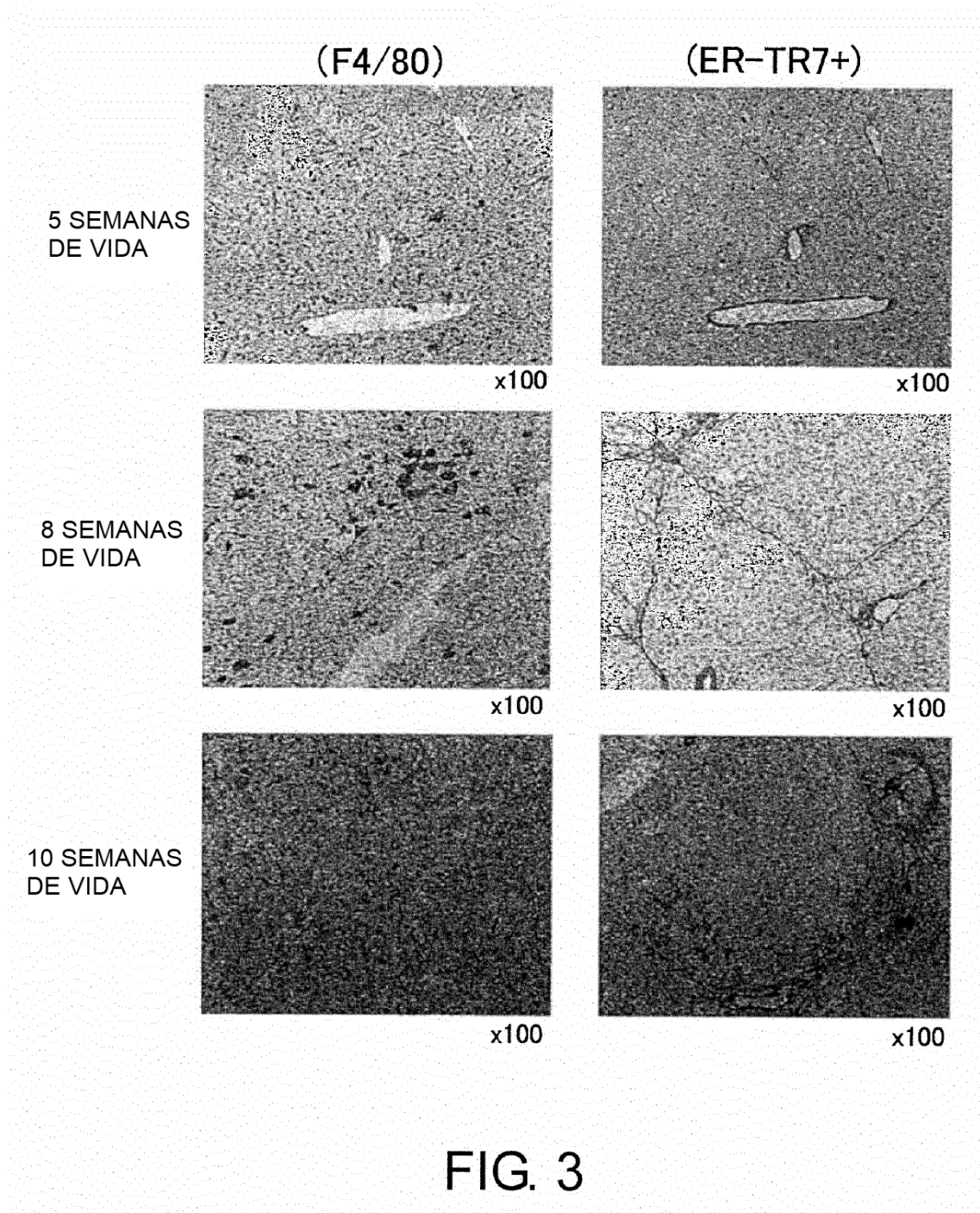


FIG. 3

