

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 535**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01) **A61P 1/12** (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2011** **E 16201706 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** **EP 3173079**

54 Título: **Materiales y procedimientos para mejorar la función gastrointestinal**

30 Prioridad:

24.09.2010 US 386317 P
11.01.2011 US 201161431629 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)**
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US

72 Inventor/es:

VIDYASAGAR, SADASIVAN;
OKUNIEFF, PAUL y
ZHANG, LURONG

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 805 535 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

Materiales y procedimientos para mejorar la función gastrointestinal

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/386.317 presentada el 24 de septiembre de 2010, y la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/431.629 presentada el 11 de enero de 2011, que se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Apoyo del gobierno

La presente invención se realizó con apoyo de gobierno con la Concesión N.º RC2-AI-087580 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH). El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

Antecedentes de la invención

La radiación, una terapia común para tumores malignos en el abdomen y la pelvis, puede causar daño grave al revestimiento del tubo gastrointestinal (GI), que está compuesto de células epiteliales intestinales que se dividen rápidamente. Los efectos tóxicos de la radiación en el sistema gastrointestinal causan síntomas tales como náuseas, vómitos, diarrea, desequilibrio de electrolitos y deshidratación, y afectan adversamente la recuperación del paciente en el transcurso de la terapia del cáncer. Incluso a bajas dosis, se observa una pérdida continua de las vellosidades y borde en cepillo del intestino delgado en el plazo de días después de la irradiación. Mientras que las células de la cripta pueden repoblar rápidamente la región después de dosis de leves a moderadas de (irradiación) IR, se pierden a una tasa logarítmica después de la irradiación a dosis altas.

La irradiación es particularmente destructiva para el epitelio vellosa, donde se produce la absorción de nutrientes y electrolitos. El epitelio vellosa experimenta un proceso continuo de pérdida y regeneración celular, en el que un suministro constante de enterocitos inmaduros, que se originan en las células progenitoras situadas dentro de los polos inferiores de las criptas de Lieberkuhn, emigran fuera del compartimiento proliferativo en la base de la cripta a la parte superior de la vellosidad. Durante su corta vida, estos enterocitos maduran gradualmente a lo largo del eje de la cripta-vellosidad en células de las vellosidades. La radioterapia a la región del abdomen y de la pelvis destruye no solo las células de las vellosidades existentes, sino también los enterocitos de los que se forman nuevas células de las vellosidades, y así, pueden agotar casi la totalidad del epitelio de las vellosidades incluso a dosis moderadas.

Debido al uso creciente de dosis de radiación totales altas y agentes citotóxicos, la radioterapia ha sido complicada por su toxicidad GI aguda. El daño al tubo GI no solo produce una malabsorción y pérdida de nutrientes y líquidos, sino que también interrumpe la función de la barrera intestinal. El intestino permeable permite una entrada fácil de patógenos a través de la barrera de la mucosa, causando inflamación, bacteremia y endotoxemia. Por ejemplo, pueden desarrollarse enteritis aguda por radiación, diarrea y dolor abdominal en el plazo de días después de la irradiación incluso a dosis de tan solo 5-12 Gy (un ciclo fraccionado convencional de radiación usa 1,8-2 Gy por fracción), aunque la toxicidad GI normalmente se produce a dosis más altas. La enteritis crónica por radiación puede desarrollarse entre 18 meses y 6 años después de la radioterapia, aunque puede desarrollarse incluso 15 años después²⁷⁻²⁹.

Las opciones de tratamiento para la enteritis por radiación son limitadas. Los regímenes de tratamiento convencionales incluyen la administración de antidiarreicos para prevenir la pérdida de líquidos, esmectita como un adsorbente de sales biliares, opioides para aliviar el dolor estomacal o rectal, y esteroides para aliviar la inflamación. Los ensayos clínicos también han investigado la eficacia de *L. acidophilus*, esmectita o sucralfato para la profilaxis de la diarrea, pero solo se logró una reducción moderada de los síntomas GI agudos³⁰.

Un enfoque común en la terapia de la enteritis por radiación es usar nutrición parenteral total (TPN) para proporcionar descanso intestinal. Sin embargo, queda por determinar si la nutrición parenteral satisface las necesidades nutricionales de los pacientes, o tiene realmente efectos terapéuticos en la enteritis por radiación. Aunque la TPN puede corregir el desequilibrio de la nutrición en ciertos pacientes, todavía puede desarrollarse la enteritis grave por radiación³⁷. La TPN también causa atrofia intestinal, normalmente en el plazo de 48 horas desde la administración. La TPN también debilita las barreras mecánicas e inmunológicas³⁸.

Se cree que los mecanismos biológicos exactos que conducen a la atrofia de la mucosa durante TPN, que no han sido bien establecidos, implican tanto señales de células locales sensibles a nutrientes³⁹ como señales humorales, tales como hormonas intestinales^{40,41}. Se ha demostrado que la TPN induce una rápida disminución (<8 h) en la circulación sanguínea intestinal, que precede a la atrofia de las vellosidades y la supresión de la síntesis de proteínas en 24 h, y la proliferación y supervivencia celular en 48 h⁴². A diferencia, la alimentación oral aumenta rápidamente la circulación sanguínea intestinal en animales neonatales y maduros^{43,44}. Similarmente, en lechones neonatales, la alimentación enteral casi inmediatamente (en el plazo de 1-3 horas) aumenta la circulación sanguínea portal (PBF) hasta el 50 % por encima de los valores en lechones privados de alimentos⁴⁵. Así, como se muestra en diversos estudios, la alimentación enteral es muy superior a la alimentación parenteral^{7,8}.

Actualmente, hay una falta de terapia nutricional que puede aliviar eficazmente la enteritis por radiación. Aunque estudios recientes sugirieron que las dietas elementales o de exclusión específica pueden ser beneficiosas en casos^{2,31,32} seleccionados, la eficacia de este enfoque no ha sido confirmada posteriormente. La terapia dietética actual simplemente ofrece un medio de apoyo nutricional a pacientes desnutridos con enteritis crónica por radiación.

- 5 Los estudios en animales demuestran que la glutamina protege tanto la mucosa del tubo GI superior como inferior de lesiones causadas por quimioterapia o radioterapia (RT)³³⁻³⁵. Sin embargo, los ensayos clínicos fallan en demostrar que la alimentación de glutamina oral puede prevenir o aliviar la diarrea aguda en pacientes que han recibido radioterapia pélvica³⁶. Así, existe una necesidad del desarrollo de composiciones alimenticias mejoradas para el tratamiento de lesiones GI inducidas por irradiación. Como será evidente de las divulgaciones que siguen, estos y otros beneficios son proporcionados por la presente invención.

El documento US 2009/0238893A1 describe una formulación nutricional para el tratamiento de afecciones inflamatorias del tracto GI y comprende (a) una fuente de lípidos, (b) una fuente de hidratos de carbono y (c) una fuente de proteínas.

- 15 El documento US 4.959.350A describe un producto de dieta enteral que tiene un pH inferior a aproximadamente 4,5 y que comprende como compuestos de nitrógeno dietéticos proteínas o compuestos derivados de proteínas, grasas, hidratos de carbono y agua. Se dice que el producto de dieta enteral muestra una combinación única de características ventajosas tales como buena estabilidad microbiológica, buena estabilidad física de la emulsión, baja osmolalidad, propiedades organolépticas satisfactorias y propiedades nutricionales y de manejo satisfactorias en la clínica.

- 20 El documento US 5.780.451A describe un producto de nutrición enteral para una persona que tiene colitis ulcerosa, que contiene en combinación (a) una mezcla oleosa que contiene ácido eicosapentaenoico (20:5n3) y/o ácido docosahexaenoico (22:6n3) y (b) una fuente de hidratos de carbono no digeribles que se metabolizan a ácidos grasos de cadena corta mediante microorganismos presentes en el colon del ser humano.

- 25 El documento WO87/01589A1 describe un procedimiento para tratar una disfunción catabólica en un animal, que comprende administrar a un animal una cantidad terapéuticamente eficaz de glutamina o un análogo de la misma.

- El documento CN101779750A describe un alimento para el predestete de lechones que se dice que resuelve los problemas de mala palatabilidad y baja digestibilidad. El alimento para el predestete de lechones es un producto en partículas completamente expandido y consiste en maíz expandido, soja expandida, harina integral de trigo, productos lácteos, harina de pescado, verduras, un acidulante, agua, grasas comestibles, lisina, metionina, premezcla de vitaminas y premezcla de minerales.

- 30 Haider y col. (BMJ 1994; 308:624) describe un estudio para evaluar el riesgo de hiperglucemia con dos soluciones de rehidratación orales estándar que contienen hidratos de carbono en comparación con una solución libre de hidratos de carbono durante la rehidratación de pacientes diabéticos con diarrea aguda. Se descubrió que no existían diferencias significativas en las concentraciones de glucosa en sangre, la producción de heces y la duración de la recuperación de la diarrea entre los tres grupos.

Breve resumen

- La invención objeto proporciona una composición terapéutica estéril para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene atrofia de las vellosidades provocada por radiación o quimioterapia, en la que la composición está formulada para administración enteral y que comprende uno o más aminoácidos libres seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y agua, en la que la composición tiene una osmolalidad total de 230 mosm a 280 mosm y en la que la composición no comprende uno más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina y metionina o, si estos ingredientes están presentes, la glucosa está presente en una concentración de menos de 1g/l, la glutamina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l y la metionina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l.

- 45 La composición objeto es útil para el tratamiento o la mejora de la lesión gastrointestinal asociada a la pérdida de células epiteliales del intestino delgado, particularmente en la región vellosa y el borde en cepillo, y/o para el tratamiento o la mejora de enfermedades o afecciones asociadas a la alteración de la capacidad de absorción en el intestino delgado.

- 50 Ventajosamente, la composición terapéutica objeto puede ser diseñada a la medida al estado de absorción desequilibrado del sistema gastrointestinal, causado por la pérdida de células epiteliales del intestino delgado y la alteración de la función de la proteína de transporte en el intestino delgado. En una realización preferida, la composición objeto se formula para la administración por vía oral.

- 55 En una realización, la composición terapéutica comprende, consiste esencialmente en o consiste en, uno o más aminoácidos libres seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y, opcionalmente, vehículos, electrolitos, vitaminas, agentes de tamponamiento y aromatizantes terapéuticamente aceptables. La composición terapéutica se administra a través de una vía enteral. La osmolalidad

total de la composición es de aproximadamente 230 mosm a 280 mosm, o preferentemente, aproximadamente 250 a 260 mosm. En una realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,1 a 7,9, preferentemente, aproximadamente 7,4.

En una realización específica, la composición de la invención objeto no comprende glucosa, glutamina, metionina y/o lactosa.

Preferentemente, la composición objeto se administra por vía oral y llega al intestino del sujeto.

También se desvelan procedimientos de preparación de la composición terapéutica, y para cribar nutrientes o electrolitos para la inclusión en la composición terapéutica/dietética objeto, seleccionando nutrientes o electrolitos que retienen o adquieren la capacidad de absorción considerable que sigue a la destrucción de las células epiteliales del intestino delgado. Estos procedimientos pueden ser adaptados para su uso en pacientes individuales, facilitando así el desarrollo de composiciones y procedimientos diseñados específicamente para satisfacer las necesidades de un paciente individual.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra el efecto de la irradiación (IR) en la secreción neta de anión (A) y la conductancia (B). (A). Se estudiaron tejidos de IR de 12 Gy en el día 1, 3 y 4. El aumento máximo en I_{sc} se observó en el día 2. La flecha representa el momento de tiempo cuando se añadió forskolina. (B). Efecto de las dosis elevadas de IR en la secreción neta de anión. Todos los tejidos se estudiaron en el día 6 y $n = 12$. Los resultados mostraron un aumento en la conductancia dependiente de la dosis de IR.

La **Figura 2** muestra el cambio en I_{sc} con el aumento de dosis de irradiación. Todos los valores se derivan de $n = 24$ tejidos. Los experimentos se realizaron en el día 4 post-irradiación en solución regular de Ringer en ambos lados de la cámara con una osmolaridad total de 296 mosm. Las secciones de histopatología mostraron daño mínimo a las vellosidades y a la cripta a 3 Gy, y un daño extenso a las vellosidades y a la cripta a 7 Gy en comparación con 0 Gy.

La **Figura 3A** muestra el cambio en I_{sc} en células epiteliales de ratones con el tiempo después de la irradiación a 3 Gy. Los valores representan la media \pm E.E.M. $n = 6$ tejidos. El máximo aumento en I_{sc} se observó en el 6º día después de la irradiación. No se observó diferencia significativa entre el 5º, 6º y 7º días. Con tiempo > 7 días post-irradiación, hubo una ligera disminución en I_{sc} en comparación con la del día 5, 6 o 7. Los valores de I_{sc} del día 5, 6 y 7 fueron similares. La **Figura 3B** muestra el transporte de iones de una célula epitelial del intestino delgado. La **Figura 3C** muestra el efecto de la bumetanida en I_{sc} basal y estimulado con AMPc en tejidos no irradiados e irradiados con 3 Gy. La **Figura 3D** muestra la contribución de HCO_3^- en la secreción neta de anión. Esto se determinó reemplazando Cl^- en la solución de Ringer con cantidades equimolares de isetonato. La forskolina estimuló un aumento en I_{sc} a 0 Gy (* \square , $p < 0,02$), pero no en tejidos a 3 Gy. La **Figura 3E** muestra el efecto de Na^+ del baño en la secreción de HCO_3^- . Todos los resultados mostrados en la Figura 3 son de $n = 6$ tejidos. Las barras de error representan el EEM.

La **Figura 4A** muestra cambios en el nivel de endotoxina en plasma después de IR. Los niveles de endotoxina en plasma se midieron en el día 6, después de IR. La **Figura 4B** muestra cambios en la relación de permeabilidad de Cl^- y Na^+ representada contra cambios en el voltaje de la membrana (potencial de dilución). La irradiación a 7 Gy causa una pérdida completa de selectividad.

La **Figura 5** muestra que la irradiación aumenta los niveles de los mediadores inflamatorios, que incluyen IL-1 β , TNF α y MIP- α .

La **Figura 6** muestra cambios en la secreción de HCO_3^- debido a irradiación e inmunotinción para la maquinaria secretora de HCO_3^- . (A) muestra los efectos de la irradiación en el Na^+ del baño en la secreción de HCO_3^- . Se realizaron experimentos en (A) en soluciones que contienen Cl^- con Na^+ 140 mM o (B) soluciones que contienen Cl^- sin Na^+ . Los tejidos fueron estimulados con forskolina. Se comparó la secreción de HCO_3^- con aquella de ratones irradiados entre 0 Gy y 3 Gy. Se observó secreción de HCO_3^- dependiente del Na^+ del baño significativamente mayor en ratones irradiados a 0 Gy en comparación con a 3 Gy ($p < 0,001$). Los resultados derivan de $n = 6$ tejidos. Las barras de error representan el E.E.M. (B-E) que muestran la inmunotinción de los tejidos de yeyuno de ratones que recibieron irradiación a 0 Gy y 3 Gy, usando anticuerpo NBCe1 a/b.

La **Figura 7** muestra cambios dependientes de la dosis de IR en el transporte de glucosa y la cinética. (A) muestra que la irradiación produjo una disminución dependiente de la dosis en la I_{sc} de Na^+ estimulada con glucosa medida en la cámara de Ussing. (B) muestra la disminución en la afinidad de SGLT1 por la glucosa a medida que aumentó la dosis de irradiación.

La **Figura 8** muestra que la irradiación redujo la corriente estimulada por glucosa en una manera dependiente de la dosis a partir de irradiación a 1 Gy. La irradiación a 7 Gy casi inactivó completamente el transporte de glucosa.

La **Figura 9A** muestra la corriente de cortocircuito, que muestra la cinética saturada con aumento en la concentración de glucosa. Particularmente, el transporte de glucosa se satura a una concentración de 4 mM.

La **Figura 9B** muestra un aumento dependiente de la dosis de irradiación en los valores de K_m . El aumento máximo en K_m se observó a 7 Gy. Esto indica que la irradiación causó una disminución de la afinidad de SGLT-1 a la glucosa.

La **Figura 10** muestra que V_{max} disminuyó a medida que aumentó la dosis de radiación. La disminución mínima en V_{max} se observó a 7 Gy. Esto indica que la irradiación causa una reducción de SGLT-1 funcional para el

transporte de glucosa.

La **Figura 11** muestra cambios en K_m con el tiempo después de la irradiación. K_m aumentó inmediatamente después de la irradiación y volvió a la normalidad (valores de control) aproximadamente 14 días después de la irradiación.

Las **Figuras 12A y B** muestran resultados de estudios de supervivencia de murinos después de la irradiación de 9 Gy y 15,6 Gy. La muerte de ratones tratados con glucosa se produce a partir de los días 5 y 7, mientras que los ratones de control no murieron hasta 10 días después de la irradiación. En el día 20, el 30 % de los ratones de control estaban vivos, mientras que ninguno de los ratones tratados con glucosa sobrevivió en el día 20.

La **Figura 13** muestra el análisis de transferencia Western de los niveles de proteína SGLT-1 en lisados de célula completa. Los resultados mostraron que la irradiación aumentó la expresión de SGLT-1.

La **Figura 14** muestra el análisis de transferencia Western de los niveles de proteína SGLT-1 en vesículas de membrana del borde en cepillo y tejidos de yeyuno. La irradiación aumentó los niveles de la proteína SGLT-1 en una manera dependiente de la dosis. No se detectó proteína SGLT-1 en los tejidos colónicos.

La **Figura 15** muestra que la irradiación causó un aumento dependiente de la dosis en I_{sc} estimulado con glutamina.

La **Figura 16** muestra que la irradiación causó una disminución dependiente de la dosis en I_{sc} estimulado con lisina.

Las **Figuras 17A y B** muestran la tasa de supervivencia de ratones después de la terapia de lisina (A) o glucosa (B) después de IR. La administración de lisina produjo un aumento de la supervivencia, mientras que la administración de glucosa produjo una disminución de la supervivencia.

La **Figura 18** muestra los análisis de transferencia Western para diversas proteínas de transporte. Análisis de transferencia Western que muestran NKCC1 (A), CFTR (C) y NBCe1-A/B (B) niveles de proteína en el yeyuno de ratones. De izquierda a derecha, los carriles representan 0, 1, 3, 5 y 7 Gy. La irradiación aumentó los niveles de proteínas NKCC1 de 1-5 Gy y tal aumento disminuyó a 7 Gy (A). Los niveles de proteína NBCe1-A/B disminuyeron significativamente después de la irradiación. Los niveles de proteína CFTR (C) en tejidos de yeyuno aumentaron significativamente después de la irradiación a 3 Gy en comparación con 0 Gy. El yeyuno tuvo los niveles de proteína NBCe1-A/B más altos en comparación a aquellos en el duodeno, íleon o colon (D). Los tejidos se recogieron para la transferencia western en el día 6 después de la irradiación.

Las **Figuras 19A y B** son modelos esquemáticos para la secreción de anión estimulada con AMPc (A) e inducida por irradiación (B).

La **Figura 20** muestra la lesión a la mucosa del intestino delgado en ratones tratados con 5-fluorouracilo (5-FU) (**Fig. 20A**) y cisplatina (**Fig. 20B**). (**A**) muestra el cambio en I_{sc} en ratones inyectados con 5-FU. (**B**) muestra el cambio en I_{sc} en ratones inyectados con cisplatino.

La **Figura 21** muestra que la administración de la composición terapéutica de la invención objeto mejora la función del intestino delgado de ratones que han recibido 5-FU.

Divulgación detallada

La invención objeto proporciona composiciones terapéuticas y procedimientos para mejorar la función del intestino delgado. La composición se formula para administración enteral. Las composiciones y procedimientos de la invención objeto son particularmente útiles para el tratamiento o la mejora de lesión gastrointestinal asociada a la pérdida de células epiteliales del intestino delgado, particularmente en la región de las vellosidades y borde en cepillo, y/o para el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas a la alteración de la función de la proteína de transporte en el epitelio del intestino delgado.

Ventajosamente, la composición terapéutica objeto es diseñada a la medida al estado de absorción desequilibrado del sistema gastrointestinal, causado por la pérdida de células epiteliales del intestino delgado, particularmente, en la región de las vellosidades del intestino delgado y el borde en cepillo, además de la alteración de la función de la proteína de transporte. Particularmente, la invención objeto puede mejorar la curación de la mucosa del intestino delgado, restaurar la función del intestino delgado, potenciar la retención de líquidos, prevenir o aliviar la atrofia del intestino delgado y/o restaurar o potenciar la función de la barrera del intestino delgado de un paciente que tiene una lesión en la mucosa del intestino delgado.

En una realización, la composición terapéutica comprende, consiste esencialmente en o consiste en uno o más aminoácidos seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y, opcionalmente, vehículos, electrolitos, vitaminas, agentes de tamponamiento y aromatizantes terapéuticamente aceptables. La composición terapéutica se administra a través de una vía enteral. La osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 230 mosm a 280 mosm, o preferentemente, es aproximadamente 250 a 260 mosm. En una realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 4,0 a 8,5, preferentemente 5,0 a 8,2, más preferentemente 6,0 a 8,0, más preferentemente, 7,1 a 7,9, y más preferentemente, aproximadamente 7,4.