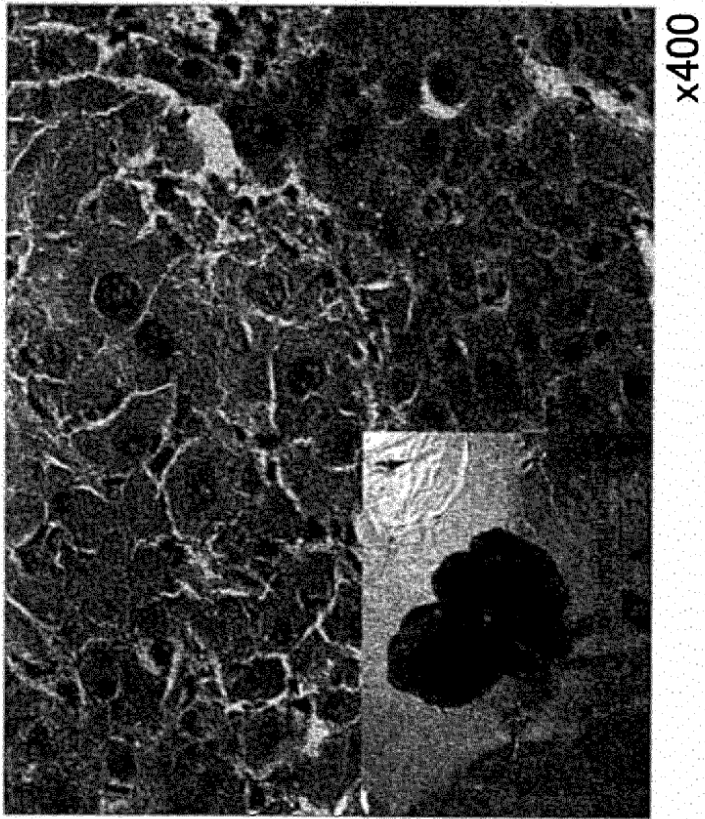
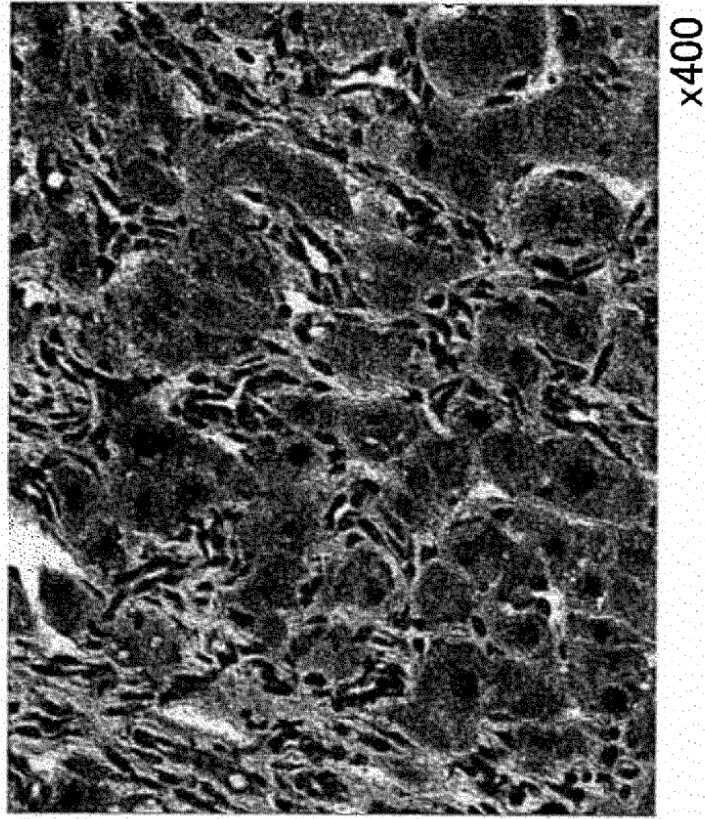


FIG. 4

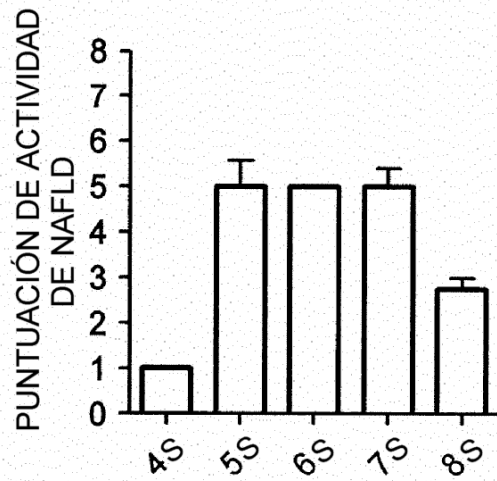
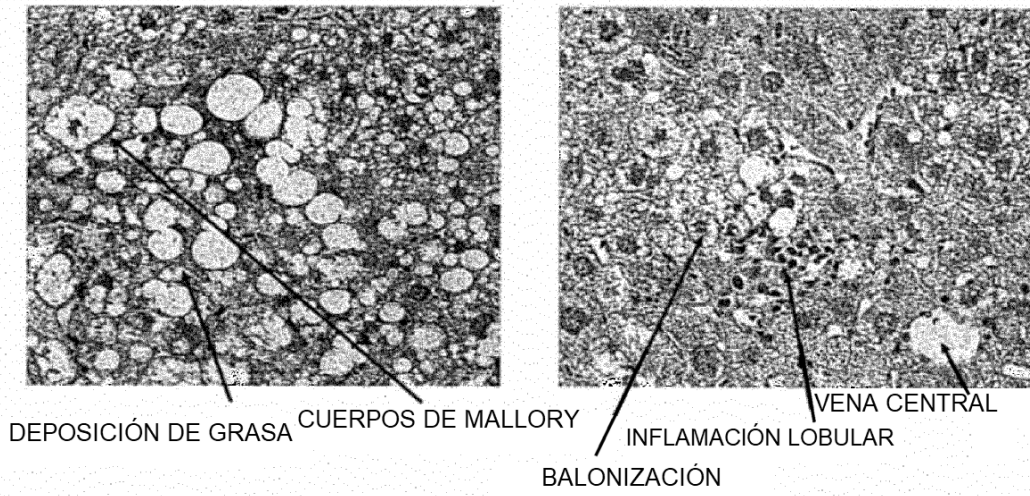
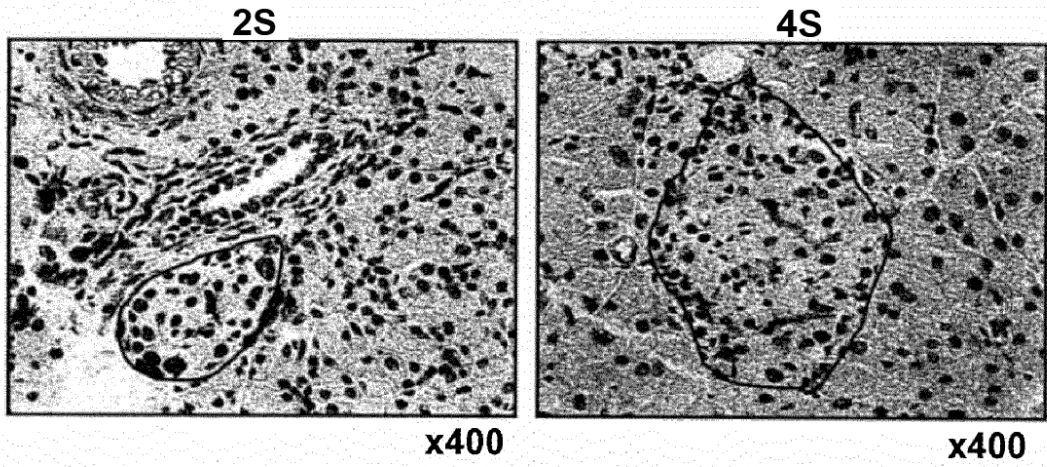