En una realización específica, la composición de la invención objeto no comprende glucosa, glutamina, metionina y/o lactosa.

La invención objeto se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la alimentación enteral a sujetos con solo los nutrientes que retienen o adquieren suficiente capacidad de absorción después de la lesión a la mucosa del intestino delgado, mejora la curación de la mucosa, restaura la función del intestino delgado, potencia la retención de líquidos y alivia una serie de síntomas de enfermedad asociados que incluyen, pero no se limitan a, malabsorción, diarrea, náuseas, vómitos, desequilibrio de electrolitos y deshidratación.

Según la invención objeto, se ha determinado que, después de la radiación y quimioterapia, se observa una alteración en la función de la proteína de transporte con respecto a, por ejemplo, la glucosa, glutamina y lisina, y electrolitos tales como Na^+ , HCO_3^- y Cl^- . Además, la radiación causa un aumento en la secreción neta de anión. Las alteraciones de la capacidad de absorción de nutrientes y electrolitos se producen inmediatamente después de la radiación y la quimioterapia, pero es posible recuperar la capacidad de absorción hacia la normalidad (aproximadamente 8-14 días después de la irradiación en modelos de ratones).

Específicamente, la radiación causa una disminución dependiente de la dosis de irradiación en la absorción de glucosa debido a la reducida afinidad del sistema de transporte de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1) por la glucosa. Estudios funcionales sobre la estimulación de glucosa mostraron que la radiación causó una disminución dependiente de la dosis en la actividad de transporte de glucosa y disminuyó la afinidad de SGLT-1 por la glucosa.

Se sabe que la presencia de nutrientes o solutos no absorbidos en la luz intestinal puede conducir a diarrea osmótica. Según la invención objeto, se ha descubierto que la alimentación oral de un sujeto irradiado con glucosa y/o glutamina causa diarrea osmótica y una disminución en la supervivencia, mientras que la alimentación oral de cada uno, o una combinación de los aminoácidos seleccionados de lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina y/o serina, prolonga la supervivencia.

Composición terapéutica para mejorar la función del intestino delgado

En un aspecto, la invención objeto proporciona composiciones terapéuticas para mejorar la función del intestino delgado. En una realización, la composición terapéutica comprende, consiste esencialmente en o consiste en uno o más aminoácidos libres seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y, opcionalmente, vehículos, electrolitos, vitaminas, agentes de tamponamiento y aromatizantes terapéuticamente aceptables. La composición terapéutica se administra a través de una vía enteral.

Preferentemente, la composición es ligeramente alcalina y es hipotónica cuando se compara a la presión osmótica de las células epiteliales del intestino delgado (tales como las células de las vellosidades y las células de la cripta del intestino delgado). Preferentemente la composición objeto comprende agua. Preferentemente, la composición se formula como una bebida de rehidratación oral para mejorar la función del intestino delgado que es debilitada debido a la pérdida de, o la lesión a, las células epiteliales de las vellosidades.

La osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 230 mosm a 280 mosm, o cualquier valor entre los mismos. Preferentemente, la osmolaridad total es de aproximadamente 250 a 260 mosm. También se desvela una composición que tiene una osmolaridad total que es cualquier valor más inferior a 280 mosm.

En una realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,1 a 7,9, o cualquier valor entre los mismos. Preferentemente, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,3 a 7,5, más preferentemente, aproximadamente 7,4.

En ciertas realizaciones, cada aminoácido libre puede estar presente a una concentración de 4 mM a 40 mM, o cualquier valor entre los mismos, en las que la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 230 mosm a 280 mosm. Alternativamente, si la concentración de aminoácido se calcula basándose en mg/l, cada aminoácido libre puede estar presente a una concentración de 300 mg/l a 8000 mg/l, o cualquier valor entre los mismos, en las que la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 240 mosm a 280 mosm.

En ciertas realizaciones específicas, la composición terapéutica comprende uno o más aminoácidos libres presentes a sus concentraciones respectivas de la siguiente manera: lisina a una concentración de aproximadamente 730 a 6575 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; ácido aspártico a una concentración de aproximadamente 532 a 4792 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; glicina en una concentración de aproximadamente 300 a 2703 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; isoleucina en una concentración de aproximadamente 525 a 4722 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; treonina en una concentración de aproximadamente 476 a 4288 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; tirosina en una concentración de aproximadamente 725 a 6523 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; valina en una concentración de aproximadamente 469 a 4217 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; triptófano en una concentración de aproximadamente 817 a 7352 mg/l o cualquier valor entre los mismos y/o serina en una concentración de aproximadamente 420 a 3784 mg/l, o cualquier valor entre los mismos; en la que la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 240 mosm a 280 mosm.

En una realización, la invención objeto proporciona una bebida que comprende los siguientes componentes lisina (11-21 mosm), ácido aspártico (3-13 mosm), glicina (19-29 mosm), isoleucina (19-29 mosm), treonina (19-29 mosm), tirosina (0,5 - 5 mosm), valina (19-29 mosm), triptófano (5-20 mosm) y serina (3-8 mosm), o un subconjunto de estos ingredientes.

En una realización específica, la composición comprende lisina, glicina, treonina, valina y tirosina en una forma de aminoácidos libres. En otra realización específica, la composición comprende lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina en una forma de aminoácidos libres.

5 En otra realización, la composición comprende uno o más dipéptidos que están formados de los mismos aminoácidos o diferentes seleccionados de lisina, de glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina o serina.

En una realización, la composición no contiene glutamina y/o metionina; y ningún di-, oligo- o polipéptido o proteínas que pueden ser hidrolizadas en glutamina y/o metionina.

10 En una realización alternativa, la composición puede comprender el aminoácido libre glutamina, y opcionalmente uno o más dipéptidos que contienen glutamina, en la que la concentración total del aminoácido libre glutamina y el (los) dipéptido(s) que contiene(n) glutamina es inferior a 300 mg/l, o cualquier concentración inferior a 300 mg/l, tal como 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0,5 mg/l o 0,01 mg/l.

15 En otra realización alternativa, la composición terapéutica puede comprender el aminoácido libre metionina, y opcionalmente uno o más dipéptidos que contienen metionina, en la que la concentración total del aminoácido libre metionina y el (los) dipéptido(s) que contiene(n) metionina es inferior a 300 mg/l, o cualquier concentración inferior a que 300 mg/l, tal como 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0,5 mg/l o 0,01 mg/l.

20 En una realización, la composición terapéutica no contiene ningún sacárido, incluyendo ningún mono-, di-, oligo-polisacárido, ni hidratos de carbono. En una realización específica, la composición terapéutica no contiene glucosa, y/o ningún di-, oligo-, o polisacárido, ni hidratos de carbono que pueden ser hidrolizados en glucosa. En una realización específica, la composición no contiene lactosa. En otra realización específica, la composición terapéutica no contiene fructosa y/o galactosa, y/o ningún di-, oligo-, polisacárido, ni hidratos de carbono que pueden ser hidrolizados en fructosa y/o galactosa.

25 En una realización alternativa, la composición terapéutica puede comprender el monosacárido glucosa, y opcionalmente uno o más disacáridos que contienen glucosa distintos de lactosa, en la que la concentración total del monosacárido glucosa y el (los) disacárido(s) que contiene(n) glucosa está en una concentración inferior a 1 g/l, 500 mg/l, 300 mg/l, 100 mg/l, 50 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l, 0,5 mg/l o 0,01 mg/l.

30 En ciertas realizaciones, la composición terapéutica comprende uno o más electrolitos seleccionados de, por ejemplo, Na^+ ; K^+ ; HCO_3^- ; CO_3^{2-} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; Fe^{2+} ; Cl^- ; iones fosfato, tales como H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} ; cinc; yodo; cobre; hierro; selenio; cromo; y molibdeno. En una realización alternativa, la composición no contiene HCO_3^- ni CO_3^{2-} . En otra realización alternativa, la composición comprende HCO_3^- y CO_3^{2-} a una concentración total inferior a 5 mg/l, o concentraciones inferiores a 5 mg/l.

35 En otra realización, la composición terapéutica comprende una o más vitaminas que incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina D (por ejemplo, vitamina D₂, D₃, D₄ y/o D₅), vitamina E, vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (por ejemplo, riboflavina), vitamina B₃ (por ejemplo, niacina o niacinamida), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (por ejemplo, folato o ácido fólico), vitamina B₁₂ (cobalamina) y vitamina K (por ejemplo, vitamina K₁, K₂, K₃, K₄ y K₅), y colina.

En ciertas realizaciones, la composición no contiene uno o más de los ingredientes seleccionados de oligo-, polisacáridos e hidratos de carbono; oligo-, o polipéptidos o proteínas; lípidos; ácidos grasos de cadena pequeña, media y/o larga; y/o alimentos que contienen uno o más de los nutrientes antes mencionados.

40 En una realización, los iones fosfato tales como H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} se usan para tamponar la composición de la invención objeto. En una realización, la composición terapéutica usa HCO_3^- o CO_3^{2-} como un tampón. En otra realización, la composición terapéutica no usa HCO_3^- o CO_3^{2-} como tampón.

45 El término "que consiste esencialmente en", como se usa en el presente documento, limita el ámbito de los ingredientes y etapas a los materiales o etapas especificados y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la presente invención, es decir, las composiciones y procedimientos para el tratamiento de lesión al epitelio del intestino delgado, particularmente en la región de las vellosidades y borde en cepillo. Por ejemplo, usando "que consiste esencialmente en", la composición terapéutica no contiene ningún ingrediente no especificado, que incluye, pero no se limita a, aminoácidos libres, di-, oligo- o polipéptidos o proteínas; ni mono-, di-, oligo-, polisacáridos e hidratos de carbono que tienen un efecto terapéutico directo beneficioso o adverso en el tratamiento de lesiones al epitelio del intestino delgado, particularmente en la región de las vellosidades y el borde en cepillo. Por tanto, usando el término "que consiste esencialmente en", la composición puede comprender sustancias que no tienen efectos terapéuticos en el tratamiento de lesión al epitelio del intestino delgado; tales ingredientes incluyen vehículos, excipientes, adyuvantes, aromatizantes, etc., que no afectan la salud ni la función del epitelio del intestino delgado lesionado, particularmente en la región de las vellosidades y el borde en cepillo.

El término "oligopéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que consiste en tres a

veinte aminoácidos. El término "oligosacáridos", como se usa en el presente documento, se refiere a un sacárido que consiste en tres a veinte monosacáridos.

En una realización, la composición de la invención objeto comprende nutrientes (tales como aminoácidos libres) y/o electrolitos que retienen o adquieren la capacidad de absorción mejorada en un sujeto que tiene una lesión a las células epiteliales del intestino delgado, cuando se compara con la capacidad de absorción de controles normales que no tienen lesión a las células epiteliales del intestino delgado (tales como las células de las vellosidades, células de la cripta, enterocitos y células progenitoras intestinales).

En otra realización, la composición de la invención objeto no contiene nutrientes (tales como aminoácidos) y/o los electrolitos que no son absorbidos, o que tienen absorción reducida, en un sujeto que tiene una lesión a las células epiteliales del intestino delgado, cuando se compara con la capacidad de absorción de controles normales que no tienen una lesión a las células epiteliales del intestino delgado (tales como las células de las vellosidades, células de la cripta, enterocitos y células progenitoras intestinales). Ventajosamente, las composiciones de la invención objeto facilitan la absorción fácil de nutrientes por el intestino para reducir el excesivo gasto de energía, proporcionándose así descanso intestinal en el periodo de tiempo inmediato después de la lesión de la mucosa.

Procedimiento de tratamiento para mejorar la función del intestino delgado

También se desvelan procedimientos para el tratamiento o la mejora de enfermedades o afecciones asociadas a la pérdida de, o lesión a, las células epiteliales del intestino delgado, particularmente en la región de las vellosidades y el borde en cepillo. En una realización, la pérdida de, o la lesión a, las células epiteliales del intestino delgado producen capacidad de absorción alterada para nutrientes, electrolitos y/o líquidos. Ventajosamente, para pacientes con pérdida de, o con lesión a, las células epiteliales del intestino delgado, particularmente para pacientes con atrofia de la vellosidad del intestino delgado, la invención objeto mejora la curación de la mucosa del intestino delgado; mejora la función del intestino delgado; potencia la absorción de nutrientes y la retención de líquidos en el intestino delgado; previene o alivia la atrofia del intestino delgado; alivia el dolor abdominal; previene y/o trata diarrea; restaura o potencia la función de barrera del intestino delgado; y/o reduce la inflamación de la mucosa del intestino delgado, la bacteremia y/o la endotoxemia.

Por consiguiente, la invención objeto es particularmente beneficioso para mejorar la salud gastrointestinal de sujetos que reciben agentes quimioterapéuticos citotóxicos, radiación pélvica o abdominal, terapia de protones y cirugía abdominal; sujetos que padecen infección o enfermedades autoinmunes asociadas a la inflamación aguda o crónica en el intestino delgado; sujetos que son rutinaria o accidentalmente expuestos a la radiación, tales como, por ejemplo, los astronautas y los pilotos que están expuestos rutinariamente a la radiación espacial, y sujetos expuestos a la radiación debido a un accidente nuclear, actos de guerra o terrorismo.

En una realización, el procedimiento comprende administrar, a través de una vía enteral, a un paciente o sujeto en necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición de la invención. La composición puede ser administrada a un paciente o sujeto inmediatamente antes, durante y/o después de la lesión a las células epiteliales del intestino delgado, y puede ser administrada una vez o muchas veces cada día.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, describe un organismo, que incluye mamíferos tales como primates, a los que puede ser proporcionado el tratamiento con las composiciones según la presente invención. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los procedimientos desvelados de tratamiento incluyen, pero no se limitan a, simios superiores, chimpancés, orangutanes, seres humanos, monos; animales domesticados tales como perros, gatos; ganado vivo tal como caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, cabras, pollos; y animales tales como ratones, ratas, cobayas y hámsteres.

En una realización específica, un sujeto en necesidad de tratamiento es un paciente con lesión a las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, que incluyen la capa de mucosa del duodeno, yeyuno e íleon. Particularmente, un sujeto en necesidad de tratamiento es un paciente con lesión a la región de las vellosidades y el borde en cepillo del intestino delgado. Por ejemplo el sujeto en necesidad de tratamiento tiene atrofia de las vellosidades (por ejemplo, desgaste parcial o completo de la región de las vellosidades y borde en cepillo); tiene al menos un 5 % (tal como al menos el 10 %, 20 %, 30 % o 50 %) de reducción en las células de las vellosidades en el intestino delgado; ha perdido al menos el 5 % (tal como al menos el 10 %, 20 %, 30 % o 50 %) de altura de las vellosidades cuando se compara con lo normal; tiene una pérdida de la función de uno o más transportadores en la región de las vellosidades y borde en cepillo del intestino delgado, en el que los transportadores incluyen, pero no se limitan a, el transportador de SGLT-1, el transportador de AE2, el transportador de NHE1 y el transportador de NBCe1-A/B, en el que la pérdida de la función del transportador es al menos el 5 % (tal como al menos el 10 %, 20 %, 30 % o 50 %); y/o tiene un cambio en la capacidad de absorción de uno o más nutrientes en el intestino delgado, en el que los nutrientes están seleccionados de isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, histidina, tirosina, alanina, arginina, glutamina, ácido aspártico, aspartato, cisteína, glicina, prolina, serina, asparagina, glucosa, fructosa y/o lactosa, en el que el cambio en la capacidad de absorción es al menos el 5 % (tal como al menos el 10 %, 20 %, 30 % o 50 %).

Los cambios en la capacidad de absorción del intestino delgado pueden ser determinados, por ejemplo, usando una

cámara de Ussing, como se ilustra en la sección de Materiales y procedimientos en el presente documento. Por ejemplo, los cambios en el estado de absorción pueden ser determinados, por ejemplo, midiendo una combinación de índices que incluyen, por ejemplo, K_m , $V_{m\max}$ e I_{sc} . La lesión a las vellosidades y otras regiones del intestino delgado puede ser determinada, por ejemplo, por el examen de muestras de biopsia de mucosa del intestino delgado.

Las enfermedades y los procedimientos terapéuticos que causan la lesión a la mucosa de las células epiteliales del intestino delgado, tales como las células de las vellosidades del intestino delgado, pueden ser fácilmente determinadas por un profesional clínico experto. Como es sabido en la profesión médica, los pacientes con ciertas enfermedades, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis ulcerosa, úlceras duodenales y enfermedad de Crohn, sufren destrucción crónica de la mucosa del intestino delgado. La radiación, la quimioterapia y la terapia de protones también causan lesión a las células del intestino delgado.

El término "tratamiento", o cualquier variación gramatical del mismo (por ejemplo, tratar, tratando y tratamiento, etc.), como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, aliviar un síntoma de una enfermedad o afección; y/o reducir, suprimir, inhibir, disminuir o afectar la progresión, gravedad y/o el ámbito de una enfermedad o afección.

El término "mejora", o cualquier variación gramatical del mismo (por ejemplo, mejorar, mejorando y mejora, etc.), como se usa en el presente documento, incluye, pero no es limitado a, retrasar la aparición, o reducir la gravedad de una enfermedad o afección (por ejemplo, diarrea, bacteremia y/o endotoxemia). La mejora, como se usa en el presente documento, no requiere la ausencia completa de los síntomas.

El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de tratar o mejorar una enfermedad o afección o de otro modo capaz de producir un efecto terapéutico previsto.

También se desvela un procedimiento para promover la salud intestinal de un sujeto con lesión a las células epiteliales del intestino delgado, en el que dicho procedimiento comprende: identificar un sujeto con lesión a las células epiteliales del intestino delgado, o que está a punto de ser infligido con una lesión tal, y está en necesidad de tratamiento o mejora, y administrar, a través de una vía enteral, al sujeto, una cantidad eficaz de una composición que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en uno o más aminoácidos libres seleccionados de lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina y serina; agua; y opcionalmente, vehículos, electrolitos, vitaminas, agentes de tamponamiento y aromatizantes terapéuticamente aceptables, en el que la composición tiene una osmolaridad total de 240 a 280 mosm y un pH de aproximadamente 7,1 a 7,9.

En una realización, uno o más de los siguientes nutrientes no es administrado, a través de una vía enteral, a un sujeto con (o a punto de tener) lesión a las células epiteliales del intestino delgado, en el que los nutrientes están seleccionados de glutamina, metionina, y cualquier di-, oligo- o polipéptido o proteína que pueda ser hidrolizado en glutamina y/o metionina; glucosa y cualquier di-, oligo, o polisacárido, e hidrato de carbono que pueda ser hidrolizado a glucosa; y/o alimentos que, con la digestión, requieran la absorción de cualquiera de los nutrientes anteriormente mencionados en el intestino delgado.

En otra realización, para un sujeto con (o a punto de tener) lesión a las células epiteliales del intestino delgado, ninguno de los siguientes nutrientes se administra a través de una vía enteral, en el que los nutrientes están seleccionados de sacáridos, lípidos, ácidos grasos y/o alimentos que, con la digestión, requieren la absorción de cualquiera de los nutrientes anteriormente mencionados en el intestino delgado. Para pacientes que se exponen a la radiación, o reciben radiación, quimioterapia y terapia de protones, la lesión a las células epiteliales del intestino delgado dura normalmente durante al menos 3, 7, 14, 21, 30 días, o cualquier periodo entre 1-30 días.

En otra realización, después de cualquier periodo entre 1-30 días (tal como después de 3, 7, 14, 21, 30 días) desde que el sujeto es expuesto a la radiación, o recibe radiación, quimioterapia y/o terapia de protones, se administra uno o más de los nutrientes siguientes a través de una vía enteral para mejorar la curación de la mucosa, en la que los nutrientes se seleccionan entre: glutamina, metionina y cualquier di, oligo o polipéptido o proteínas que se pueden hidrolizar a glutamina y/o metionina, glucosa y cualquier di, oligo, polisacárido e hidratos de carbono que se pueden hidrolizar a glucosa y/o alimento que, tras la digestión, requiere absorción de cualquiera de los nutrientes mencionados anteriormente en el intestino delgado.

En una realización específica, la composición objeto se administra por vía oral y alcanza el intestino delgado del sujeto. Opcionalmente, el procedimiento comprende además administrar, a través de una vía parenteral, nutrientes y electrolitos requeridos que no son administrados en cantidades suficientes a través de la vía enteral.