FIG. 5

1. PANCREAS



2. TEJIDO ADIPOSO

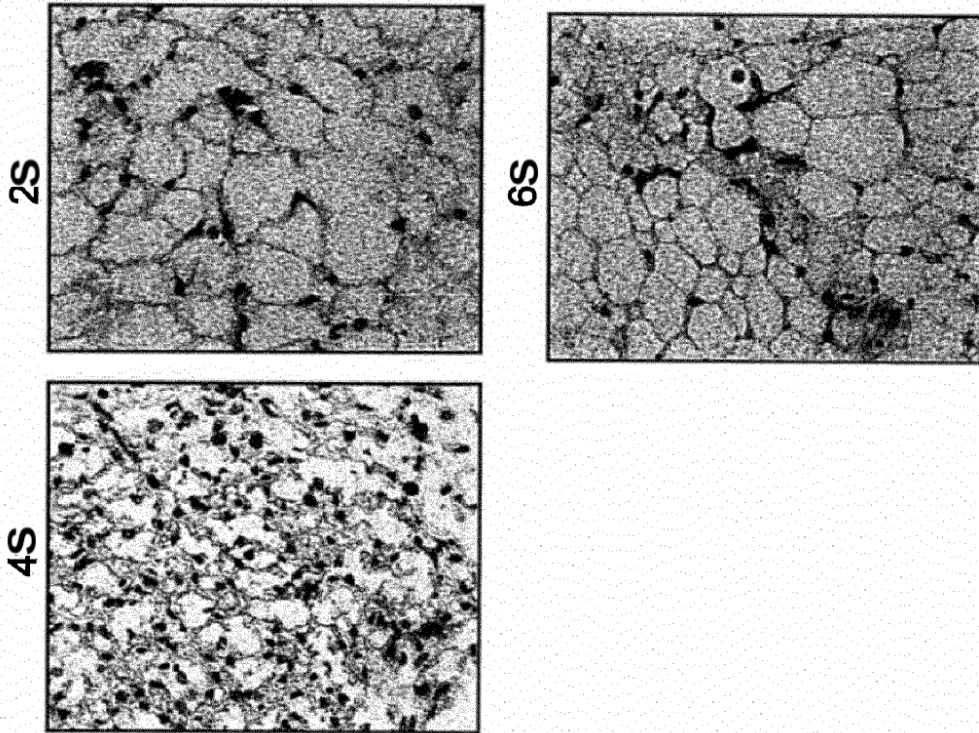
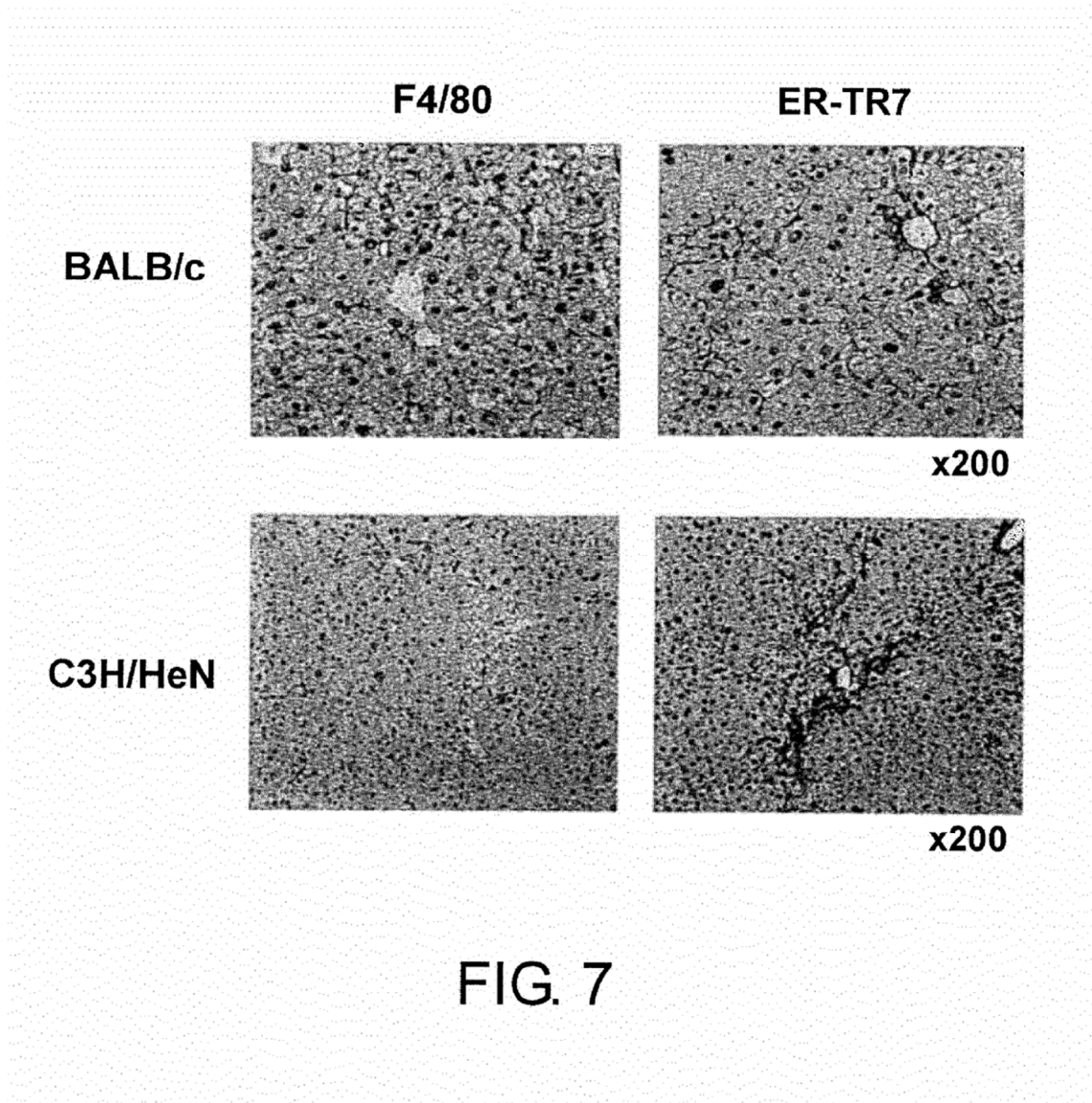