En una realización, la invención objeto no se usa para proporcionar cantidades significativas o toda la nutrición esencial a un sujeto, sino que es para mejorar la curación de la mucosa de intestino delgado, restaurar la función del intestino delgado, potenciar la retención de líquidos, prevenir o aliviar la atrofia de las vellosidades del intestino delgado, prevenir y/o tratar la diarrea, y/o restaurar o potenciar la función de la barrera intestinal. En una realización específica, la composición de la bebida también se basa en la mejora en la función de la barrera. La función de la barrera puede ser determinada usando múltiples técnicas que incluyen: a) un aumento en las mediciones de la conductancia en los tejidos montados en una cámara de Ussing, b) potencial de dilución usado para medir la

- permeabilidad relativa de Cl y Na (PCI/PNa) (solo una barrera intacta y funcional puede mantener la selectividad iónica; cuando se pierde la función de la barrera, la relación selectiva del ion es próxima a uno), y c) midiendo los niveles de endotoxina en plasma. Cuando se pierde la función de la barrera de la mucosa, las bacterias intestinales comensales pueden encontrar su camino en la circulación sistémica, resultando niveles elevados de endotoxina en plasma. Los niveles de endotoxina pueden medirse en una muestra de sangre de un paciente. Los niveles de endotoxina en plasma también pueden ser usados como un índice para medir la mejora con el tratamiento.
- Las composiciones de la invención objeto pueden ser usadas en el tratamiento o la mejora de cualquier enfermedad o afección asociada a la pérdida, destrucción, o reducción de células epiteliales del intestino delgado, particularmente la pérdida, destrucción o reducción en la función o el número de células de las vellosidades, enterocitos, y/o células progenitoras intestinales del intestino delgado. La invención objeto es particularmente útil para el tratamiento o la mejora de cualquier enfermedad o afección asociada a la pérdida, inactivación o alteración funcional de las proteínas de transporte en las células epiteliales del intestino delgado, particularmente las proteínas de transporte en las células de las vellosidades del intestino delgado.
- En una realización, las composiciones y procedimientos de la invención objeto pueden usarse en el tratamiento o la mejora de una enfermedad o afección que surge de, o asociada a, una afinidad reducida del sistema de transporte de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1) por la glucosa; una pérdida o actividad reducida de cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ electrogénico del extremo NH_2 (NBCe1-A/B); una pérdida o actividad reducida del transportador de intercambio C-HCO_3^- apical (AE1); y/o un nivel aumentado o actividad de los sistemas de transportador de CFTR y/o NKCC-1.
- En a específicamente realización preferida, las composiciones y procedimientos de la invención objeto pueden usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado causada por radiación. En una realización específica, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado causado por radioterapia, particularmente radioterapia pélvica y abdominal. En una realización específica, la radioterapia es para el tratamiento de cáncer.
- Además, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado causada por exposición rutinaria a la radiación, tal como exposición a la radiación espacial en astronautas y pilotos; exposición a la radiación, tal como por un arma radiactiva y liberación nuclear accidental. Específicamente, la invención objeto puede usarse para tratar o mejorar enteritis aguda y/o crónica por radiación.
- En ciertas realizaciones específicas, las composiciones y procedimientos de la invención objeto pueden usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado, en las que el paciente recibió radiación a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 Gy. En otra realización, el sujeto recibió radiación a una dosis superior a 20 Gy.
- Adicionalmente, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado causada por agentes quimioterapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), hidroxiurea, etopósido, arabinósido, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, metotexato, esteroides, y/o una combinación de los mismos.
- Además, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado causada por terapia de protones.
- En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de enfermedades que implican lesión al intestino delgado que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis ulcerosa, úlceras duodenales, enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca (también conocida como celiaquía). La invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado debido a infección patógena, tal como viral, bacteriana, micótica, u otra infección microbiana.
- En una realización específica, la invención objeto se puede usar en el tratamiento o la mejora de atrofia de las vellosidades del intestino delgado, es decir, desgaste parcial o completo de la región de las vellosidades y borde en cepillo, además de enfermedades y afecciones que surgen de, asociadas a, y/o que son causadas por la atrofia de las vellosidades del intestino delgado.
- En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de atrofia focal de las vellosidades y/o atrofia difusa de las vellosidades; atrofia hiperplásica de las vellosidades y/o atrofia hipoplásica de las vellosidades y/o atrofia de las vellosidades con y sin inflamación de la mucosa.
- En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de atrofia hiperplásica de las vellosidades (con hiperplasia de la cripta) y enfermedades y afecciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad celíaca (con enteropatía sensible al gluten); traumatismo crónico; trasplante de intestino delgado; conductos ileales urinarios; inflamación de la mucosa intestinal; úlceras intestinales; anastomosis intestinal; glucagonoma; amplias resecciones del intestino delgado; atrofia primaria de las vellosidades ileales; atrofia microscópica de colitis; atrofia de las microvellosidades intestinales; y citopatía mitocondrial (anomalía en la cadena respiratoria mitocondrial).

En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de atrofia hipoplásica de las vellosidades (sin hiperplasia de cripta) y enfermedades y afecciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, tumor maligno; deficiencia de células de Paneth, hipopituitarismo, enfermedad celíaca insensible a la dieta sin gluten; esprúe tropical; isquemia asociada a la radiación; atrofia de las vellosidades inducida por fármacos, tal como atrofia de las vellosidades inducida por neomicina y azatioprina.

5 En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de atrofia de las vellosidades con inflamación de la mucosa, además de enfermedades y afecciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad celíaca; intolerancia alimenticia grave; enfermedad congénita de Crohn; enteropatía autoinmune; enterocolitis; y síndromes de inmunodeficiencia.

10 En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de atrofia de las vellosidades causada por enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, hepatitis; cáncer intestinal; linfoma intestinal; diabetes de tipo 1; alergia; gastroenteritis eosinofílica; gastroenteritis viral; y enteropatía autoinmune.

En ciertas realizaciones, la invención objeto puede usarse en el tratamiento o la mejora de atrofia de las vellosidades asociada a enfermedad celíaca en el intestino delgado, que incluye, pero no se limita a, atrofia de las vellosidades de tipo 3a de Marsh (> 40 linfocitos intraepiteliales por 100 enterocitos; atrofia leve de las vellosidades), atrofia de las vellosidades de tipo 3b de Marsh (> 40 linfocitos intraepiteliales por 100 enterocitos; atrofia marcada de las vellosidades), atrofia de las vellosidades de tipo 3c de Marsh (> 40 linfocitos intraepiteliales por 100 enterocitos; región de las vellosidades ausente o casi ausente), (basado en la clasificación de Marsh modificada de la enfermedad celíaca y atrofia de las vellosidades intestinales).

15 20 La invención objeto también puede usarse para tratar o mejorar síntomas asociadas a lesión al intestino delgado que incluyen, pero no se limitan a, malabsorción, diarrea, náuseas, vómitos, desequilibrio de electrolitos, malabsorción y deshidratación.

Preparación de la composición terapéutica para mejorar la función del intestino delgado

25 También se desvela un procedimiento de preparación de la composición terapéutica de la invención. En una realización, el procedimiento comprende preparar una composición para promover la salud intestinal de un sujeto con la pérdida de, o lesión a, células epiteliales del intestino delgado, en el que la composición comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una cantidad eficaz de uno o más ingredientes, en el que los ingredientes son absorbidos por el intestino delgado de un sujeto con una pérdida de, o lesión a, las células epiteliales del intestino delgado, en el que la composición tiene una osmolaridad total de 230 mosm a 280 mosm, o cualquier valor entre los mismos (preferentemente aproximadamente 250 mosm a 260 mosm), en el que la composición tiene un pH de aproximadamente 7,1 a 7,9, o cualquier valor entre los mismos (preferentemente aproximadamente 7,4), y en el que la composición se formula para la administración enteral.

En una realización, los ingredientes están seleccionados de aminoácidos libres, dipéptidos, monosacáridos, disacáridos, o una combinación de los mismos, y opcionalmente, electrolitos, vitaminas, aromatizantes y/o vehículos.

35 En una realización se desvelan procedimientos de cribado de nutrientes o electrolitos para inclusión en la composición terapéutica objeto, seleccionando nutrientes o electrolitos que retienen o adquieren la capacidad de absorción después de la destrucción de las células epiteliales del intestino delgado en las regiones de las vellosidades y de la cripta.

40 Los procedimientos objeto de cribado pueden usarse para determinar nutrientes y/o electrolitos terapéuticos que pueden usarse en el tratamiento o la mejora de enfermedades o afecciones asociadas a la pérdida, destrucción o reducción de células epiteliales del intestino delgado, particularmente la pérdida, destrucción o reducción de células de las vellosidades, enterocitos y/o células progenitoras intestinales. En realizaciones específicas, los procedimientos pueden usarse para diseñar composiciones y procedimientos para satisfacer las necesidades de un paciente específico o grupo de pacientes. En una realización específica, la composición objeto es útil para el tratamiento o la mejora de lesión al intestino delgado después de radiación, quimioterapia, terapia de protones, o debido a inflamación aguda o crónica en el intestino delgado.

En una realización, el procedimiento objeto de cribado comprende:

50 a) Poner en contacto tejido epitelial del intestino delgado que tiene lesión en la mucosa con un nutriente o electrolito candidato;
b) determinar un nivel de capacidad del tejido epitelial del intestino delgado para absorber dicho nutriente o electrolito;
c) comparar dicho nivel con un nivel predeterminado (tal como en tejidos normales); y
d) seleccionar el nutriente o electrolito candidato si la capacidad de absorción del nutriente o electrolito candidato es al menos, por ejemplo, el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o el 90 % del nivel predeterminado.

55 En una realización, el procedimiento objeto de cribado comprende:

- a) administrar, a través de una vía enteral, un nutriente o electrolito candidato a un sujeto con lesión a la mucosa del intestino delgado;
- b) determinar un nivel de capacidad de absorción intestinal de dicho nutriente o electrolito;
- c) comparar dicho nivel con un nivel predeterminado (tal como en sujetos normales); y
- d) seleccionar el nutriente o electrolito candidato si el nivel de absorción del nutriente o electrolito candidato es al menos, por ejemplo, el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o el 90 % del nivel predeterminado.

El nivel de la capacidad de absorción puede determinarse basándose en una combinación de índices que incluyen, por ejemplo, K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e I_{sc} .

El valor de referencia predeterminado puede ser establecido por un experto en la técnica. Por ejemplo, el valor de referencia predeterminado puede ser establecido midiendo los niveles de la capacidad de absorción de dicho nutriente o electrolito en los tejidos epiteliales normales del intestino delgado que no tienen lesión a la mucosa (tales como células de las vellosidades, células de la cripta, enterocitos y células progenitoras intestinales). Como otro ejemplo, el valor de referencia predeterminado puede ser establecido midiendo los niveles de la capacidad de absorción intestinal de dicho nutriente o electrolito en una población normal que no tiene lesión a las células epiteliales del intestino delgado (tales como células de las vellosidades, células de la cripta, enterocitos y células progenitoras intestinales).

En otra realización, el procedimiento objeto de cribado comprende:

- a) determinar la función del tejido del intestino delgado que tiene lesión en la mucosa;
- b) poner en contacto el nutriente o electrolito candidato con el tejido del intestino delgado;
- c) determinar la función del tejido del intestino delgado después de que el tejido del intestino delgado se ponga en contacto con el nutriente o electrolito candidato; y
- d) seleccionar el nutriente o electrolito candidato si dicho nutriente o electrolito candidato mejora la función del intestino delgado.

En otra realización, el procedimiento objeto de cribado comprende:

- a) determinar la función del intestino delgado de un sujeto con lesión a la mucosa del intestino delgado;
- b) administrar, a través de una vía enteral, un nutriente o electrolito candidato al sujeto;
- c) determinar la función de intestino delgado del sujeto después de que se administre el nutriente candidato; y
- d) seleccionar el nutriente o electrolito candidato si dicho nutriente o electrolito candidato mejora la función del intestino delgado.

En ciertas realizaciones, la función del intestino delgado mejora si la administración del nutriente o electrolito candidato disminuye la permeabilidad paracelular, potencia la función de barrera del intestino delgado. Por tanto, la función del intestino delgado mejora si la administración enteral del nutriente o electrolito candidato previene o trata la diarrea, y/o prolonga la supervivencia.

En ciertas realizaciones, el nutriente y electrolito que mejora la función del intestino delgado de un sujeto con lesión a la mucosa del intestino delgado pueden seleccionarse usando los procedimientos que se ilustran en los ejemplos, específicamente, los Ejemplos 15-17.

Electrolitos candidato adecuados incluyen, por ejemplo, Na^+ , K^+ , HCO_3^- , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} y/o Zn^{2+} .

Nutrientes candidato adecuados incluyen aminoácidos esenciales y no esenciales seleccionados de, por ejemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, histidina, tirosina, selenocisteína, alanina, arginina, aspartato, cisteína, glicina, prolina, serina, asparagina y pirrolisina. Los nutrientes candidato adecuados también pueden incluir ácidos grasos, sacáridos (por ejemplo, monosacáridos, di-sacáridos y oligosacáridos), electrolitos y vitaminas.

Los nutrientes candidato también pueden incluir aminoácidos no naturales, tales como, por ejemplo, ornitina, citrulina, hidroxiprolina, homoserina, fenilglicina, taurina, yodotirosina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido ϵ -aminohexanoico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, norleucina, norvalina, sarcosina, homocitrulina, ácido cistéico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina y β -alanina.

En una realización más, la selección de nutrientes y electrolitos también depende de, al menos en parte, las dosis de IR recibidas por el sujeto, fuentes de radiación, la parte del cuerpo que es irradiada, y/o el tiempo que ha transcurrido después de la radiación; el tipo de agentes quimioterapéuticos, la dosis, y/o el tiempo que ha transcurrido después de la quimioterapia; y las dosis de terapia de protones recibida por el sujeto, y/o el tiempo que ha transcurrido después de la terapia de protones.

Los ensayos de cribado objeto pueden realizarse utilizando una combinación de técnicas bien conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, estudios de cámara de Ussing, citología, inmunohistoquímica, transferencias Western, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

experimentos de flujo de iones, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo e inmunocitoquímica.

Específicamente, los ingredientes pueden elegirse basándose en su capacidad para ser absorbidos por la mucosa del intestino delgado del paciente, como se ha determinado por preparaciones de intestino *in situ* o aisladas, usando tecnologías tales como las cámaras de Ussing para medir la capacidad de absorción del intestino delgado para tal ingrediente.

Formulaciones y administración

La invención objeto proporciona composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición objeto y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua. La composición terapéutica también puede comprender excipientes, adyuvantes, aromatizantes, etc., que no afectan la salud o función del epitelio del intestino delgado lesionado, particularmente en la región de las vellosidades y el borde en cepillo. En una realización, la composición terapéutica y todos los ingredientes contenidos en la misma son estériles.

El término “soporte” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin. Tales composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición terapéutica, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo enteral de administración.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes, por ejemplo, compuesto, vehículo, o las composiciones farmacéuticas de la invención.

En una realización, el paquete o kit farmacéutico comprende además instrucciones para la administración, por ejemplo, con respecto a dosis terapéuticas eficaces, y/o el momento de la administración con referencia a, por ejemplo, el tiempo transcurrido desde la exposición a la radiación, quimioterapia o terapia de protones. En una realización, la dosis terapéutica de la composición se determina basándose en el grado de lesión a la mucosa del intestino delgado. Por ejemplo, con respecto a los sujetos que reciben, o están a punto de recibir radiación, la dosis terapéutica de la composición se determina basándose en las fuentes de radiación, la parte del cuerpo que se irradia, y/o el tiempo que ha transcurrido después de la radiación. Con respecto a sujetos que reciben, o están a punto de recibir quimioterapia, la dosis terapéutica de la composición se determina basándose en el tipo de agentes quimioterapéuticos, la dosis de agente quimioterapéutico y/o el tiempo que ha transcurrido después de la quimioterapia. Con respecto a los sujetos que reciben, o están a punto de recibir terapia de protones, la dosis terapéutica de la composición se determina basándose en la dosis de terapia de protones recibida por el sujeto, y/o el tiempo que ha transcurrido después de la terapia de protones.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Animales experimentales

Para estudiar la secreción de HCO_3^- activo, ratones BALB/c macho de 8 semanas de edad, no irradiados e irradiados, se obtuvieron del Instituto Nacional del Cáncer. Los ratones se dividieron al azar en grupos, y se irradiaron los abdómenes según el modelo del síndrome agudo gastrointestinal por radiación (SAR GI) con un Shepherd Mark-I, usando una fuente de ^{137}Cs que suministra irradiación y a 1,84 Gy/min. La radiación se administró como una fracción única. El modelo de SAR GI logrará daño máximo por radiación a tejidos intestinales, e imitará la lesión intestinal durante la radioterapia de tumores pélvicos o abdominales.

Se examinaron los cambios en la corriente de cortocircuito (I_{sc}), tanto en función del tiempo después de la radiación como con dosis crecientes de radiación, para determinar el momento más pronto y la dosis de radiación mínima requerida para producir cambios significativos en I_{sc} . Estos estudios fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Rochester.

Estudios de flujo de iones

Después del desangramiento, se obtuvo el segmento yeyunal excluyendo los 12 cm distales del intestino delgado adyacentes al ciego. Este segmento se lavó y se limpió en solución de Ringer fría en hielo antes de que la mucosa se desprendiera de las capas musculares subyacentes (Zhang, Ameen y col., 2007). La mucosa se montó entre las 2 mitades de una cámara de Ussing tipo Lucite con un área de 0,30 cm^2 (P2304, Physiologic instruments, San Diego, CA 92128, EE.UU.), y se registraron los parámetros eléctricos usando un dispositivo de pinza de voltaje/corriente (VCC MC-8, Physiologic instruments, San Diego, CA 92128 EE.UU.) (Vidyasagar y col., 2005; Vidyasagar y col., 2004; Zhang y col., 2007; Vidyasagar y Ramakrishna 2002). Se bañaron bilateralmente las preparaciones intestinales en solución regular de Ringer (Tabla 1), que contenía 8 mM de glutamina y gaseada con una mezcla de 95 % de oxígeno (O_2) y 5 % de bióxido de carbono (CO_2).

Tabla 1. Composiciones de las soluciones

| Composición iónica | Ringer regular | Libre de HCO_3^- | Solución libre de Na^+ | Solución libre de Cl^- | Libre de HCO_3^- (UB) | Libre de HCO_3^- y Cl^- (UB) |
|---------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|
| Na^+ | 140 | 140 | - | 140 | 140 | 140 |
| Cl^- | 119,8 | 119,8 | 119,8 | - | 119,8 | - |
| K^+ | 5,2 | 5,2 | 5,2 | 5,2 | 5,2 | 5,2 |
| HCO_3^- | 25 | - | 25 | 25 | - | - |
| HPO_4^- | 2,4 | 2,4 | 2,4 | 2,4 | - | - |
| H_2PO_4^- | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | - | - |
| Ca^{2+} | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| Mg^{2+} | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| SO_4^{2-} | - | - | - | 1,2 | 2,4 | 2,4 |
| Gluconato | - | - | - | - | - | - |
| Ciclamida | - | - | - | 1,2 | 0,4 | 5,2 |
| Isetionato | - | 25 | - | 115 | 25 | 140 |
| NMDG | - | - | 140 | - | - | - |
| HEPES | - | - | - | - | 0,1 | 0,1 |

Nota: Los valores están en mM. Se usaron soluciones iónicas para experimentos de sustitución de ion. El pH de todas las soluciones estuvo a 7,4.

Se usó H_2SO_4 para ajustar el pH a 7,4 en solución libre de Cl^- y en todas las otras se usaron HCl.

Abreviaturas: UB, solución sin tampón.

Medición de movimiento de HCO_3^-

Se usó Bi-burette TIM 856 (Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne, Francia) fue utilizada para medir la secreción de HCO_3^- en hojas yeyunales desprendidas (Vidyasagar y col., 2005; Vidyasagar y col., 2004; Zhang y col., 2007). Bombas automáticas mantuvieron un pH constante para la solución luminal por la adición de 0,01 μl de ácido sulfúrico 0,025 M (H_2SO_4). Se estableció la calibración de pH estándar con respecto a stat añadiendo una cantidad conocida de H_2SO_4 a una solución de tampón débil, que contiene una concentración creciente de HCO_3^- para producir una curva de valoración lineal.

Se expusieron tejidos yeyunales a una solución tamponada en el lado del baño (lado serosal), mientras que el lado luminal se expuso a una solución libre de HCO_3^- de bajo tamponamiento (tampón HEPES 0,1 mM (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etanosulfónico), pH 7,4). La secreción de HCO_3^- fue equivalente a la cantidad de ácido añadido a la solución luminal para mantener el pH a 7,4 (o el pH stat). Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones de pinza de voltaje. Se gaseó la solución libre de HCO_3^- con 100 % de O_2 y la solución que contenía HCO_3^- se gaseó con 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 . La secreción de HCO_3^- se expresó como $\mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Vidyasagar y col., 2005; Vidyasagar y col., 2004; Zhang y col., 2007).

Después de que se montara el tejido, las secreciones de HCO_3^- estuvieron inicialmente presentes en ausencia de HCO_3^- del baño, pero cayeron rápidamente hacia 0 en el plazo de 20-30 minutos. Si no estuvo presente HCO_3^- del baño durante la valoración, la secreción de HCO_3^- permaneció próxima a 0. La presencia de HCO_3^- en la solución de baño produjo un rápido aumento en las secreciones de HCO_3^- , que siguió constante durante al menos 2 horas (Vidyasagar y col., 2005; Vidyasagar y col., 2004; Zhang y col., 2007). Cuando se añadieron inhibidores a la solución de la mucosa, se ajustó el pH y se dejó equilibrar durante 30 minutos, hasta que se observó una velocidad estacionaria de secreción de HCO_3^- . Cuando se añadió el inhibidor al lado del baño, el tejido también se equilibró durante 30 minutos para lograr una velocidad estacionaria de secreción de HCO_3^- (véase la Tabla 3).

Todos los experimentos se realizaron durante el periodo de estado estacionario inicial de 1 hora. Se utilizó 1 tejido de cada animal para cada experimento; solo se estudió 1 condición experimental con cada muestra de tejido. Todos los experimentos se repitieron durante al menos 4 veces.

Inmunohistoquímica

Se tiñeron por inmunofluorescencia rebanadas de tejido congeladas de ratones tanto no irradiados como irradiados usando un anticuerpo anti-NBCe1-A/B (Bevensee, Schmitt y col., 2000). NBCe1-A/B es un anticuerpo policlonal producido contra el extremo carboxi, común a ambos cotransportadores de bicarbonato sódico (NBCe1-A y NBCe1-B). El procedimiento de inmunotinción se hizo el día 6 después de la irradiación. Se lavaron tejidos aislados en solución regular de Ringer fría en hielo, se incorporaron en medio de incorporación de secciones congeladas y se pusieron en nitrógeno líquido; se hicieron secciones de 6 μm en criótomo.

Estudios de transferencia Western

Se prepararon lisados yeyunales a partir de raspados de mucosa de ratones no irradiados e irradiados. Los tejidos se analizaron para NKCC1 (Santa Cruz CA, EE.UU.), NBCe1-A/B (Mark Daniel Parker, Case Western Reserve University Medical School, Cleveland, OH) y expresión de la proteína del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (Santa Cruz CA, USA) por transferencias Western (Bevensee y col. 2000).

Se lisaron los raspados de mucosa en un tampón de triacilglicerol hidrolasa que contenía HEPES 25 mM; 10 % de glicerol; y 1 % de Triton X-100 (p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter de polietilenglicol) que contenía una mezcla de inhibidor de proteasa (yodoacetamida 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de leupeptina) a pH 7,4 (Todas las sustancias químicas se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co., EE.UU., a menos que se establezca de otro modo). La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de Bradford. Se analizaron cargas equivalentes de proteínas de muestras irradiadas y no irradiadas usando electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se detectaron las proteínas NKCC1, NBCe1-A/B y CFTR usando anticuerpos policlonales de afinidad purificada.

Estadística

Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó en 2 etapas: 1) se probó la diferencia general usando análisis de la varianza (ANOVA) (o su equivalente no paramétrico Kruskal-Wallis); y 2) se calcularon valores de P ajustados por Bonferroni para todas las comparaciones por pares.

Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos que ilustran los procedimientos para la práctica de la invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de disolventes son en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 - LA IRRADIACIÓN AUMENTA LA SECRECIÓN NETA DE ANIÓN

Este ejemplo muestra que la irradiación aumenta la secreción neta de anión, y causa mayor pérdida de células epiteliales de las vellosidades en comparación con células de la cripta. Específicamente, se obtuvieron tejidos epiteliales del intestino delgado de ratones que recibieron irradiación de 12 Gy y se examinó la secreción del anión usando estudios de cámara de Ussing. Se midió la I_{sc} transepitelial, un indicador de la secreción del anión, en el día 1, 2, 3 y 4.

Como se muestra en la Figura 1A, el máximo aumento en el I_{sc} transepitelial se observó 48 h después de la irradiación, en comparación con tejidos no expuestos a IR y los tejidos expuestos a IR 24 y 72 h después de la irradiación (Fig. 1A). Este aumento significativo en I_{sc} al final de las 48 h indica que la irradiación interrumpe el equilibrio fino entre la absorción y la secreción. En comparación, I_{sc} registrada al final de las 48 h y 72 h es inferior al de tejidos de ratones no IR.

Las secciones de histopatología también mostraron una pérdida más grande de las células epiteliales de las vellosidades en comparación con las células de la cripta debido a la irradiación. Mientras que las secciones de histopatología tomadas antes de 48 h mostraron daño mínimo a las vellosidades y poco o ningún daño a las células de la cripta, las secciones de histopatología tomadas en el día 3 y 4 mostraron un amplio daño en las células de la cripta y de las vellosidades. Particularmente, las células de las vellosidades casi se agotaron completamente después del día 3. También se observó pérdida de células de la cripta, como se demuestra por un fallo para estimular la secreción de anión en respuesta a un estímulo secretor a las 72 y 96 h después de IR (Fig. 1A). A altas dosis de IR, hay células madre de la cripta insuficientes, que maduran y se diferencian para formar células epiteliales de las vellosidades.

La Figura 1B muestra que la irradiación aumentó la conductancia transepitelial (Fig. 1B). La conductancia transepitelial (S), un compuesto de la conductancia transcelular y paracelular, se midió por experimentos de cámara de Ussing.

Basándose en la ley de Ohm $1/S = R$, el aumento en la conductancia transepitelial indica una reducción en la resistencia transepitelial (TER o R). El intestino delgado de ratones tiene baja resistencia epitelial. La resistencia eléctrica de la vía paracelular es mucho más baja que la resistencia transcelular⁶⁵⁻⁶⁷. La vía paracelular y la vía transcelular están en paralelo como se muestra por $1/TER = (1/R_{transcelular}) + (1/R_{paracelular})$; por lo tanto, la TER medida refleja en gran medida la resistencia paracelular.

Ejemplo 2 - LA IRRADIACIÓN CAUSA UN AUMENTO DEPENDIENTE DE LA DOSIS EN LA CORRIENTE DE CORTOCIRCUITO (I_{sc})

Este ejemplo revela que la irradiación causa un aumento dependiente de la dosis en la corriente de cortocircuito, que indica un aumento en la secreción de anión electrogénica. Brevemente, los ratones que recibieron 0, 1, 3, 5, 7, 9 o

12 Gy de irradiación se sacrificaron en el día 4. La Figura 2 mostró aumento significativo en I_{sc} en tejidos de ratones irradiados a 3, 5 y 7 Gy, en comparación con el de aquellos irradiados a 0 y 1 Gy (* $\square\square p < 0,001$). En comparación con los ratones irradiados a 3, 5 y 7 Gy, se observó una disminución de I_{sc} en tejidos de ratones irradiados a 9 y 12 Gy (** $\square\square p < 0,01$, Fig. 2). La irradiación a entre 1 y 3 Gy produjo el aumento más alto en I_{sc} y cambios histopatológicos mínimos.

Además, la irradiación causa cambios en I_{sc} con el tiempo. De los ratones sacrificados en los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, el aumento más alto en I_{sc} se observó en el día 5 y 6 después de IR (Fig. 3A). Para determinar el máximo aumento en I_{sc} en función del tiempo, los ratones se irradiaron a 3 Gy y se sacrificaron en los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 y 14 para registrar los parámetros eléctricos. Kruskal-Wallis ($P < 0,001$). El análisis a posteriori mostró el máximo aumento en I_{sc} en el día 6 después de la irradiación.

Como se muestra en la Figura 3A, I_{sc} registrada en los días 1 y 2 después de la irradiación mostró pocas diferencias estadísticas. Sin embargo, I_{sc} registrada en el tiempo >2 días después de la irradiación mostró diferencias significativas cuando se compara con el día 0 ($^{*}\square\square P < 0,01$). Entre I_{sc} registrada en los días 4, 5, 6 y 7, se observó poca diferencia significativa. I_{sc} registrada en los días 9 y 10 después de la irradiación tampoco fue significativamente diferente de la registrada en el día 7 después de la irradiación ($^{**}\square\square P = NS$). Aunque I_{sc} mostró una disminución significativa más allá del día 6, continuó estando en un nivel elevado en el día 14 e incluso 2 años después de la irradiación en ratones que recibieron IR a 3 Gy ($4,8 \pm 0,5 \mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). La Figura 3A muestra que el aumento máximo en I_{sc} ocurrió en el día 6 en los ratones irradiados a 3 Gy.

El aumento observado en I_{sc} después de la irradiación se debe en gran medida a un aumento neto en la secreción de anión electrogénica. Hay tres posibles mecanismos para el aumento de I_{sc} : 1) aumento de la secreción de anión electrogénica (por ejemplo, Cl^- y/o HCO_3^-); 2) aumento de la absorción de Na^+ electrogénica; o 3) aumento de la absorción de K^+ electrogénica. Es poco probable que la irradiación cause un aumento de proceso de absorción de Na^+ electrogénica en el intestino delgado de ratón. Además, como la irradiación causa diarrea, que produce pérdida de K^+ y no absorción de K^+ , el aumento en I_{sc} no puede ser debido al aumento de la absorción de K^+ .

Ejemplo 3 - DISMINUCIÓN EN LA ABSORCIÓN DE Na^+ Y Cl^-

Este ejemplo muestra que la irradiación disminuye la absorción de Na^+ y Cl^- . Como se muestra en la Tabla 2, los estudios de flujo en la cámara de Ussing usando sustitución de ^{22}Na revelaron que hay una absorción neta de Na^+ en ratones no IR (0 Gy) (Tabla 2), a medida que el flujo mucosal a serosal (J_{ms}) supera al flujo de serosa a mucosa (J_{sm}). La irradiación disminuye J_{ms} de una manera dependiente de la dosis, y produce una disminución de la absorción neta de Na^+ (J_{NetoNa}). J_{sm} supera por mucho J_{ms} a dosis de 7 y 9 Gy, causando secreción neta. Además, muestras de heces de ratones se volvieron sueltas o mal formadas a dosis altas de irradiación, evidenciando además la disminución de la absorción y el aumento de la secreción de electrolitos. Similarmente, la absorción neta de Cl^- también disminuyó a medida que aumentó la dosis de IR. Se observó secreción neta de Cl^- a 9 Gy. La disminución en la absorción de Cl^- fue debida a la disminución en J_{msCl^-} .

Tabla 2 Flujo unidireccional y neto de Na^+ y Cl^- ($J_{\text{Neto}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$)

| Flujo de Na | IR | | |
|-------------|------------|-----------|------------|
| Gy | Jms | Jsm | Jneto |
| 0 | 16,4 ± 0,9 | 7,1 ± 0,8 | 9,8 ± 0,8 |
| 1 | 15,6 ± 1 | 7,1 ± 1,1 | 8,6 ± 0,9 |
| 3 | 6,8 ± 0,7 | 3,5 ± 0,3 | 2,6 ± 0,5 |
| 5 | 5,2 ± 0,6 | 4,8 ± 0,4 | 0,4 ± 0,2 |
| 7 | 4,8 ± 0,4 | 5,4 ± 0,4 | -0,6 ± 0,3 |
| 9 | 4,3 ± 0,7 | 4,7 ± 0,6 | -0,4 ± 0,2 |

| Flujo de Cl | IR | | |
|-------------|------------|------------|------------|
| Gy | Jms | Jsm | Jneto |
| 0 | 17,3 ± 1,1 | 7,1 ± 0,6 | 10,2 ± 0,8 |
| 1 | 12,8 ± 0,9 | 7,6 ± 1,3 | 5,2 ± 0,9 |
| 3 | 16,8 ± 0,7 | 9,3 ± 0,8 | 7,5 ± 0,8 |
| 5 | 14,2 ± 1,2 | 10,3 ± 0,9 | 3,9 ± 0,7 |
| 7 | 7,1 ± 0,5 | 6,9 ± 0,3 | 0,3 ± 0,2 |
| 9 | -9,2 ± 0,8 | 0,1 ± 0,1 | -9,3 ± 0,9 |

Ejemplo 4 - LA IRRADIACIÓN CAUSA PERMEABILIDAD PARACELULAR ELEVADA

Este ejemplo muestra que la irradiación produce la pérdida de mucosa del revestimiento del intestino delgado, conduciendo a función alterada de la barrera del intestino delgado. Este aumento de la permeabilidad del intestino delgado da a las bacterias comensales intestinales, péptidos y toxinas acceso más fácil a los compartimentos sistémicos, causando así la endotoxemia. Como se muestra en la Figura 4A, la irradiación aumenta los niveles de endotoxina en plasma como se mide por el kit de lisado de amebocito de *Tachypleus*.

La irradiación también aumentó la permeabilidad de Cl^- y Na^+ (PCI/PNa), como se indica por los cambios del potencial de dilución determinado en estudios de la cámara de Ussing. El uso del potencial de dilución como el indicador de la permeabilidad de membrana se basa en los siguientes principios. Específicamente, una membrana semipermeable intacta, tal como la mucosa del intestino delgado, mantiene el gradiente del potencial electroquímico artificialmente generado por baño de las soluciones del lado mucosal y serosal con fuerza iónica diferente. Una

membrana permeable que permite la fácil difusión a través de la membrana, sin embargo, tiene un potencial electroquímico de membrana disminuido. Así, cuanto más alta sea la permeabilidad a través de la membrana, más bajo es el gradiente de potencial. Una membrana libremente permeable tiene una permeabilidad relativa de Cl^- y Na^+ (PCI/PNa) a 1, que indica una pérdida completa de selectividad.

En ratones no IR, se conserva la selectividad de la membrana y el Na^+ es más permeable que el Cl^- a través de la membrana. La irradiación disminuyó el potencial de dilución de la membrana. Particularmente, el Na^+ y el Cl^- se volvieron igual de permeables a través de la membrana a 7 Gy, que indica una pérdida significativa de selectividad (Fig. 4B). El aumento en la permeabilidad de electrolito debido a irradiación está de acuerdo con el aumento en los niveles de endotoxina en plasma mostrados en la Fig. 4A. Puede usarse la monitorización de los cambios en la permeabilidad de membrana como herramienta sensible para monitorizar la mejora en la función de la barrera de la mucosa por la dieta de radiación oral objeto.

Ejemplo 5 - AUMENTO EN LOS NIVELES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS DEBIDO A IRRADIACIÓN

Se midieron los niveles de mediadores inflamatorios en ratones expuestos a IR y no expuestos a IR usando técnicas de matrices de perlas LUMINEX multiplex. Como se muestra en la Figura 5, la irradiación aumentó la producción de $\text{IL1-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{MIP-}\alpha$ (Fig. 5).

Ejemplo 6 - LA DISMINUCIÓN EN LA SECRECIÓN DE ANIÓN DEBIDO A LA IRRADIACIÓN ES DEPENDIENTE DE NKCC1 Y DEPENDIENTE DE CFTR

Este ejemplo muestra que la secreción de anión bajo irradiación es dependiente de NKCC1 y dependiente de CFTR. Para determinar la contribución de NKCC1 a I_{sc} basal, se añadió bumetanida 100 μM (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) a la solución de baño. La Figura 3C mostró una corriente inhibitoria de bumetanida en tejidos irradiados ($5,5 \pm 0,5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,6 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$), pero no en ratones a 0 Gy ($1,6 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,9 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Además, la estimulación con AMPc causó un aumento en I_{sc} en tanto ratones irradiados a 0 Gy ($1,6 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $6,9 \pm 0,6 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, $P < 0,001$) como a 3 Gy ($5,5 \pm 0,5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $7,3 \pm 0,5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, $P < 0,05$).

Además, la I_{sc} estimulada con forskolina (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) se redujo por bumetanida en 3 Gy ($7,3 \pm 0,5 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,4 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$), pero no en 0 Gy ($6,9 \pm 0,6 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $1,3 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Esto indica mayor secreción de anión independiente de NKCC1 sin irradiación ($P < 0,05$).

Los resultados también mostraron que la secreción de anión bajo irradiación es dependiente de CFTR. Para determinar si la porción insensible a bumetanida de I_{sc} ocurre a través de un canal de anión de membrana apical, se aplicaron un bloqueante de canales de aniones no específico, ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) (NPPB 10 μM) y un bloqueante del regulador de la conductancia transmembrana específico de fibrosis quística (CFTR) (glibenclamida 100 μM , Sigma-Aldrich Co., EE.UU.). Se suprimió la I_{sc} insensible a bumetanida en ratones a 0 Gy por la adición a la mucosa de un bloqueante de canales de aniones no específico (NPPB) ($0,1 \pm 0,01 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) y glibenclamida ($0,1 \pm 0,01 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Esto indica que la secreción de anión ocurre a través de un canal de anión o CFTR (Fig. 3B).

Ejemplo 7 - DISMINUCIÓN EN LA SECRECIÓN DE HCO_3^- DEBIDO A IRRADIACIÓN

La diarrea infecciosa, tal como el cólera, produce la pérdida de líquido rico en HCO_3^- en heces y conduce a acidosis metabólica. Este ejemplo muestra que, a diferencia de la diarrea infecciosa, la IR indujo un aumento de la secreción de Cl^- y disminución de la secreción de HCO_3^- .

Para determinar la contribución de Cl^- a la secreción neta de anión, se empleó un bloqueante para la captación de Cl^- en la célula (bloqueante del cotransporte de Na-K-2Cl). La adición de bumetanida 10 μM suprimió casi toda la I_{sc} asociada a IR, sugiriendo que la secreción de anión inducida por IR es principalmente debido al aumento de la secreción de Cl^- y tal aumento es dependiente de NKCC1 (Fig. 3A-C).

Los experimentos de pH stat confirmaron que la IR redujo la secreción de HCO_3^- (Tabla 3). La secreción de HCO_3^- se suprimió cuando el Na^+ en la solución de baño serosal (baño) se sustituyó con un catión impermeable NMDG, que indica que el transporte de HCO_3^- en la célula en la membrana basolateral es dependiente del Na^+ del baño. Se repitieron experimentos similares en ratones a 5 Gy, día 6 después de IR. En presencia de Na^+ del baño, la secreción de HCO_3^- fue significativamente más baja.

Se realizó la tinción de inmunofluorescencia de rebanadas de tejidos congelados obtenidos de tanto ratones IR como no IR usando anticuerpos NBCe1a/b (Figs. 6B-E). La tinción específica de anticuerpos NBCe1a/b mostró que NBCe1a/b se expresó en las células epiteliales de las vellosidades, pero no en las células de la cripta. La inmunotinción de tejidos de ratones IR mostró que los anticuerpos NBCe1a/b no fueron reconocidos ni en las vellosidades ni en la cripta. Los tejidos de ratones irradiados con 3 Gy (IR) dejaron de expresar el patrón de tinción específico de NBCe1-A/B tanto en las vellosidades como en la cripta. La disminución de la función secretora de HCO_3^- a altas dosis de IR es debido a la pérdida de células epiteliales de las vellosidades. El monitorizar los cambios en la secreción de Na^+ y HCO_3^- puede ser una herramienta sensible para monitorizar la mejora de la función de

barrera de la mucosa por la dieta de radiación oral del sujeto.

La secreción de HCO_3^- bajo irradiación es independiente de NKCC

Para determinar si HCO_3^- contribuyó a la secreción de anión, se realizaron experimentos en ausencia de Cl^- del baño. Se consideró que un aumento en I_{sc} secundario a la irradiación o estimulación con forskolina era contribuido por HCO_3^- . Los resultados mostraron que la secreción de HCO_3^- bajo irradiación no es dependiente del Cl^- del baño; por tanto, bajo irradiación, la secreción de HCO_3^- no implica al transportador de intercambio Cl^- - HCO_3^- (AE1) en la membrana apical. En solución libre de Cl^- , la I_{sc} basal ($1,0 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,3 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$; $P = \text{ns}$) y estimulada con forskolina ($1,7 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,3 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$; $P < 0,001$) fue más baja en ratones irradiados con 3 Gy (Fig. 3D). La I_{sc} estimulada con forskolina fue más alta en 0 Gy que en 3 Gy ($P < 0,001$), que indica una disminución en la secreción de HCO_3^- debido a irradiación.

Para determinar si NKCC1 medió en el movimiento de HCO_3^- bajo condiciones basales y estimuladas por forskolina, se añadió bumetanida al lado del baño de tejidos equilibrados en solución libre de Cl^- en ambos lados. Los resultados mostraron que la bumetanida no inhibió el aumento basal y estimulado por forskolina en I_{sc} ; esta ausencia de inhibición indica un mecanismo independiente de NKCC1 para la captación de HCO_3^- en la membrana basolateral.

La secreción de HCO_3^- bajo irradiación es independiente del Cl^- de la luz

La medición directa de la secreción de HCO_3^- en ratones irradiados mostró la secreción de HCO_3^- reducida en comparación con ratones no irradiados ($0,8 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $6,7 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). La secreción de HCO_3^- en ratones irradiados no se alteró por la eliminación de Cl^- de la luz (Tabla 3). La adición a la mucosa de NPPB ($0,2 \pm 0,01 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) y glibenclamida ($0,11 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$), pero no DIDS, terminó la secreción de HCO_3^- en ratones irradiados. Esto indica que la secreción de HCO_3^- está mediada por un canal de aniones (canal CFTR), no a través del intercambio Cl^- - HCO_3^- (Fig. 19B).

En comparación, la secreción de HCO_3^- en ratones no irradiados es tanto dependiente del Cl^- como independiente del Cl^- de la luz. Mediciones eléctricas transepiteliales indicaron la secreción de HCO_3^- electrogénica; sin embargo, esto no indica si la secreción de HCO_3^- estaba mediada por canal y/o a través de Cl^- - HCO_3^- electroneutro.