FIG. 6



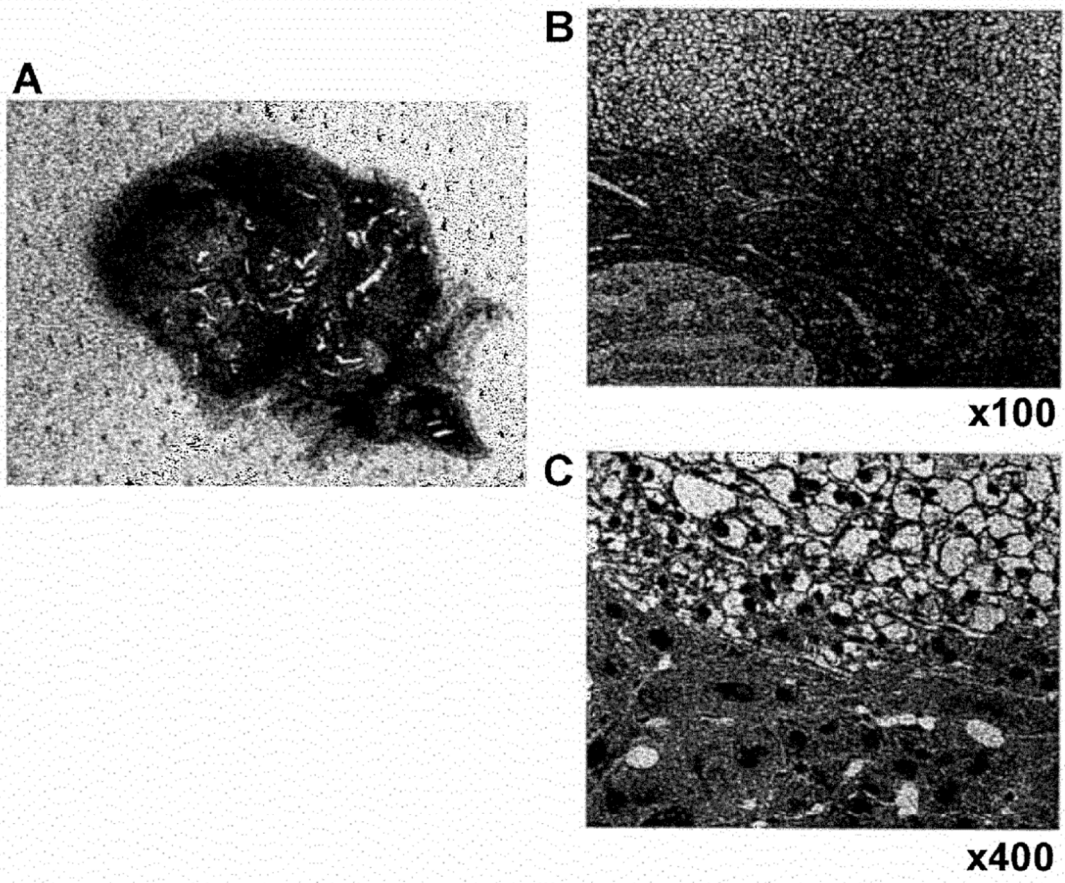


FIG. 8