Se realizaron experimentos de pH stat en ausencia de Cl^- de la luz para estudiar el intercambio Cl^- - HCO_3^- en ratones no irradiados. En una solución libre de Cl^- de la luz, las secreciones de HCO_3^- fueron más bajas ($4,5 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, $P < 0,01$). Esto indica que la secreción de HCO_3^- basal en ratones no irradiados es parcialmente dependiente del Cl^- y parcialmente independiente del Cl^- de la luz (Tabla 3). La adición de ácido 4,4-diisotiociano-2,2'-estilbenodisulfónico (DIDS) 100 μM (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) inhibió parcialmente la secreción de HCO_3^- ($P < 0,001$), y tal inhibición fue similar a la observada con la eliminación de Cl^- de la luz.

Secreción de HCO_3^- independiente de Cl^- de la luz estimulada con forskolina

Para ratones a 0 Gy, la adición de forskolina a la solución de baño mostró aumentos significativos en la secreción de HCO_3^- basal ($P < 0,001$) que no se alteró por la eliminación de Cl^- de la luz ($8,4 \pm 0,4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $8,7 \pm 0,4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$; $n = 6$). NPPB suprimió la secreción de HCO_3^- estimulada por forskolina ($0,2 \pm 0,01 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$; $n = 6$); esto indicó una función para un canal de aniones en secreción de HCO_3^- estimulada por AMPc.

La secreción de HCO_3^- estimulada por AMPc es independiente de NKCC1

Para determinar si la secreción de HCO_3^- estimulada por AMPc requirió un canal CFTR apical, se añadió glibenclamida al lado luminal. La glibenclamida inhibió ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) la secreción de HCO_3^- (Tabla 3 y Fig. 19A), que indica que AMPc no solo inhibe el componente de intercambio Cl^- - HCO_3^- basal de la secreción de HCO_3^- neta, sino que también induce una secreción de HCO_3^- mediada por canal de aniones apical. La estimulación con forskolina en ratones irradiados mostró poco aumento en comparación con la secreción de HCO_3^- basal ($0,6 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,78 \pm 0,2 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Esto también indica una secreción de HCO_3^- independiente del Cl^- de la luz o la inhibición del intercambio Cl^- - HCO_3^- .

Las mediciones eléctricas transepiteliales mostraron que la disminución en el movimiento de HCO_3^- fue independiente de NKCC1. La secreción de HCO_3^- , que fue mínima en ratones irradiados bajo tanto condiciones basales como estimuladas con forskolina, no se vio afectada por la adición de bumetanida (Tabla 3). Similarmente, en ratones no irradiados, la bumetanida no alteró la secreción de HCO_3^- estimulada con forskolina, que indica que la secreción de HCO_3^- estimulada con AMPc es independiente de NKCC1 ($8,4 \pm 0,4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $8,6 \pm 0,4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) (Tabla 3 y Fig. 3B).

La secreción de HCO_3^- es independiente del Cl^- del baño

Los procesos de transporte que requieren el Cl^- del baño para la captación de HCO_3^- basolateral se muestran en la Figura 3B. Los resultados mostraron que la bumetanida no alteró la secreción de HCO_3^- estimulada por AMPc. Esto indicó que el transportador de intercambio de Cl^- - HCO_3^- (AE2) se inhibe bajo irradiación. La eliminación del Cl^- del

baño también puede inhibir NKCC1 y la captación de HCO_3^- asociada a AE2 (Tabla 3). La eliminación de Cl^- de la solución de baño no alteró la secreción de HCO_3^- ($6,7 \pm 0,3 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $7,1 \pm 0,6 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$).

La secreción de HCO_3^- es dependiente del Na^+ del baño

Los procesos de transporte para la entrada de HCO_3^- basolateral acoplado a Na^+ se muestran en la Figura 3B. Las Figuras 3C y 3D indicaron que NKCC1 no afecta la secreción de HCO_3^- . La adición de 3-metilsulfonil-4-piperidinobenzoilo, clorhidrato de guanidina (HOE694) 1 mM al lado del baño eliminó la captación de HCO_3^- a través del NHE1 acoplado al intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Counillon, Scholz y col., (1993) también describieron que 3-metilsulfonil-4-piperidinobenzoilo, clorhidrato de guanidina (HOE694) 1 mM podría inhibir el intercambio Na^+/H^+ (NHE1).

HOE694 no inhibió la secreción de HCO_3^- estimulada por AMPc ($8,4 \pm 0,4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $7,2 \pm 0,9 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). La sustitución del Na^+ del baño con N-metil-D-glucamina (NMDG) suprimió la secreción de HCO_3^- estimulada con forskolina ($8,4 \pm 0,4 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ frente a $0,3 \pm 0,01 \mu\text{eq.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) en ratones no irradiados, que indica un cotransporte de HCO_3^- acoplado a Na^+ (NBC) (Fig. 3E).

Tabla 3. Secreción de HCO_3^- medida en el yeyuno de ratones no irradiados (0 Gy) e irradiados (3 Gy).

| Solución de la luz | Que contiene Cl^- | Libre de Cl^- | DIDS 100 μM | Glibenclamida 100 μM |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 0 Gy | $6,7 \pm 0,3$ | $4,5 \pm 0,1^\ddagger$ | $4,4 \pm 0,1^\ddagger$ | $0,5 \pm 0,1$ |
| 3 Gy | $0,8 \pm 0,2^*$ | $0,6 \pm 0,1^{\text{ns}}$ | $0,9 \pm 0,2^{\text{ns}}$ | $0,1 \pm 0,1^{\text{ns}}$ |
| 0 Gy + forskolina | $8,4 \pm 0,4$ | $8,7 \pm 0,4$ | - | $0,1 \pm 0,1$ |
| 3 Gy + forskolina | $0,6 \pm 0,2$ | $0,9 \pm 0,2$ | - | - |
| 0 Gy + bumetanida | $8,6 \pm 0,4$ | $8,4 \pm 0,4$ | $7,7 \pm 0,4$ | $0,5 \pm 0,1$ |
| 3 Gy + bumetanida | $0,8 \pm 0,14^*$ | $0,8 \pm 0,1^{\text{ns}}$ | $0,7 \pm 0,12^{\text{ns}}$ | $0,2 \pm 0,1^{\text{ns}}$ |

Nota: Los valores representan la media \pm EEM $n = 6$ tejidos. * $p < 0,001$, comparación entre el grupo de 0 Gy y 3 Gy. $^\ddagger p < 0,001$ comparación entre los grupos de presencia. En los experimentos de bumetanida en ratones no irradiados, los tejidos se trataron con forskolina 10 mM.

Abreviaturas: ns, sin significancia entre los grupos; ácido 4,4-diisotiociano-2,2'-estilbenodisulfónico, DIDS

Para la secreción de HCO_3^- activa en la membrana apical, existe la necesidad de su captación basolateral. Cuatro mecanismos de intercambio conocidos directa o indirectamente implicados con el movimiento de HCO_3^- en la membrana basolateral son: 1) co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2HCO}_3^-$) como un posible transportador de HCO_3^- ; 2) la captación de Cl^- en la célula a través de NKCC1 se recircula mediante el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolateral (AE2), que produce la captación de HCO_3^- neta en la membrana basolateral; 3) intercambio de Na^+/H^+ que extruye protones en el espacio intercelular, produciendo concentración de HCO_3^- intracelular reducida, que entonces estimula el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ electroneuro apical; y 4) co-transporte de HCO_3^- acoplado a Na^+ . Estos transportadores pueden funcionar como electroneutros o electrogénicos, dependiendo del número de moléculas de HCO_3^- transportadas por molécula de Na^+ (Fig. 3B).

En ratones no irradiados, la captación de HCO_3^- se produce mediante un cotransportador de HCO_3^- acoplado a Na^+ (NBCe1-A/B) situado en la superficie basolateral. La salida apical se produce mediante un intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ electroneuro que se acopla a un intercambio Na^+/H^+ y mediante CFTR (secreción de anión electrogénica). Un aumento en el AMPc intracelular, logrado mediante la adición de forskolina, produce elevada secreción de Cl^- y de HCO_3^- con inhibición simultánea de la absorción de Na^+ y Cl^- electroneuro (intercambio Na^+/H^+ acoplado a intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$). La captación de Cl^- se produce mediante NKCC1, y la captación de HCO_3^- se produce mediante NBCe1-A/B; tanto el Cl^- como el HCO_3^- salen mediante CFTR en la superficie apical.

Según la invención objeto, se ha descubierto que la irradiación inhibe la absorción de Na^+ y Cl^- electroneuro. La irradiación también inhibe NBCe1-A/B, y tal inhibición produce la disminución de la captación de HCO_3^- en la membrana basolateral y finalmente su salida en la membrana apical. Así, la irradiación produce la secreción de Cl^- electrogénica con inhibición selectiva de tanto la secreción de HCO_3^- electroneutra como electrogénica (Fig. 19B).

La irradiación causó un aumento en la expresión de la proteína NKCC-1 y una disminución de la expresión de NBCe1-A/B en los tejidos epiteliales del intestino delgado. La irradiación también inhibe el transportador de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical (AE1). La secreción de HCO_3^- en la diarrea por radiación es dependiente de Na^+ , pero independiente del Cl^- de la luz e independiente de NKCC-1. El transporte de Cl^- bajo irradiación implica al transportador NKCC-1 basolateral, en lugar de un transportador de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE1).

Como se muestra en la Figura 19B, la irradiación también altera el transporte de electrolitos (tales como HCO_3^- y Cl^-) en el tubo gastrointestinal. Los ratones irradiados presentaron principalmente secreción de Cl^- , y mínima secreción de HCO_3^- . Se propone que la mínima secreción de HCO_3^- debida a irradiación se produce por la inhibición de la absorción de HCO_3^- . A diferencia, hay Cl^- activo, además de la secreción de HCO_3^- en la diarrea inducida por

secretagogo.

Ejemplo 8 - LA IRRADIACIÓN CAUSA ABSORCIÓN DE GLUCOSA REDUCIDA

Este ejemplo muestra que en enteritis inducida por IR, hay una disminución dependiente de la dosis en la absorción de glucosa. Además, la presencia de glucosa no absorbida en la luz intestinal puede conducir a diarrea osmótica, deteriorando además las condiciones diarreicas asociadas a IR. La Figura 7A muestra que la irradiación causa una disminución dependiente de la dosis en I_{sc} . La Figura 7B muestra que la irradiación aumenta K_m en el transporte de glucosa en una manera dependiente de la dosis.

SGLT1 es un transportador versátil. SGLT1 mantiene su función en la diarrea infecciosa, tal como el cólera. Se ha usado la conservación de la función de SGLT1 en la diarrea infecciosa en la terapia de rehidratación oral para absorción de Na^+ .

Para investigar la función de SGLT-1 y su efecto sobre la absorción de glucosa después de la irradiación, se obtuvo mucosa de intestino delgado de ratones Swiss en el día 6 después de la exposición IR a 0, 1, 3, 5 o 7 Gy. Se midió la corriente de cortocircuito estimulada por glucosa (I_{sc}) en una cámara de Ussing para estudiar la función de transporte de SGLT1. Se llevaron a cabo estudios de supervivencia en ratones TBI a 9 Gy y sub-TBI a 15,6.

Específicamente, se sometieron ratones Balb/c de 8 semanas de edad obtenidos de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) a irradiación subtotal del cuerpo a ^{137}Cs (sub-TBI) (se protegió una pata de la irradiación) e irradiación total del cuerpo (TBI).

En estudios de supervivencia de animales, se separaron ratones en 2 grupos: TBI de 9 Gy y sub-TBI de 15,6 Gy. Los ratones de control se trataron con solución salina normal; otros se trataron con 5 % de glucosa. Se usó sonda nasogástrica durante el experimento, y los tratamientos se administraron en los primeros 5 días después de la irradiación y cada dos días hasta 10 días después de la irradiación.

Se empleó una pinza de voltaje/corriente multicanal (Physiological Instruments, San Diego, CA) en el estudio de la cámara de Ussing. Se bañaron secciones yeyunales de ratones, que se usaron para el montaje, en solución de Ringer regular modificada, y se gasearon con 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 para medir la I_{sc} de corto. Todos los ratones se sacrificaron 6 días después de la irradiación.

Para investigar la cinética de SGLT-1, la concentración de sustrato (glucosa) empezó a 0,05 mM y terminó a 10 mM. La glucosa se añadió a una tasa a partir de 0,05 mM y progresó a 0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM. Los resultados se analizaron con el software Origin 8 (OriginLab Corp., Northampton, MA). La I_{sc} se representó en el eje y, y la concentración de glucosa se representó en el eje x. La curva se ajustó en la ecuación de Hill.

Para preparar lisados de células completas yeyunales, se lisaron raspados de la mucosa de ratones normales e irradiados en tampón triacilglicerol hidrolasa que contenía HEPES 25 mM, 10 % de glicerol, 1 % de Triton X-100, y una mezcla de inhibidor de proteasa (yodoacetamida 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 2 μg ml⁻¹ de leupeptina, pH 7,4).

Para preparar lisados de vesículas de membrana del borde en cepillo, se homogeneizaron raspados de la mucosa de ratones normales e irradiados en una solución de Tris-HCl 2 mM (pH 7,1) / KCl 50 mM / PMSF 1 M. Las muestras se centrifugaron con una centrifuga a 8000 rpm y otra vez a 13.000 rpm, respectivamente, y entonces se homogeneizaron otra vez con una jeringa de turberculina (aguja 27G) y homogeneizador de TEFLON. Las muestras se centrifugaron entonces a 4.000 rpm y otra vez a 15.000 rpm. La muestra se resuspendió con una mezcla de inhibidor de la proteasa (yodoacetamida 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 2 μg ml⁻¹ de leupeptina, pH 7,4) que contenía la solución de Ringer regular.

Se analizaron ambas concentraciones de proteína de los lisados de células completas yeyunales y vesículas de membrana del borde en cepillo para proteína SGLT-1 por transferencias Western. Se analizaron cargas equivalentes de proteína de muestras irradiadas y de control por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron sobre membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), y se detectaron proteínas SGLT-1 usando anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Los resultados, como se muestra en las Figuras 8-14, demuestran que: 1) la irradiación reduce la I_{sc} estimulada por glucosa de una manera dependiente de la dosis; 2) los valores de K_m para glucosa fueron (mM) $0,38 \pm 0,04$, $0,49 \pm 0,06$, $1,76 \pm 0,16$, $1,91 \pm 0,3$, $2,32 \pm 0,4$ en 0, 1, 3, 5 y 7 Gy, respectivamente; 3) los valores de $V_{m\acute{a}x}$ para glucosa fueron $387,4 \pm 16,2$, $306,6 \pm 16,4$, $273,2 \pm 14,9$, $212,9 \pm 9,14$, $188,1 \pm 9,12$ en 0, 1, 3, 5 y 7 Gy, respectivamente; 4) los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ volvieron a los niveles normales aproximadamente 14 días después de IR; 5) el retener la captación de glucosa durante los primeros 10 días después de la irradiación aumentó la supervivencia; 6) el análisis de transferencia Western de la membrana de borde en cepillo de SGLT-1 mostró elevados niveles de proteína SGLT-1 a medida que aumentó la dosis de IR.

El aumento en K_m de SGLT-1 indica una disminución en la afinidad de SGLT-1 por la glucosa debido a la irradiación. La disminución en $V_{m\acute{a}x}$ indica la pérdida de células epiteliales de las vellosidades debido a la irradiación, como

también se demuestra por los exámenes histopatológicos. El aumento en los niveles de proteína en tejidos de ratones tratados con IR, como se muestra en el análisis de transferencia Western, indica que los transportadores de SGLT1 se expresan pero no son funcionales.

- 5 Los resultados también demuestran que la alimentación oral de glucosa produce malabsorción de glucosa y electrolitos, que conduce a diarrea osmótica y, así, aumenta la toxicidad GI inducida por IR. A diferencia, el retener la glucosa de la alimentación oral durante los primeros 14 días después de IR previene o mitiga los síntomas de la diarrea y aumenta la supervivencia global.

Ejemplo 9 - LA IRRADIACIÓN CAUSA TRANSPORTE DE GLUTAMINA REDUCIDO

- 10 Aunque la glutamina es un aminoácido no esencial, es el nutriente primario de los enterocitos, y está presente en altas concentraciones en plasma (26 %) y en músculo esquelético (75 %). Los niveles de glutamina disminuyen en el traumatismo posoperatorio, o pacientes críticos a medida que aumenta la demanda del cuerpo para glutamina. Así, la glutamina ha sido considerada como importante en el funcionamiento normal de los sistemas digestivo, renal, inmunitario y neuronal.

- 15 Este ejemplo muestra que la irradiación causa una disminución dependiente de la dosis en el transporte de glutamina en las células. A $IR \geq 7$ Gy, la glutamina llega a estar presente en gran parte en la luz intestinal, conduciendo así a diarrea osmótica. La cinética de saturación del transportador de glutamina mostró un aumento dependiente de la dosis de IR en K_m (Fig. 15), sugiriendo una disminución de la afinidad de transportadores de glutamina por glutamina.

Ejemplo 10 - LA IRRADIACIÓN CAUSA UN AUMENTO DEPENDIENTE DE LA DOSIS EN EL TRANSPORTE DE LISINA

- 20 La adición de lisina al lado de la luz del intestino delgado causa un aumento en I_{sc} , sugiriendo el transporte electrogénico de lisina (Fig. 16). Los tejidos de ratones no IR mostraron una K_m de $1,16 \pm 0,04$ mM, mientras que los tejidos de 3 Gy de IR tuvieron una K_m de $0,27 \pm 0,01$ mM. A diferencia de la glucosa y la glutamina, los resultados mostraron que la irradiación aumentó la afinidad del transportador de lisina por lisina, y así aumentó la absorción de lisina.

Ejemplo 11 - EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN ORAL DE LISINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE RATONES

Este ejemplo muestra que retener nutrientes no absorbidos de la alimentación oral mientras se absorben selectivamente nutrientes de la alimentación previene o mitiga la diarrea y aumenta la supervivencia después de la irradiación.

- 30 En la primera serie de experimentos, se administró por vía oral glucosa (10 mM i/m durante 5 días y luego cada día alterno) a ratones de IR. Los resultados muestran que la administración de glucosa disminuyó la supervivencia global (Fig. 17B). En comparación, se administró por vía oral lisina (20 mg/ratones/día) a ratones de IR durante 5 días y a partir de aquí cada dos días como lavado gástrico. Los ratones tratados con lisina mostraron un aumento de la supervivencia cuando se comparó con grupos de control (Fig. 17A). Así, el reducir o limitar la ingesta oral de nutrientes no absorbidos tales como glucosa con un aumento de la ingesta oral de nutrientes absorbidos tales como lisina pueden prolongar la supervivencia en pacientes irradiados.

Ejemplo 12 - CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA DE TRANSPORTE DE IONES DEBIDO A IRRADIACIÓN

Este ejemplo ilustra cambios en los niveles de expresión de la proteína de transporte debido a irradiación.

- 40 Específicamente, se recogieron tejidos para transferencia Western en el día 6 después de la irradiación. La transferencia Western de tejidos ileales, como se muestra en la Figura 18, reveló que la irradiación de 1-5 Gy produjo elevados niveles de proteína NKCC1; mientras que tal aumento en la expresión de NKCC1 disminuyó en tejidos que recibieron 7 Gy de IR, en comparación con tejidos que recibieron 1-5 Gy de IR (A).

- 45 Los niveles de proteína NBCe1-A/B disminuyeron apreciablemente después de la irradiación, incluso a una dosis de tan solo 1 Gy (B). Los niveles de proteína CFTR en tejidos de yeyuno aumentaron significativamente después de 3 Gy de irradiación, en comparación con tejidos de yeyuno a 0 Gy (C). Los anticuerpos específicos NBCe1-A/B mostraron elevados niveles de expresión en el yeyuno en comparación con el duodeno, íleon y colon en ratones no irradiados (D). Los tejidos de yeyuno tuvieron los niveles de proteína NBCe1-A/B más altos, en comparación con aquellos en duodeno, íleon o colon (D). Los cambios en los niveles de proteína de transporte se corresponden con los cambios funcionales observados después de IR. El patrón de expresión de las proteínas de transporte después de la irradiación, en comparación con el de tejidos no IR, puede usarse para monitorizar la eficacia de la dieta oral de radiación.

Ejemplo 13 - CAMBIOS EN LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE NUTRIENTES Y ELECTROLITOS EN RATONES CON LESIÓN A LA MUCOSA DEL INTESTINO DELGADO

Se observa un patrón similar de alteraciones en la capacidad de absorción del intestino delgado en ratones C57BL/6 tratados con radiación, quimioterapia, y que padecen inflamación en el intestino delgado. El modelo de radiación se construye como se describe en los Ejemplos 1-12.

5 En un modelo de quimioterapia, todos los ratones se inyectan con una dosis única de 5-FU o cisplatino. En algunos ratones, tres días después de la primera inyección, se inyecta una segunda dosis de 5-FU o cisplatino. Después de cada inyección, se mide la I_{sc} transepitelial, un indicador de secreción neta de anión, usando una cámara de Ussing, en momentos de tiempo como se indica en la Figura 20. Para cada medición, se examina un mínimo de 32 tejidos.