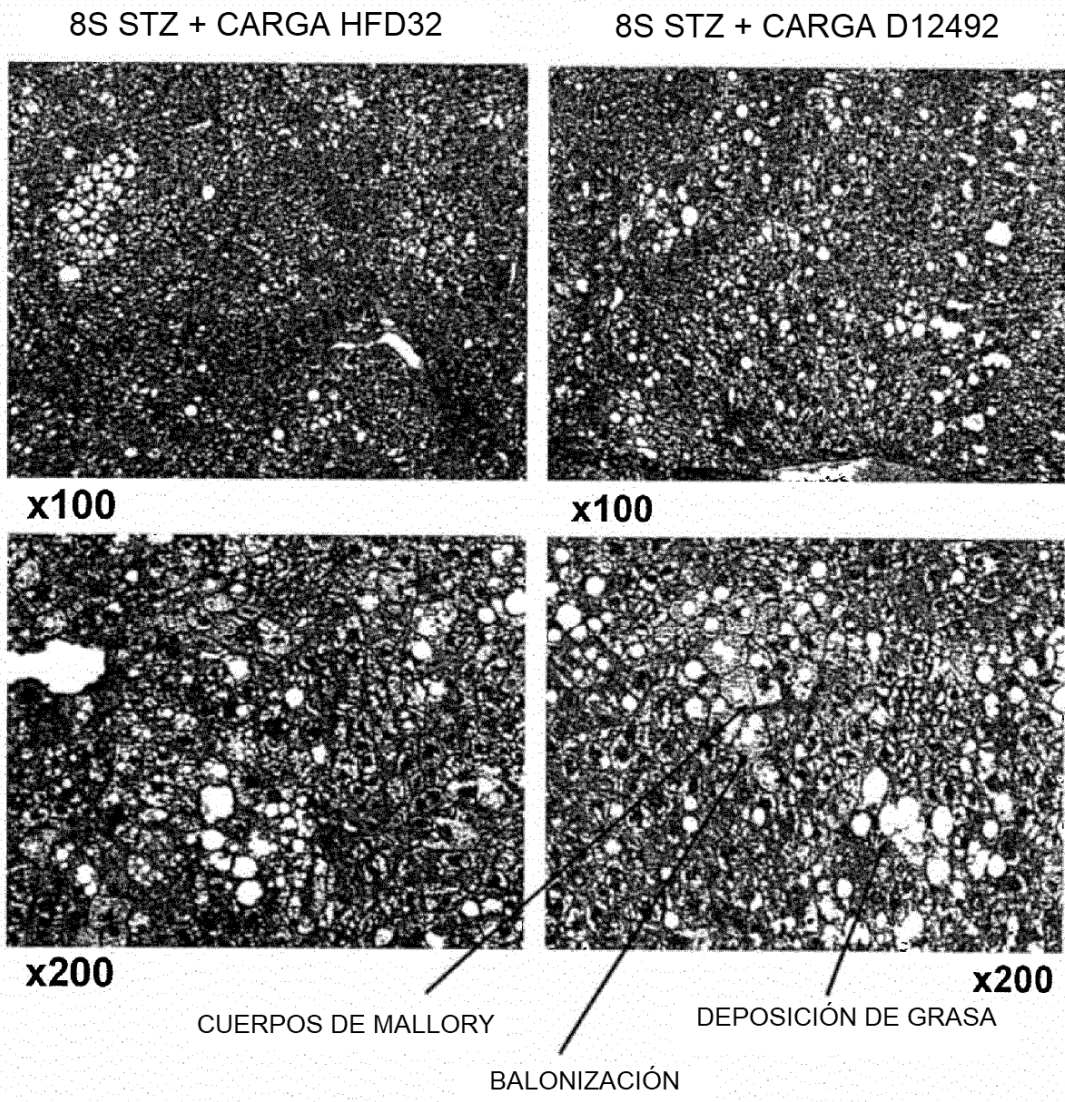
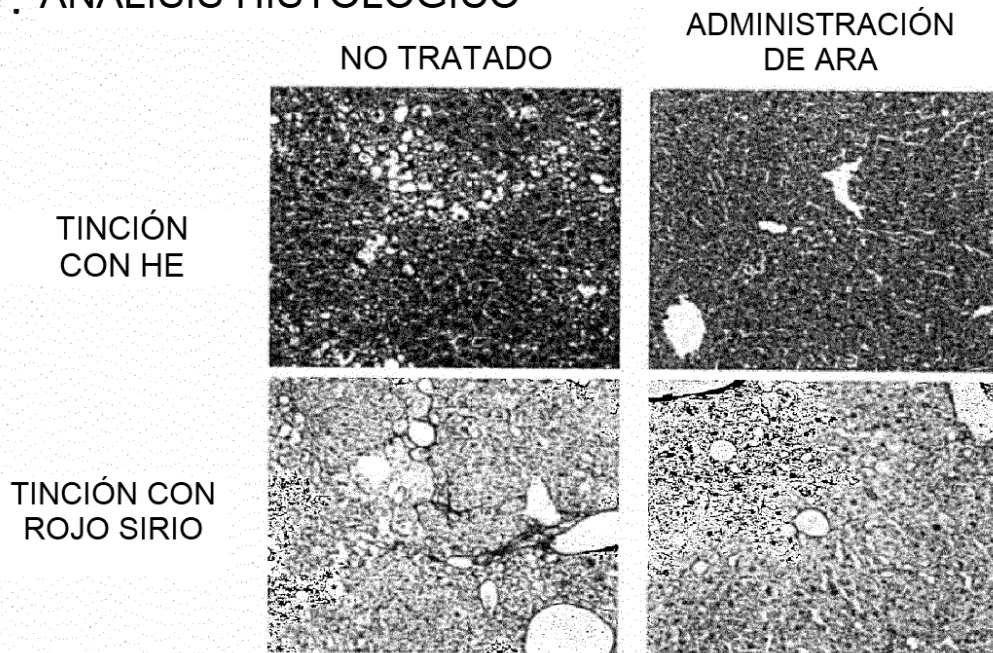


FIG. 9

1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO



2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES

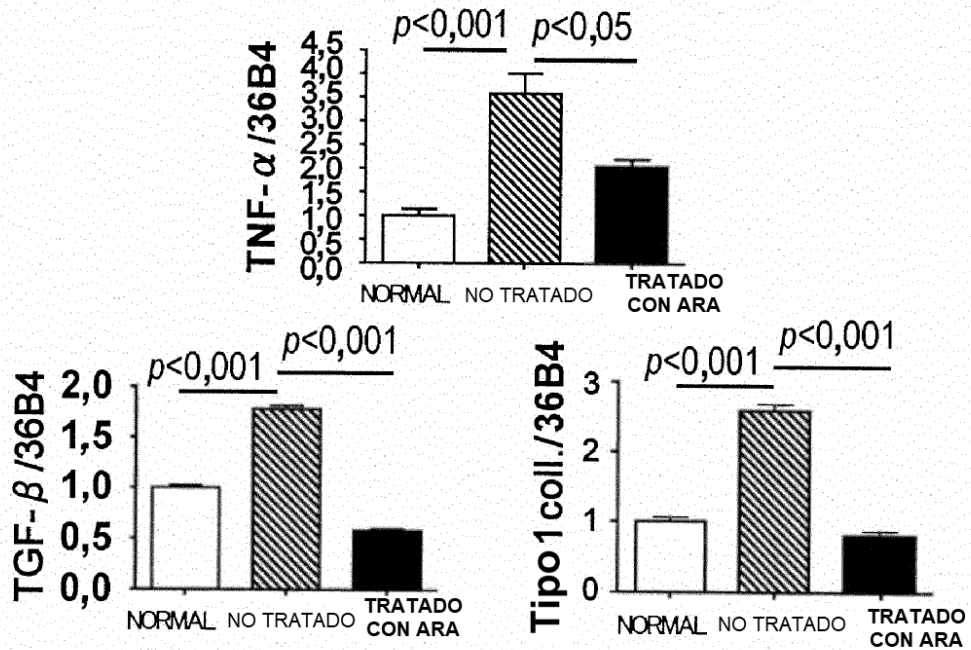
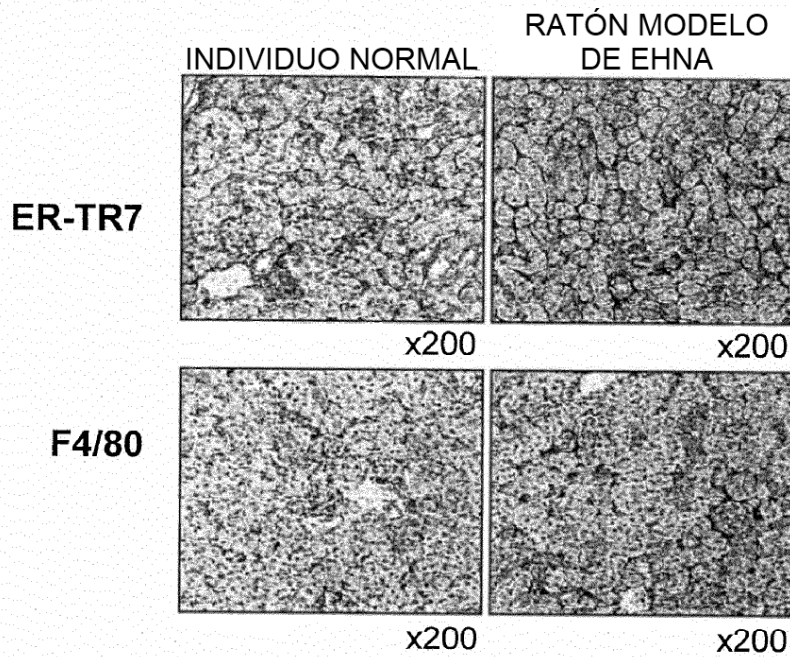


FIG. 10

1. NEFROPATÍA DIABÉTICA



2. RETINOPATÍA DIABÉTICA

(IMÁGENES DE INMUNOTINCIÓN DE NUEVOS VASOS SANGUÍNEOS, CD 31)

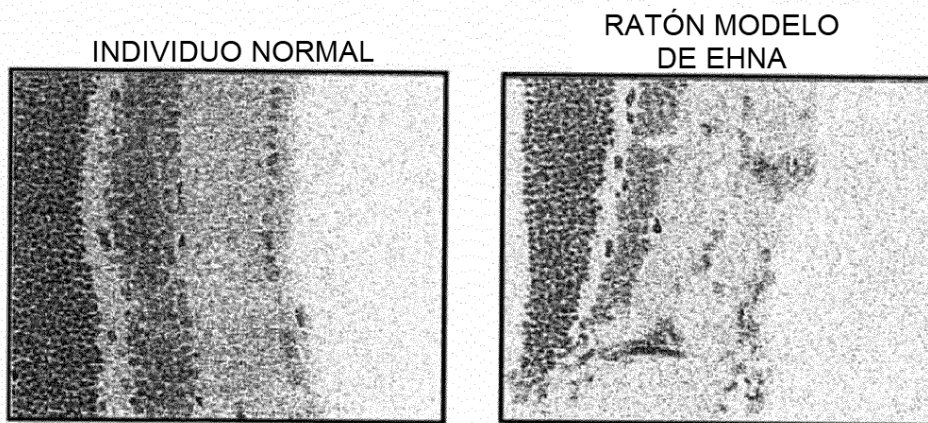


FIG. 11