10 Los resultados muestran que hay un aumento significativo en la secreción neta de anión en el día 3 en ratones inyectados con una dosis única de cisplatino (Fig. 20B) o 5-FU (Fig. 20A). Por tanto, ratones inyectados con una segunda dosis del agente quimioterapéutico presentan un aumento significativamente más alto en la secreción neta de anión que la de ratones que reciben una dosis única.

15 En un modelo de la enfermedad de Crohn, los ratones se inyectan con mAb anti-CD3 (modelo inflamatorio agudo para imitar las condiciones de la enfermedad de Crohn). También hay un aumento significativo en la secreción neta de anión (determinado basándose en la conductancia paracelular) y la permeabilidad paracelular del intestino delgado. Por tanto, se observan alteraciones en la capacidad de absorción de nutrientes y electrolitos.

20 Las alteraciones de la capacidad de absorción de nutrientes se determinan usando modelos de enfermedad con lesión a la mucosa del intestino delgado, es decir, el modelo de radiación, modelo de quimioterapia y modelo de enfermedad de Crohn. Específicamente, se administra por vía oral un nutriente candidato para controlar ratones y ratones que recibieron irradiación, quimioterapia y mAb anti-CD3, respectivamente. Además, se administran por vía oral composiciones que contienen diversas combinaciones de los nutrientes candidatos.

Los nutrientes candidato están seleccionados de lisina, histidina, valina, leucina, fenilalanina, cisteína, tirosina, arginina, isoleucina, treonina, glicina, alanina, metionina, triptófano, prolina, serina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico y glucosa.

25 Para determinar la capacidad de absorción de cada nutriente, se realizan mediciones bioeléctricas usando una cámara de Ussing. Las mediciones incluyen: a) la corriente de aminoácido acoplado a sodio (I_{sc}) y cambios en la conductancia, b) cambios en la cinética de saturación de cada nutriente y cambios en la I_{sc} después de la administración de cada nutriente; y c) los estudios de absorción de electrolito usando estudios de flujo de isótopo en presencia y ausencia del nutriente candidato específico. Los resultados muestran que, en el modelo de radiación, modelo de quimioterapia y modelo de enfermedad de Crohn, hay un patrón similar de alteraciones en la capacidad
30 de absorción para todos los aminoácidos investigados y la glucosa. Específicamente, los resultados muestran que la administración por vía oral de cada uno de los siguientes aminoácidos seleccionados de lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina y serina mejora la curación del intestino delgado, reduce la conductancia paracelular (mejorándose así el mecanismo de barrera de la mucosa del intestino delgado), aumenta la absorción de electrolitos y/o mejora la supervivencia en animales. Los resultados también muestran que
35 la administración por vía oral de glucosa y/o glutamina altera la barrera de mucosa del intestino delgado, y tiene efectos adversos sobre la supervivencia de los ratones en el modelo de radiación, modelo de quimioterapia y modelo de enfermedad de Crohn.

Ejemplo 14 - MEJORA DE LA FUNCIÓN DEL INTESTINO DELGADO EN RATONES QUE HAN RECIBIDO QUIMIOTERAPIA

40 Este ejemplo muestra que la composición terapéutica de la invención objeto mejora la curación del intestino delgado de ratones que han recibido quimioterapia. De todos los fármacos de quimioterapia estudiados, el 5-FU muestra la máxima toxicidad al intestino delgado. Por tanto, se usa el 5-FU para caracterizar las alteraciones del transporte de electrolitos y nutrientes en el modelo de quimioterapia.

45 Se inyectaron ratones NIH Swiss con 5-FU. Cinco o seis días después de la inyección, se aislaron los tejidos intestinales de los ratones y se estudiaron en una cámara de Ussing, exponiendo a tanto soluciones de Ringer como a la composición terapéutica de la invención objeto. La composición terapéutica contiene lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina y serina; agua; y vehículos, electrolitos y agentes de tamponamiento terapéuticamente aceptables. La composición terapéutica es ligeramente alcalina (pH 7,4). La composición terapéutica no contiene glucosa, glutamina o metionina.

50 Los resultados muestran que la composición terapéutica mejora significativamente la función del intestino delgado de ratones que han recibido 5-FU. Específicamente, la composición terapéutica reduce significativamente el aumento patológico en la I_{sc} transepitelial (Fig. 21A) y la conductancia transepitelial en el intestino delgado de los ratones inyectados con 5-FU.

Ejemplo 15 - DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA FUNCIÓN GI DEBIDO A IRRADIACIÓN

55 La función GI principal incluye la absorción de nutrientes, electrolitos y agua, y tal absorción ocurre en células epiteliales de las vellosidades bien diferenciadas y maduras. El 80 % de la absorción de líquido y electrolito ocurre

en el intestino delgado. Como se ilustra en el presente documento, la IR produce la pérdida selectiva de vellosidades y/ o cripta dependiendo de la dosis de IR, y así conduce a reducir la absorción de Na^+ , Cl^- y nutrientes. Este ejemplo ilustra diseños experimentales para determinar alteraciones en la función GI causadas por varias dosis de IR con el tiempo.

5 Procedimientos

Se usan ratones C57BL/6 (8 semanas de edad, macho) de NCI. Se determinan observaciones físicas, citología, inmunohistoquímica, análisis Western, marcadores sustitutos de plasma y estudios funcionales como índices específicos para la toxicidad GI inducida por IR. Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos y el abdomen se irradió con un Shepherd Mark-I usando una fuente de Cs que suministra IR a la tasa de dosis de 1,84 Gy/min al abdomen. Los ratones se someten a IR a 0, 1, 3, 5, 7 y 9 Gy. Se examinan los cambios en el transporte de glucosa y aminoácido en el día 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 y 30 con 10 ratones en cada grupo. Se recogen muestras de plasma antes de la recogida del tejido. Se recogen tejidos del íleon y yeyuno por histopatología, transferencia Western, inmunohistoquímica y estudios de cámara de Ussing (sometidos a evaluación por separado).

A) Determinación de alteraciones funcionales en electrolitos (Na^+ , Cl^- y HCO_3^-)

Este ejemplo ilustra diseños experimentales para determinar la alteración en la función de la proteína de transporte asociada a la absorción de electrolito después de IR. Las alteraciones en la función de transporte de electrolito se correlacionan entonces con los marcadores de plasma, citología y observaciones físicas tales como actividad diaria, peso corporal, formación de heces formación y sangre oculta fecal. Se realizan exámenes de citología usando ensayos de la cripta, tinción de H y E, tinción de BrdU, inmunohistoquímica y análisis de transferencia Western.

Primero, se examina el flujo transepitelial de Na^+ y Cl^- en una cámara de Ussing para evaluar la absorción de electrolito después de IR. Se sacrifican los ratones, y se examinan los cambios en el transporte de ion basal en los ratones no IR y ratones tratados con IR a diversas dosis. La absorción de Na^+ y Cl^- es electroneutra en el epitelio regular.

En este ejemplo, se realizan estudios de sustitución de isótopos (^{22}Na y ^{36}Cl) para determinar el movimiento de Na^+ y Cl^- basal. Brevemente, se añaden ^{22}Na y ^{36}Cl tanto al lado mucosal como al lado serosal. Se recogen muestras de 0,5 ml del lado frío al final de cada 30 minutos. Se calculan los flujos unidireccionales usando la fórmula estándar, y se expresa como $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Se calcula el flujo neto (J_{Neto}) como la diferencia entre los flujos J_{ms} y J_{sm} a través de pares de tejido. Los experimentos se realizan bajo condiciones de cortocircuito.

Además, se usan técnicas de pH stat para medir cambios en la secreción de HCO_3^- . Como se ilustra en el presente documento, la IR disminuyó la secreción de HCO_3^- en yeyuno. La secreción de HCO_3^- es crítica para el equilibrio ácido-base y la neutralización de ácido en los segmentos superiores del intestino⁷²⁻⁷⁴. Estos experimentos sugieren el posible mecanismo de secreción de HCO_3^- e indican 1) secreción de HCO_3^- dependiente del Cl^- de la luz y 2) secreción de HCO_3^- independiente del Cl^- de la luz en ratones normales y en ratones irradiados. La secreción de bicarbonato se expresa del siguiente modo:

$$\text{Secreción de bicarbonato total } (\mu\text{eq/h/cm}^2) = \frac{(\text{D2} - \text{D1}) \times 0,025 \times 2 \times 60}{1,13 \times (\text{t})}$$

donde D2 y D1 son la diferencia entre el ácido total añadido entre dos momentos de tiempo, 0,025 representa la normalidad del ácido añadido, 2 la valencia de H_2SO_4 y 60 representa el tiempo en minutos para expresar finalmente la secreción por hora. 1,13 representa el área superficial del tejido usado en la cámara de Ussing y t el tiempo. La secreción de HCO_3^- estudiada usando la técnica de pH stat complementará las mediciones de flujo de Na^+ y Cl^- transepitelial.

Los experimentos de flujo iónico, estudios de pH stat y mediciones eléctricas transepiteliales pueden aclarar el proceso de transporte en los ratones no de IR y de IR.

B) Determinación de alteraciones funcionales en la absorción de nutriente debido a irradiación

La malabsorción intestinal de nutrientes afecta al estado nutricional después de IR. Como se ilustra en el presente documento, la absorción selectiva de nutrientes se produce después de IR. La presencia de nutrientes no absorbidos en el intestino conduce a diarrea osmótica, que complica además la lesión causada por la irradiación. Este ejemplo ilustra el diseño experimental para determinar los nutrientes que son absorbidos del intestino después de IR.

Los nutrientes fácilmente absorbidos pueden ser incluidos en la composición terapéutica/dietética de la invención objeto para examinar el efecto de varias dosis de IR sobre la absorción de glucosa con el tiempo.

Específicamente, se determinan cambios en el transporte de glucosa en cámaras de Ussing después de IR. También se investiga el tiempo requerido para que las proteínas de transporte de glucosa vuelvan a su función

normal (niveles de no IR). La formulación (ORD) se deriva según la capacidad de los ratones para tolerar la glucosa oral. La glucosa es retenida del régimen de soporte oral hasta que el transporte de glucosa empieza a mejorar.

Además, se examinan cambios en el transporte de aminoácidos (a.a) después de IR. Puede detectarse el transporte de aminoácidos electrogénico en una cámara de Ussing como el movimiento neto de carga que ocurre cuando el aminoácido es transportado. No hay movimiento de carga asociado a a.a electroneutro y, por tanto, estos transportes son estudiados en los estudios de vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV). Tanto el a.a electrogénico como el electroneutro son estudiados en BBMV para la comparación entre diferentes procedimientos experimentales.

Específicamente, se estudian los cuatro tipos principales de sistemas de transporte de aminoácidos probando la captación de aminoácidos representativos L-leucina (aminoácido neutro), L-prolina (IMINO ácido), ácido L-glutámico (aminoácido ácido) y L-cisteína (aminoácido de sulfurato) en vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV) de ratones no IR e IR.

Cambios en el transporte de a.a electrogénicos debido a IR

Los aminoácidos se clasifican ampliamente en neutros, catiónicos y aniónicos, ya que sus características de transporte se basan en gran medida en la carga (Tabla 4). El transporte de a.a. electrogénico puede ocurrir mediante $B^{0/+}$ (a.a neutro y catiónico) o X'_{AG} . El transporte de a.a acoplado a Na e independiente de Na se determina por experimentos en presencia y ausencia de Na^+ de la luz. Además, el transporte de a.a electroneutro se estudia en BBMV usando aminoácidos marcados con ^{14}C .

Tabla 4 Sistema de transporte de aminoácidos en la membrana del borde en cepillo del intestino delgado

| Sistema de transporte | Identidad molecular | Identidad alterna | Sustratos | Dependencia de Na | Participación de otros iones |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|--|-------------------|------------------------------|
| B^0 | B^0AT1 | SLC6A19 | <u>a.a</u> neutros | Sí | No |
| $B^{0/+}$ | $AT1B^{0/+}$ | SLC6A14 | <u>a.a</u> neutros, <u>a.a</u> catiónicos | Sí | Cl^- |
| $\underline{b}^{0/+}$ | $\underline{b}^{0/+}AT$ | SLC7A9 | <u>a.a</u> neutros, <u>a.a</u> catiónicos, cistina | No | No |
| | <u>rBAT</u> | SLC3A1 | Ninguna función de transporte de su propiedad, influyen en los parámetros cinéticos de la función de transporte de $b^{0/+}AT$ | | |
| PAT | PAT1 | SLC26A6 | <u>a.a</u> neutros de cadena corta (glicina, alanina y prolina) | No | H^+ |
| X'_{AG} | EAAT3 | SLC1A1 | <u>a.a</u> aniónicos (aspartato, glutamato) | Sí | K^+ , H^+ |

Preparación de BBMV para estudiar el transporte de a.a y transferencia Western

Se aíslan BBMV usando el procedimiento de precipitación de magnesio⁷⁵. El contenido de proteína total de BBMV se determina usando el procedimiento de Bradford⁷⁶. Las vesículas se almacenan en N_2 líquido o a $-80^\circ C$.

Evaluación de la captación de aminoácidos por BBMV

La captación de aminoácidos por las BBMV se realiza a $25^\circ C$ usando la técnica de filtración rápida descrita por Hopfer y col.⁷⁵ con ligeras modificaciones. Se añaden suspensiones de BBMV (5 μl) al medio de incubación (45 μl) que contiene 1 mmol/l de aminoácido sin marcar, 25 $\mu Ci/ml$ de sustrato radiomarcado L-[^{14}C]leucina, L-[^{14}C]prolina, ácido L-[^{14}C]glutámico o L-[^{35}S]cisteína, 100 mmol/l de NaSCN o KSCN, 100 mmol/l de manitol, 0,1 mmol/l de $MgSO_4$ y 10 mmol/l de HEPES (pH 7,4). Se miden los transcurros de tiempo de la captación de aminoácidos en presencia de gradiente de Na^+ (usando medio que contenía NaSCN) y en ausencia de gradiente de Na^+ (medio que contenía KSCN). A intervalos de tiempo específicos, el proceso de captación termina añadiendo 5 ml de solución de parada fría en hielo que contenía 150 mmol/l de KSCN y 10 mmol/l de Tris-HEPES (pH 7,4). La suspensión se vierte inmediatamente sobre un filtro Millipore pre-humedecido que se lava tres veces con 3 ml de solución de parada fría en hielo y se sumerge en 5 ml de centelleante Hisafe 3 fluid (LKB Products, Bromma, Suecia). El filtro se cuenta entonces en un contador de centelleo líquido. La unión no específica al filtro se mide previamente y se resta de la captación total. Los resultados se expresan como picomoles de captación de aminoácido por miligramo de proteína.

C) Determinación de cambios en la permeabilidad paracelular debido a IR

Se determinan alteraciones en la permeabilidad paracelular usando las siguientes técnicas. i) potencial de dilución; ii) TEER; iii) permeación de solutos no iónicos grandes de tamaños diferentes; dextrano conjugado con FITC e isetionato de rodamina B-dextrano.

5 *Cambios en el potencial de dilución con mitigación después de IR*

Se usan mediciones del potencial de dilución para determinar los cambios en la relación de permeabilidad entre el Na⁺ y el Cl⁻ usando la ecuación de Nernst. Los resultados de estos experimentos se comparan entre grupos de ratones no IR e IR. Los resultados de los estudios de la permeabilidad paracelular y de endotoxina en plasma se correlacionan con los datos de la electrofisiología y los datos de supervivencia.

- 10 Se inducen potenciales de dilución por perfusión en la mucosa con soluciones de Ringer que contienen varias concentraciones de Na⁺ y se ajusta la osmolaridad total con manitol para mantener la osmolaridad igual entre los experimentos. Se estima que la contribución de otros iones a la conductancia es inferior al 5 % y, por tanto, se desprecia. Se mide la diferencia de potencial a través de la membrana usando electrodos de AgCl-AgCl y un multímetro (VCC MC8, Physiological Instruments Inc.). Se corrigen los potenciales de dilución para cambios en el
- 15 potencial de empalme (normalmente inferior a 1 mV). Estos experimentos permiten el cálculo de la conductancia de cloruro y de sodio de la vía paracelular usando la siguiente fórmula.

$$E_m = RT/F \cdot 2,303 \log \{ P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i / P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o \}$$

$$R = 8,314472 \text{ (J/K/mol)}; F = 96,48531 \text{ (KJ/mol)}; \text{Relación de permeabilidad } (\beta) = \frac{P_{Cl}}{P_{Na}}; T = 310 \text{ (Kelvin)}$$

Cambios en la permeación de soluto no iónico a través de especies paracelulares después de IR

- 20 Se estudia la permeabilidad paracelular a solutos sin carga solubles en agua de varios tamaños en tejidos de intestino delgado montados en una cámara de Ussing usando dextrano conjugado con FITC e isetionato de rodamina B-dextrano (Sigma). Estos estudios permiten la determinación de cambios de la permeabilidad paracelular debido a IR.

- 25 La barrera intercelular formada por uniones ajustadas está altamente regulada y es selectiva en tamaño y en ion. Por tanto, esta barrera intercelular representa una barrera de difusión semipermeable. Se diseñan experimentos para determinar la permeabilidad paracelular a solutos sin carga solubles en agua de diversos tamaños en tejidos ileales o yeyunales montados en la cámara de Ussing bajo condiciones basales en tanto epitelio regular como epitelio expuesto a radiación.

- 30 Se añade dextrano conjugado con FITC e isetionato de rodamina B-dextrano (Sigma) a una concentración de 3 mg/ml disuelto en solución de Ringer al lado mucosal de la cámara de Ussing y se mantiene a 37 °C durante 60 min. Se muestrea la solución en la solución de baño basolateral para cuantificar el dextrano fluorescentemente marcado. FITC-dextrano: Exc 485 nm y Em: 544 nm e isetionato de rodamina B-dextrano: Exc 520 nm y Em 590 nm. Se obtienen curvas patrón de tejido ileal o yeyunal de ratones montado en cámara de Ussing para comprobar cualquier cambio en la permeabilidad con el tiempo. Entonces, estos valores se comparan con tejidos de ratones de
- 35 IR y no de IR.

D) Determinación de los efectos de la irradiación

- 40 Se usan tejidos de ratones sacrificados para una cámara de Ussing y estudios de pH stat para tinción de H y E, BrdU, formación de heces, sangre oculta, peso corporal, inmunohistoquímica y análisis Western. Estos resultados se comparan entonces con alteraciones funcionales en cambios de la permeabilidad de electrolitos, nutrientes y paracelular en ratones no de IR e IR.

Análisis patológico por el ensayo de criptas, tinción de H y E, BrdU

a) Ensayo de criptas / ensayo de supervivencia de microcolonias

- 45 Se ajustaron curvas objetivas a los datos, usando un modelo para la destrucción de célula, que supone que las células clonogénicas ('rescate de estructura') en una estructura pluricelular se comportan según la estadística de Poisson. Se supone que la estructura permanece intacta hasta que, en promedio, sobreviven menos de tres células por estructura; que la supervivencia de células es exponencial durante el intervalo de dosis que se analiza; y que la estructura puede volver a crecer a partir de una o más células supervivientes. Se cree que cada foco epitelial representa la supervivencia de una o más células madre clonogénicas capaces de dar lugar a la cripta regeneradora.

- 50 Se sacrifican ratones 3,5 días después de IR para el ensayo de microcolonias de la cripta. Este intervalo está en o cerca del pico de recuperación mitótica en las criptas después de IR. Se usa para estudiar los efectos agudos de la IR.

Para la respuesta biológica a la radiación, se calculan los valores de D_0 y D_{10} . Los estudios han mostrado que a pesar de la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de D_0 , la varianza de aproximadamente D_0 dependió enormemente del número de ratones y secciones por punto de dato. No pudieron obtenerse valores reducidos del coeficiente de varianza (~5 %) aumentando el número de secciones por encima de dos y el número de ratones por encima de cuatro. Así, los estudios se diseñaron con 3 secciones por ratón y seis ratones por punto de dato.

b) Tinción de BrdU para detectar la actividad mitótica después de IR

Se inyectan ratones con BrdU (30 mg/kg de peso corporal) y los animales se sacrifican en las horas 12, 24, 48 o 72, cuando los tejidos también se recogen para estudios funcionales. Se repiten inyecciones de BrdU una vez cada 24 h, cuando los estudios de marcado de BrdU continuaron más allá de 24 h después de su inyección. Después del marcado con BrdU, se preparan secciones de parafina de intestinos delgados de ratón y se tiñen con anticuerpo (Ab) anti-BrdU. Las células se puntuaron por unidad entera de la cripta y de las vellosidades. Se analizaron al menos 60 criptas y vellos correspondientes por ratón. Las células marcadas con BrdU se normalizaron al número total de células por cripta o vellosidades. El porcentaje resultante se representa entonces contra el tiempo de inducción. Estos estudios permiten la determinación de la tasa a la que las células progenitoras de la cripta atraviesan el compartimiento postmitótico de las vellosidades, una correlación directa a la tasa de división de célula en la cripta y la cinética de las células de la cripta migratorias⁷⁷.

Cambios en parámetros físicos con IR

Se estudian el peso corporal, formación de heces y sangre oculta fecal en ratones para detectar los cambios en el estado nutricional de los animales con IR. Para la actividad y signos diarios de la enfermedad, todos los ratones se observan una vez al día para diarrea, falta de acicalado, pelo erizado, disminución en los hábitos de comer y beber, letargo, etc., y se registraron cuidadosamente.

Los hallazgos de estos estudios se comparan con el análisis de plasma para marcadores sustitutos, observaciones patológicas, transferencias Western, estudios de inmunohistoquímica y de funciones.

Análisis de transferencia Western para determinar alteraciones moleculares de los procesos de transporte implicados en el transporte de electrolitos y nutrientes

Se examinan cambios en las actividades de las siguientes proteínas de transporte, que están directa o indirectamente implicadas en la absorción de electrolitos y nutrientes. Las proteínas de transporte incluyen la actividad de CFTR (que se correlaciona con la secreción de Cl^- electrogénica), actividad de NHE3 (se correlaciona con la absorción de Na^+), actividad de NBCe1-A/B en las vellosidades (se correlaciona con secreción de HCO_3^-), NKCC1 (captación basolateral a Na^+ , K^+ y Cl^- dentro de la célula), SGLT-1 (absorción de glucosa), B^0 , $\text{B}^{0/+}$, $\text{b}^{0/+}$, PAT (sistema de transporte electrogénico acoplado a protón) y X_{AG} (Tabla 2). Estos estudios se comparan con datos funcionales en no IR, IR y después de tratar con ORD.

Inmunohistoquímica para la detección de cambios en el patrón de expresión de proteínas de transporte, marcadores de células de la cripta y de las vellosidades

Se preparan secciones congeladas cuando los animales se sacrifican para estudios funcionales y para inmunotinción usando diversos anticuerpos que son específicos para diversos transportadores (CFTR, NHE3, NKCC, NBCe1-A/B, SGLT, B^0 , $\text{B}^{0/+}$, $\text{b}^{0/+}$, PAT1 y X_{AG}). Además, se examinan patrones de expresión de marcadores superficiales de la célula para proporcionar percepción para la relación de células de la cripta y de las vellosidades. Estos estudios permiten la determinación de la alteración en el patrón de expresión de transportadores con IR y tratamiento de ORD.

E) Identificación de marcador(es) sustituto(s) para efectos de la radiación

Aunque hay varios estudios que intentan identificar marcador(es) sustituto(s) para determinar la dosis de radiación y el tiempo desde la radiación para determinar la aparición de toxicidad GI, estos estudios no han sido satisfactorios en gran medida. Este ejemplo ilustra diseños experimentales que permiten la identificación de marcador(es) sustituto(s) para predecir la aparición de toxicidad GI, que puede también resultar útil en escenarios donde participan múltiples órganos.

Específicamente, se recoge plasma cuando los animales se sacrifican para la evaluación funcional (cámaras de Ussing). Después de la exposición a una dosis de IR de 0, 1, 3, 5, 7 o 9 Gy, los ratones se sacrifican en el día 1, 2, 3, 6 o 9. Con el fin de identificar marcadores sustitutos, se estudian péptidos intestinales, citocinas y endotoxina.

Análisis de plasma para endotoxinas

Se miden los niveles de endotoxina en plasma. Se correlacionan cambios en los niveles de endotoxina en plasma con cambios en la permeabilidad paracelular, niveles de péptido intestinal en plasma, enfermedad y tasa de supervivencia.

Análisis de plasma para citocinas

Se examinan cambios en los niveles de citocinas en plasma usando la técnica de matrices de perlas LUMINEX multiplex en ratones IR y no IR.

Análisis de plasma para péptidos intestinales

- 5 Se investigan los péptidos específicos del intestino, que incluyen insulina, glucagón, secretina, colecistokina, citrulina, somatostatina, péptido YY, grelina, NPY y GLP-2. Todos los kits de péptidos intestinales se compraron de Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (CA, EE.UU.). Los experimentos se realizan según la instrucción del fabricante.

Análisis estadístico

- 10 Se compara la diferencia funcional entre los tejidos normales y de IR. Se calcula la significación estadística usando el análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se comparan entre los ensayos. Se analiza el coeficiente de correlación (R) para determinar el mejor marcador funcional. Todos los análisis estadísticos se realizan usando la versión 9.1 del sistema SAS para Windows (Derechos de Autor© 2002-2003 SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.). Si se violan las suposiciones de distribución asociadas a un procedimiento estadístico particular, se usan transformaciones apropiadas o alternativas no paramétricas. Se construyen curvas de eficacia (ROC) y se comparan las áreas bajo las curvas de ROC (ABC) entre las diversas pruebas funcionales usando el procedimiento no paramétrico de DeLong y col. (1988). La tasa de error de tipo 1 por familia se controla a 0,05 usando el procedimiento de Tukey para comparaciones múltiples. Se informan coeficientes de la correlación de Pearson con valor de p asociado e intervalo de confianza del 95 %.

20 **Ejemplo 16 - DESARROLLO DE REGÍMENES ORALES IDEALES PARA EL TRATAMIENTO DE LESIÓN GASTROINTESTINAL INDUCIDA POR IR**

- 25 Este ejemplo ilustra diseños experimentales para desarrollar composiciones terapéuticas orales para el tratamiento o la mejora de la toxicidad GI inducida por la radiación. También se determina el momento cuando debe empezar la dieta de rehidratación oral (ORD) y cuánto tiempo debe administrarse la composición después de la exposición a diversas dosis de IR. El tiempo durante el que la ORD necesita administrarse depende del tiempo necesario para que K_m vuelva a los niveles basales.

Procedimientos

- 30 Se usan ratones C57BL/6 (8 semanas de edad, macho) de NCI. Para determinar la afinidad del transportador, se calcula la cinética de saturación usando concentración creciente de los nutrientes respectivos. Estudios preliminares han mostrado que algunos a.a. tienen absorción elevada, mientras que algunos mostraron absorción reducida, con cambios en K_m y $V_{m\max}$ después de IR. Se añade concentración creciente de los a.a. al íleon o yeyuno (sometidas a evaluación por separado), provocan un aumento en I_{sc} . El representar la concentración conocida de a.a. frente a I_{sc} permite la determinación de la cinética de saturación. El administrar los a.a. selectivamente absorbidos después de IR mediante lavado gástrico aumenta la supervivencia de los ratones. Se determinan K_m y $V_{m\max}$ para los nutrientes en ratones IR con 0, 1, 3, 5, 7 o 9 Gy a los 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 y 30 días con 10 ratones en cada grupo.

A) Determinación de K_m y $V_{m\max}$ de aminoácidos esenciales y glucosa para el desarrollo de dieta oral de radiación (ORD) ideal

- 40 Como se ilustra en el presente documento, la irradiación causa cambios en la cinética de transporte de los nutrientes, que indica afinidad alterada hacia los respectivos transportadores. La afinidad por el transportador de glucosa determinado usando esta técnica mostró disminución significativa y duró aproximadamente dos semanas hasta el retorno al nivel de base. Se sabe que la presencia de glucosa o nutrientes no absorbidos en la luz intestinal produce diarrea. Se determinan K_m y $V_{m\max}$ para los nutrientes en ratones expuestos a diferentes dosis de IR y seguido de un periodo de hasta 30 días después de IR. Estos estudios son útiles para formular una ORD basada en su patrón de absorción con el tiempo y la dosis de radiación. Además, pueden utilizarse nutrientes que muestran elevada absorción después de IR como fuentes alternas de energía para el sistema. La formulación (ORD) se usará entonces en estudios de supervivencia.

Cambios en K_m y $V_{m\max}$ para el transporte de glucosa en las cámaras de Ussing después de IR

- 50 Se estudia el transporte de glucosa. Específicamente, se estudian K_m y $V_{m\max}$ para glucosa. Se añaden concentraciones crecientes de glucosa al lado de la luz en los experimentos de cámara de Ussing y se registra el aumento en I_{sc} . La glucosa es retenida del régimen de soporte oral hasta que el transporte de glucosa empiece a mejorar. La formulación se basa en la capacidad de los ratones para tolerar la glucosa oral.

Cambios en K_m y $V_{m\max}$ para el transporte de aminoácidos (a.a.) después de IR

Se estudia el patrón cinético de los aminoácidos basándose en la dosis de IR y se estudia el tiempo después de IR determinando K_m y $V_{m\max}$ para cada a.a. Se determinan los índices cinéticos de a.a. electrogénicos en la configuración

de cámara de Ussing como se ha descrito. Brevemente, el aumento en la concentración de a.a. añadido a la solución de luz produce el aumento de la respuesta de I_{sc} , con saturación a una concentración particular de a.a. Se calculan K_m y $V_{máx}$ a partir de la curva de saturación.

- 5 Se estudian a.a. electroneutros usando BBMV. La captación del aminoácido por BBMV se realiza en presencia de diferentes concentraciones de sustrato, de 0,025 a 7 mmol/l, a un tiempo de transporte fijo de 3 s (19). Cada ensayo se realiza por triplicado usando el conjunto de BBMV ($n = 12$) de cada grupo experimental. La velocidad máxima ($V_{máx}$) se expresa como picomoles de sustrato por miligramo de proteína en 3 s, y la constante de afinidad de transportador (K_m) se expresa como milimoles por litro.

Optimización de la terapia de ORD para mitigar la toxicidad GI y mejorar la supervivencia

- 10 Se descubre que la lisina a un intervalo de dosis de 20 mg/ratones/día puede aumentar la supervivencia en ratones. Para optimizar el régimen de tratamiento de ORD seleccionando una dosis, frecuencia e intervalo de administración apropiado, se realiza el análisis de los efectos de ORD sobre la supervivencia a los 7 días, formación de heces, sangre oculta y peso corporal. La ORD se inicia tan pronto como 3 horas después de una dosis letal de IR (valor de 15,6 Gy = $1,2 \times DL_{50/7}$) a un intervalo de dosis determinado de valores K_m de a.a. respectivos o glucosa. La
- 15 concentración de glucosa o a.a. usados para el lavado gástrico se calcula a partir de K_m basándose en las cantidades diariamente recomendadas actualmente en uso para glucosa y aminoácidos esenciales en seres humanos adultos. La traducción de dosis de humano a ratones se basa en los factores de K_m ⁷⁸. Así, existe una relación inversa entre K_m y la dosis diaria para los nutrientes. Si IR aumentó la K_m (que sugiere una disminución de la afinidad por el transportador), entonces hay una disminución proporcional en la dosis diaria para el nutriente
- 20 respectivo. Se formulan dos ORD adicionales con dosis, es decir, 3 veces por encima y por debajo de la dosis calculada. La mejor dosificación de ORD se determina basándose en los estudios de supervivencia.

- El lavado gástrico se repite una vez al día durante 7 días. La frecuencia de la dosis y el intervalo de lavado gástrico de ORD se someten a cambio según los resultados de los estudios de supervivencia. La toxicidad GI alcanza el máximo aproximadamente el día 2-3 después de IR y entonces se recupera gradualmente 7 días si la ORD es
- 25 eficaz. Los ratones se observan diariamente hasta 7 días después de IR para monitorizar su supervivencia.

- Todos los ratones que reciben dieta regular mueren o son sacrificados (moribundo; definido como una combinación de 20 % de pérdida de peso, dejan de acicalarse, actividad reducida y curiosidad disminuida) en el plazo de 7 días después de IR. Si los ratones que reciben tratamiento de ORD se protegen de la letalidad inducida por IR, entonces se repetirá el experimento de supervivencia con 10 ratones/grupo adicionales con el mismo tratamiento para
- 30 garantizar que los resultados sean reproducibles. Los datos de supervivencia se analizarán por la prueba exacta de Fisher.

- El tamaño de muestra de 10 animales por grupo garantiza potencia suficientemente alta (>80 %) para detectar diferencias de supervivencia entre cerca del 0 % para el grupo de vehículo y el 60 % o más alto para cada intervención (en una comparación por pares llevada a cabo al nivel alfa ajustado de $0,017 \approx 0,05/3$) para garantizar
- 35 un nivel alfa global del 5 %. En el supuesto caso de que no se observe una diferencia estadísticamente significativa o solo se logre mitigación parcial por el tratamiento de ORD, se realizará un nuevo ciclo de optimización del régimen como se describe anteriormente para garantizar la máxima eficacia de mitigación contra la letalidad inducida por IR. Después de la selección de una dosis óptima, se evalúa si se requiere o no lavado gástrico de ORD más frecuente (dos veces al día) para lograr mayor mitigación de la radiación y recuperación de la cripta más rápida.

- 40 *Determinación de DMF y la ventana de eficacia de ORD para terapia después de IR*

- El factor de modificación de dosis (DMF) es uno de los parámetros más importantes para medir la eficacia de un mitigador de la radiación, que se define por $DMF = DL_{50}^T / DL_{50}^C$ donde T es el grupo de tratamiento de ORD y C indica el grupo de control con la dieta regular⁵¹. Para determinar la eficacia de tratamiento de ORD en mitigar la letalidad inducida por IR, se tratan grupos de 10 ratones C57BL/6 en promedio (10-20 ratones/grupo que varían con la dosis de IR) con vehículo u ORD usando el régimen óptimo definido por los experimentos previos. Los ratones
- 45 tratados con vehículo se exponen a 11 Gy a 13 Gy de IR usando incrementos de 0,5 a 1 Gy. La supervivencia de estos ratones se registra durante un periodo de observación de 7 días después de IR. Los ratones se sacrifican al final del periodo de observación o cuando lleguen a ser moribundos.

- Se recogen intestino delgado y plasma después de la eutanasia. Se usan muestras de sangre para el análisis de péptidos intestinales, mientras que se usan especímenes de tejido de intestino delgado para investigar el daño intestinal inducido por IR. El valor de $DL_{50/7}$ es un buen indicador de la toxicidad GI inducida por IR.
- 50

- La $DL_{50/7}$ para los ratones tratados con vehículo es próxima a 13 Gy, basándose en la observación previa en el laboratorio de los presentes inventores. Los grupos tratados con ORD se exponen a IR que oscila de 14,5 a 16,5 Gy de IR con incrementos de 0,5 a 1 Gy, se observan y se examinan como se ha descrito anteriormente para los
- 55 ratones tratados con vehículo. Si números sustanciales de ratones en grupos de tratamiento con ORD sobreviven incluso después de exponerse a 16,5 Gy, se administran dosis de IR más altas a los ratones en un estudio posterior. El valor de $DL_{50/7}$ se calcula para los animales tratados con ORD basándose en sus curvas de supervivencia y entonces se calcula el DMF para ORD. Los ratones tratados con ORD tienen una DMF para $LD_{50/7}$ superior a 1,2.

Para determinar cuándo debe administrarse el tratamiento de ORD después de IR, se administran cinco grupos de animales con ORD 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 24 horas después de IR y se siguen con tratamiento de ORD programado y se observan durante 7 días, junto con un control positivo (3 h después del tratamiento de IR) y un control negativo (vehículo de solución salina). La supervivencia de los animales se compara basándose en la supervivencia en el momento de tiempo de 7 días.

En este modelo, se consideran varios modelos de regresión logística (resultado variable muerto/vivo a los 7 días) y diversas tendencias de tiempo en los ocho grupos administrados con ORD después de IR. Se consideran tanto modelos lineales (lo más probablemente disminuyendo la supervivencia a medida que aumenta la demora del tratamiento) como no lineales (disminuciones de la supervivencia exponenciales).

Se realizan comparaciones frente a 3 h después de la administración de IR y el vehículo en un modo por pares usando la prueba exacta de Fisher. Hay una comparación por pares (diferentes grupos de coordinación frente a las 3 h después de IR, grupo de ORD y frente a vehículo) y el nivel alfa de la prueba individual se mantendrá a 0,005 ($\approx 0,05/10$).

a) Tasa de supervivencia:

Un índice importante para el efecto de tratamiento de ORD es determinar la tasa de supervivencia. Se registra dos veces al día y se crea una curva de supervivencia.

b) Actividad diaria o signos de enfermedad

Todos los ratones se observan una vez al día para los signos de enfermedad, tales como diarrea, falta de acicalado, pelo erizado, hábitos disminuidos de comer y beber, letargo, etc., y se registran cuidadosamente.

c) Peso corporal, formación de heces y sangre oculta

Para determinar si la ORD podría invertir algunos de los efectos de la toxicidad GI inducida por IR, se extraerá el colon y se fotografiará para la formación de heces y las heces se analizarán para sangre oculta, cuando aquellos animales se sacrifican para estudios funcionales como se describe en el presente documento. Estos estudios permiten determinar si los agentes de mitigación son capaces de mantener la integridad de la mucosa GI y su función que son visibles a simple vista.

d) Inmunohistoquímica

Se analiza la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia usando secciones teñidas de H y E de yeyuno o ileon. Se tendrá cuidado para determinar la frecuencia de distribución de folículos linfoides.

La dosis óptima, tiempo de comienzo y programa de ORD para la toxicidad GI aguda se determinan en una secuencia. Los ratones se tratan con formulación de dosis diferente de ORD después de la exposición a IR. La dosis óptima se determina en modelos de regresión logística determinando la supervivencia durante 7 días (sí frente a no) como la variable de respuesta y el nivel de dosis como la variable explicativa. Debido a la incertidumbre de la curva de dosis-respuesta, se proponen varios modelos de dosis-respuesta plausibles. Después de determinar el modelo de dosis-respuesta, se calcula la mínima dosis eficaz (MED). El tiempo de comienzo y la duración óptima de la terapia son contestados por pruebas de equivalencia usando las respuestas medias estimadas y la varianza en el modelo de ANOVA.

Ejemplo 17 - DETERMINACIÓN DE LA MEJORA FUNCIONAL EN LA FUNCIÓN GI

En este ejemplo, se realizan experimentos de electrofisiología para determinar cómo la ORD ayuda a restaurar la mucosa intestinal lesionada por IR para absorber electrolitos y nutrientes. Se correlacionan cambios funcionales con el (los) marcador(es) sustituto(s) de plasma, citología y observaciones físicas tales como actividad diaria, peso corporal y formación de heces. Sangre oculta fecal, citología tal como ensayo de criptas, tinción de H y E, tinción de BrdU, inmunohistoquímica y análisis de transferencia Western. Estos estudios permiten la determinación de los efectos protectores de ORD sobre la función GI al nivel molecular, celular y funcional.

Procedimientos

Se usan ratones C57BL/6 (8 semanas de edad, macho) de NCI. Se realizan estudios funcionales, observaciones físicas, citología, inmunohistoquímica, análisis Western y se usan marcadores sustitutos de plasma como índices específicos de toxicidad GI inducida por IR. Los ratones se dividieron al azar en grupos y se irradió el abdomen con un Shepherd Mark-I usando una fuente de Cs que administra IR a la tasa de dosis de 1,84 Gy/min. Los ratones se irradian con 1, 3, 5, 7 o 9 Gy y entonces se administran con ORD. Los ratones se tratan con ORD. Los ratones se sacrifican en el día 6 y se usan los tejidos para funcional, histopatología, transferencia Western e inmunohistoquímica.

A) Correlación de efectos de ORD con la mejora funcional en la absorción de electrolitos y nutrientes

Se usa un conjunto de índices para evaluar el efecto del tratamiento: 1) los ratones se pesan diariamente y se observan detenidamente para cualquier signo de enfermedad; 2) se analizan muestras de sangre y parámetros físicos cuando los animales se sacrifican para los estudios funcionales (absorción de electrolitos y nutrientes), ensayo de la cripta, análisis de inmunohistoquímica y de transferencia Western. Se usan muestras de sangre para medir la endotoxina en plasma (un índice para la disfunción de la barrera intestinal), citocinas, péptidos intestinales (insulina, glucagón, secretina, colecistokinina, citrulina, somatostatina, péptido YY, grelina, NPY y GLP2), citrulina, glucosa e insulina.

Determinación del flujo transepitelial de Na^+ y Cl^- en estudios de cámaras de Ussing

Para investigar la mejora funcional de ORD, se montaron hojas de yeyuno e íleon (sometidas a evaluación por separado) de ratones en cámara de Ussing y se realizan experimentos como se describe en el Ejemplo 15. Se comparan la absorción de Na^+ y Cl^- entre grupos de ratones no IR, IR y tratados con ORD.

Determinación de la secreción de HCO_3^- usando técnicas de pH stat

Se realizan experimentos como se describe en el Ejemplo 15. La restauración de la secreción de HCO_3^- con tratamiento de ORD sugiere mejora funcional. La secreción de HCO_3^- se compara entre grupos de ratones no IR, IR y tratados con ORD.

Determinación de la absorción de nutrientes en cámara de Ussing y estudios de vesícula

Como se describe en el Ejemplo 15, se determina la glucosa, a.a. electrogénico y absorción de a.a. electroneutro. Los resultados de estos estudios se comparan entre grupos de ratones no IR, IR y tratados con ORD.

Determinación de cambios en la permeabilidad paracelular con mitigación después de IR

Una disminución en la permeabilidad paracelular con tratamiento de ORD sugiere una mejora en la integridad epitelial. Estos cambios indicarán mejora concomitante en el nivel de endotoxina en plasma.

Correlación de efectos de ORD con ensayo de la cripta, tinción de H y E, BrdU, formación de heces, sangre oculta, peso corporal, inmunohistoquímica y análisis de Western

Los estudios serán similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 15 y los resultados se compararán entre grupos de ratones no IR, IR y tratados con ORD.

Análisis histopatológico para determinar la mejora anatómica

Se procesarán especímenes para tinción de H y E y análisis patológicos, que incluyen el ensayo de criptas, tinción de BrdU como se describe en Ejemplo 15. Brevemente, se fijarán los tejidos en formalina, se procesarán en bloques de parafina y se teñirán con H y E.

Inmunohistoquímica para detectar cambios en el patrón de expresión de proteínas de transporte, marcador de células de la cripta y de las vellosidades

Se usarán los tejidos recogidos para inmunotinción usando diversos anticuerpos que son específicos para diversos transportadores (NHE3, NBCe1-A/B, SGLT, $\text{B}^{0/+}$, $\text{b}^{0/+}$, X_{AG}^-) y marcadores de la superficie celular (Lgr5, EphB2 y EphB3). El procedimiento será similar al descrito en el Ejemplo 15. Estos estudios ayudarán a determinar el grado de formación de células de las vellosidades y de la cripta tras el tratamiento con ORD.

Análisis de transferencia Western para estudiar alteraciones moleculares de procesos de transporte implicados en el transporte de electrolitos y nutrientes

El procedimiento será similar al descrito en el Ejemplo 15. Se examinará la actividad de CFTR (que se correlaciona con secreción de Cl^- electrogénica), actividad de NHE3 (se correlaciona con absorción de Na^+), actividad de NBCe1-A/B en las vellosidades (se correlaciona con secreción de HCO_3^-), SGLT-1, $\text{B}^{0/+}$, $\text{b}^{0/+}$ o X_{AG}^- .

Correlación de efectos de ORD usando análisis en plasma de marcador(es) sustituto(s)

Estudios preliminares han mostrado cambios en los péptidos intestinales después de IR en ratones. Se examinan cambios en los niveles de marcador sustituto hacia niveles basales y los resultados indicarán la mejora sistémica con tratamiento de ORD.

Análisis estadístico

Se calculan la media y desviación estándar de los datos sin procesar y se aplicarán técnicas gráficas tales como el diagrama de barras. El principal enfoque para comparar estos dos grupos (tratamiento frente a vehículo) utiliza modelos de efectos mixtos (lineales o no lineales) basados en datos longitudinales.

También se desvelan las realizaciones siguientes.

1. Una composición terapéutica estéril para mejorar la salud del intestino delgado, en particular en el caso de atrofia de las vellosidades, en la que la composición se formula para administración enteral y comprende lisina, glicina, treonina, valina y tirosina como aminoácidos libres y agua y en la que la composición tiene una osmolaridad total de 230 mosm a 280 mosm.
- 5 2. La composición terapéutica de acuerdo con la realización 1, en la que la composición no comprende uno o más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina y metionina o, si estos ingredientes están presentes, la glucosa está presente en una concentración de menos de 1g/l, la glutamina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l y la metionina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l.
- 10 3. La composición terapéutica de acuerdo con la realización 2, que comprende además ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina y/o serina.
4. La composición terapéutica de acuerdo con la realización 1, en la que la composición no comprende glucosa, glutamina o metionina.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende además electrolitos, vitaminas, minerales y/o agentes aromatizantes.
- 15 6. Un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene atrofia de las vellosidades, en el que el procedimiento comprende administrar al sujeto, a través de administración enteral, una composición de la realización 1.
7. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que el sujeto es un ser humano.
8. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que el sujeto tiene al menos una reducción del 10% en el número total de células epiteliales del intestino delgado en la región vellosa, cuando se compara con lo normal.
- 20 9. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que el sujeto tiene al menos una pérdida del 10 % en la altura vellosa en el intestino delgado, cuando se compara con lo normal.
10. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que la composición no comprende uno o más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina y metionina o, si uno o más de estos ingredientes está presente, la glucosa está presente en una concentración de menos de 1g/l, la glutamina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l y la metionina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que la composición comprende además ácido aspártico, isoleucina, triptófano, asparagina y/o serina.
12. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que la composición no comprende uno o más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina o metionina.
- 30 13. El procedimiento de acuerdo con la realización 5, en el que la atrofia de las vellosidades está causada por enfermedad, radiación, quimioterapia, terapia de protones, cirugía abdominal y/o agente citotóxico.
14. El procedimiento de acuerdo con la realización 13, en el que la composición se administra por un periodo de 1 a 14 días después de que el sujeto reciba radiación, quimioterapia, terapia de protones o agente citotóxico.
- 35 15. El procedimiento de acuerdo con la realización 13, usado para tratar la enteritis por radiación.
16. El procedimiento de acuerdo con la realización 13, usado para tratar una lesión del intestino delgado causada por quimioterapia o agentes citotóxicos seleccionados entre cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), hidroxiurea, etopósido, arabinósido, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, metotexato, esteroides o una combinación de los mismos.
- 40 17. El procedimiento de acuerdo con la realización 13, usado para tratar enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis ulcerosa, úlceras duodenales o enfermedades de Crohn.
18. Un procedimiento para preparar una composición terapéutica estéril para mejorar la salud intestinal de un sujeto que tiene atrofia de las vellosidades, en el que dicho procedimiento comprende combinar uno o más ingredientes seleccionados entre aminoácidos libres, dipéptidos, monosacáridos, disacáridos o una combinación de los mismos,
- 45 en el que se ha determinado que cada ingrediente retiene al menos una capacidad de absorción del 50 % en el intestino delgado de un sujeto con atrofia de las vellosidades, cuando se compara con lo normal y en el que la composición no comprende glucosa en una concentración de más de 1 g/l o glutamina en una concentración de más de 300 mg/l.
19. Una composición producida por el procedimiento de la realización 18.
- 50 20. La composición de acuerdo con la realización 19, que comprende agua y que tiene una osmolaridad entre 230 mosm y 280 mosm.
21. La composición de acuerdo con la realización 19, en forma de polvo.
22. Un envase que contiene la composición de la realización 1, o polvo que, cuando se combina con agua, forma una composición de la realización 1, en el que dicho envase comprende además instrucciones para administrar la composición a un paciente que tiene, o que se espera que desarrolle, atrofia de las vellosidades.
- 55

Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, solicitudes de patentes y patentes, enunciadas en el presente documento, por la presente se incorporan por referencia en la misma medida que si cada referencia se indicara de manera individual y específica para que se incorporara por referencia y se estableciera en su totalidad en el presente documento.

- 60 Los términos "un" y "una" y "el" y "la", y referentes similares, como se usan en el contexto de la descripción de la invención, deben interpretarse como que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

La mención de las escalas de valores en el presente documento está simplemente prevista para servir de

procedimiento abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. A menos que se establezca de otro modo, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, puede considerarse que todos los valores exactos a modo de ejemplo proporcionados con respecto a un factor particular o medición también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando corresponda).

El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en el presente documento, está previsto simplemente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación al ámbito de la invención, a menos que se indique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indique que cualquier elemento sea esencial para la práctica de la invención, a menos que se establezca explícitamente como tal.

La descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención usando términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se establezca de otro modo o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, una composición descrita en el presente documento que comprende un elemento particular debe entenderse como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se establezca de otro modo o se contradiga claramente por el contexto).

Debe entenderse que los ejemplos y las realizaciones descritas en el presente documento son únicamente para fines ilustrativos y que los expertos en la técnica sugerirán diversas modificaciones y cambios a la luz de los mismos y deben incluirse en el espíritu y el ámbito de la presente solicitud.

Referencias

1. Wolfe, B.M., y col. Experience with home parenteral nutrition. *Am J Surg* 146, 7-14 (1983).
2. Beer, W.H., Fan, A. & Halsted, C.H. Clinical and nutritional implications of radiation enteritis. *Am J Clin Nutr* 41, 85-91 (1985).
3. Donaldson, S.S. Nutritional consequences of radiotherapy. *Cancer Res* 37, 2407-2413 (1977).
4. Theis, V.S., Sripadam, R., Ramani, V. & Lal, S. Chronic Radiation Enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* (2009).
5. Gunnlaugsson, A., y col. Dose-volume relationships between enteritis and irradiated bowel volumes during 5-fluorouracil and oxaliplatin based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Acta Oncol* 46, 937-944 (2007).
6. Dickerson, J.W. Nutrition in the cancer patient: a review. *J R Soc Med* 77, 309-315 (1984).
7. Bounous, G., y col. Dietary protection during radiation therapy. *Strahlentherapie* 149, 476-483 (1975).
8. Alpers, D.H. Glutamine: do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? *Gastroenterology* 130, S106-116 (2006).
9. Hauer-Jensen, M., Wang, J., Boerma, M., Fu, Q. & Denham, J.W. Radiation damage to the gastrointestinal tract: mechanisms, diagnosis, and management. *Curr Opin Support Palliat Care* 1, 23-29 (2007).
10. Tankel, H.I., Clark, D.H. & Lee, F.D. Radiation enteritis with malabsorption. *Gut* 6, 560-569 (1965).
11. Yeoh, E.K., y col. Gastrointestinal function in chronic radiation enteritis--effects of loperamide-N-oxide. *Gut* 34, 476-482 (1993).
12. Gavazzi, C., Bhoori, S., Lovullo, S., Cozzi, G. & Mariani, L. Role of home parenteral nutrition in chronic radiation enteritis. *Am J Gastroenterol* 101, 374-379 (2006).
13. Traber, P.G., Yu, L., Wu, G.D. & Judge, T.A. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villous axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am J Physiol* 262, G123-130 (1992).
14. Minhas, B.S. & Field, M. Localization of bicarbonate transport along the crypt-villous axis in rabbit ileum. *Gastroenterology* 106, 1562-1567. (1994).
15. Welsh, M.J., Smith, P.L., Fromm, M. & Frizzell, R.A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218, 1219-1221. (1982).
16. Rijke, R.P., van der Meer-Fiegggen, W. & Galjaard, H. Effect of villous length on cell proliferation and migration in small intestinal epithelium. *Cell Tissue Kinet* 7, 577-586 (1974).
17. Wright, N.A. & Irwin, M. The kinetics of villous cell populations in the mouse small intestine. I. Normal villi: the steady state requirement. *Cell Tissue Kinet* 15, 595-609 (1982).
18. Roberts, S.A., Hendry, J.H. & Potten, C.S. Intestinal crypt clonogens: a new interpretation of radiation survival curve shape and clonogenic cell number. *Cell Prolif* 36, 215-231 (2003).
19. Roberts, S.A. & Potten, C.S. Clonogen content of intestinal crypts: its deduction using a microcolony assay on whole mount preparations and its dependence on radiation dose. *Int J Radiat Biol* 65, 477-481 (1994).
20. Potten, C.S., Owen, G. & Roberts, S.A. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 57, 185-199 (1990).
21. MacNaughton, W.K. Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 523-528 (2000).
22. Rodier, J.F. Radiation enteropathy--incidence, aetiology, risk factors, pathology and symptoms. *Tumori* 81,

- 122-125 (1995).
23. Pia de la Maza, M., y col. Acute nutritional and intestinal changes after pelvic radiation. *J Am Coll Nutr* 20, 637-642 (2001).
24. Leiper, K. & Morris, A.I. Treatment of radiation proctitis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19, 724-729 (2007).
- 5 25. Denton, A.S., Andreyev, H.J., Forbes, A. & Maher, E.J. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. *Br J Cancer* 87, 134-143 (2002).
26. Andreyev, J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 54, 1051-1054 (2005).
27. DeCosse, J.J., y col. The natural history and management of radiation induced injury of the gastrointestinal tract. *Ann Surg* 170, 369-384 (1969).
- 10 28. Libotte, F., y col. Survival of patients with radiation enteritis of the small and the large intestine. *Acta Chir Belg* 95, 190-194 (1995).
29. Galland, R.B. & Spencer, J. The natural history of clinically established radiation enteritis. *Lancet* 1, 1257-1258 (1985).
- 15 30. Classen, J., y col. Radiation-induced gastrointestinal toxicity. Pathophysiology, approaches to treatment and prophylaxis. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 3, 82-84 (1998).
31. Donaldson, S.S., y col. Radiation enteritis in children. A retrospective review, clinicopathologic correlation, and dietary management. *Cancer* 35, 1167-1178 (1975).
32. Voitk, A.J., Brown, R.A., McArdle, A.H., Hinchey, E.J. & Gurd, F.N. Clinical uses of an elemental diet: preliminary studies. *Can Med Assoc J* 107, 123-129 (1972).
- 20 33. Klimberg, V.S., y col. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* 66, 62-68 (1990).
34. Klimberg, V.S., y col. Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg* 125, 1040-1045 (1990).
- 25 35. Jensen, J.C., y col. Prevention of chronic radiation enteropathy by dietary glutamine. *Ann Surg Oncol* 1, 157-163 (1994).
36. Kozelsky, T.F., y col. Phase III double-blind study of glutamine versus placebo for the prevention of acute diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy. *J Clin Oncol* 21, 1669-1674 (2003).
37. Silvain, C., y col. Long-term outcome of severe radiation enteritis treated by total parenteral nutrition. *Dig Dis Sci* 37, 1065-1071 (1992).
- 30 38. Ekelund, M., Kristensson, E. & Ekblad, E. Total parenteral nutrition causes circumferential intestinal atrophy, remodeling of the intestinal wall, and redistribution of eosinophils in the rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 52, 1833-1839 (2007).
39. Jackson, W.D. & Grand, R.J. The human intestinal response to enteral nutrients: a review. *J Am Coll Nutr* 10, 500-509 (1991).
- 35 40. Burrin, D.G., y col. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: how much is enough? *Am J Clin Nutr* 71, 1603-1610 (2000).
41. Drucker, D.J., y col. Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide-2. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23, S98-100 (1999).
- 40 42. Niinikoski, H., y col. Onset of small intestinal atrophy is associated with reduced intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets. *J Nutr* 134, 1467-1474 (2004).
43. Matheson, P.J., Wilson, M.A. & Garrison, R.N. Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res* 93, 182-196 (2000).
44. Nowicki, P.T., Stonestreet, B.S., Hansen, N.B., Yao, A.C. & Oh, W. Gastrointestinal blood flow and oxygen consumption in awake newborn piglets: effect of feeding. *Am J Physiol* 245, G697-702 (1983).
- 45 45. van Goudoever, J.B., y col. Secretion of trophic gut peptides is not different in bolus- and continuously fed piglets. *J Nutr* 131, 729-732 (2001).
46. Knickelbein, R., Aronson, P.S., Schron, C.M., Seifter, J. & Dobbins, J.W. Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling. *The American Journal of Physiology* 249, G236-245 (1985).
- 50 47. Field, M., Fromm, D. & McColl, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. *Am J Physiol* 220, 1388-1396 (1971).
48. Sellin, J.H. & DeSoignie, R. Rabbit proximal colon: a distinct transport epithelium. *Am J Physiol* 246, G603-610 (1984).
- 55 49. Turnberg, L.A., Bieberdorf, F.A., Morawski, S.G. & Fordtran, J.S. Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium, and hydrogen transport in the human ileum. *J Clin Invest* 49, 557-567 (1970).
50. Bach, S.P., Renehan, A.G. & Potten, C.S. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21, 469-476 (2000).
51. Kaur, P. & Potten, C.S. Cell migration velocities in the crypts of the small intestine after cytotoxic insult are not dependent on mitotic activity. *Cell Tissue Kinet* 19, 601-610 (1986).
- 60 52. Qiu, J.M., Roberts, S.A. & Potten, C.S. Cell migration in the small and large bowel shows a strong circadian rhythm. *Epithelial Cell Biol* 3, 137-148 (1994).
53. Al-Dewachi, H.S., Wright, N.A., Appleton, D.R. & Watson, A.J. The effect of a single injection of hydroxyurea on cell population kinetics in the small bowel mucosa of the rat. *Cell Tissue Kinet* 10, 203-213 (1977).
- 65 54. Hendry, J.H., y col. The response of murine intestinal crypts to short-range promethium-147 beta irradiation: deductions concerning clonogenic cell numbers and positions. *Radiat Res* 118, 364-374 (1989).

55. Okine, E.K., Glimm, D.R., Thompson, J.R. & Kennelly, J.J. Influence of stage of lactation on glucose and glutamine metabolism in isolated enterocytes from dairy cattle. *Metabolism* 44, 325-331 (1995).
56. Alpers, D.H. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells? *Curr Opin Gastroenterol* 16, 155 (2000).
57. Wu, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 128, 1249-1252 (1998).
58. Tome, D. & Bos, C. Lysine requirement through the human life cycle. *J Nutr* 137, 1642S-1645S (2007).
59. Vayro, S., Lo, B. & Silverman, M. Functional studies of the rabbit intestinal Na⁺/glucose carrier (SGLT1) expressed in COS-7 cells: evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na⁺-activation of the carrier. *Biochem J* 332 (Pt 1), 119-125 (1998).
60. Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E.M. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci EEUU* 93, 13367-13370 (1996).
61. Benson, A.B., 3rd, y col. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *J Clin Oncol* 22, 2918-2926 (2004).
62. Mehta, D.I., Horvath, K., Chanasongcram, S., Hill, I.D. & Panigrahi, P. Epidermal growth factor up-regulates sodium-glucose cotransport in enterocyte models in the presence of cholera toxin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 21, 185-191 (1997).
63. Thomson, A.B., Cheeseman, C.I. & Walker, K. Late effects of abdominal radiation on intestinal uptake of nutrients. *Radiat Res* 107, 344-353 (1986).
64. Porteous, J.W. Intestinal metabolism. *Environ Health Perspect* 33, 25-35 (1979).
65. Balda, M.S. & Matter, K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 19, 2024-2033 (2000).
66. Stefani, E. & Cereijido, M. Electrical properties of cultured epithelioid cells (MDCK). *J Membr Biol* 73, 177-184 (1983).
67. González-Mariscal, L., Chávez de Ramírez, B., Lázaro, A. & Cereijido, M. Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities. *J Membr Biol* 107, 43-56 (1989).
68. Souba, W.W., Scott, T.E. & Wilmore, D.W. Intestinal consumption of intravenously administered fuels. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 9, 18-22 (1985).
69. Cardona Pera, D. [Administration of glutamine and its dipeptides in parenteral nutrition. Which patients are candidates?]. *Nutr Hosp* 13, 8-20 (1998).
70. Joiner, W.J., y col. Active K⁺ secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G185-196 (2003).
71. Vidyasagar, S. & Ramakrishna, B.S. Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon. *J Physiol (Lond)* 539, 163-173 (2002).
72. Vidyasagar, S., Barmeyer, C., Geibel, J., Binder, H.J. & Rajendran, V.M. Role of Short-Chain Fatty Acids in Colonic HCO₃ Secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G1217-1226 (2005).
73. Vidyasagar, S., Rajendran, V.M. & Binder, H.J. Three distinct mechanisms of HCO₃-secretion in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C612-621 (2004).
74. Zhang, H., Ameen, N., Melvin, J.E. & Vidyasagar, S. Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum. *J Physiol* 581, 1221-1233 (2007).
75. Hopfer, U., Nelson, K., Perrotto, J. & Isselbacher, K.J. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *J Biol Chem* 248, 25-32 (1973).
76. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976).
77. Heath, J.P. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* 20, 139-146 (1996).
78. Reagan-Shaw, S., Nihal, M. & Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22, 659-661 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica estéril para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene atrofia de las vellosidades producida por radiación o quimioterapia, en la que la composición se formula para administración enteral y comprende uno o más aminoácidos seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y agua; en la que la composición tiene una osmolaridad total de 230 mosm a 280 mosm y en la que la composición no comprende uno o más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina y metionina, o, si estos ingredientes están presentes, la glucosa está presente a una concentración inferior a 1 g/l, la glutamina está presente a una concentración inferior a 300 mg/l y la metionina está presente a una concentración inferior a 300 mg/l.
2. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición no comprende glucosa, glutamina o metionina.
3. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además electrolitos, vitaminas, minerales y/o agentes aromatizantes.
4. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el objeto es un ser humano.
5. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene al menos una reducción del 10 % en el número total de células epiteliales intestinales pequeñas en la región de las vellosidades, cuando se compara con lo normal.
6. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene al menos una pérdida del 10 % en la altura de las vellosidades en el intestino delgado, cuando se compara con lo normal.
7. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición se administra durante un periodo de 1 a 14 días después de que el sujeto reciba radiación o quimioterapia.
8. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 7, usada para tratar enteritis por radiación.
9. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, usada para tratar lesión del intestino delgado producida por quimioterapia o por agentes citotóxicos seleccionados de cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), hidroxiurea, etopósido, arabinósido, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, metotrexato, esteroides, o una combinación de los mismos.
10. La composición terapéutica para su uso según la reivindicación 1, usada para tratar enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis ulcerosa, úlceras duodenales o enfermedades de Crohn.
11. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende los aminoácidos libres lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina.
12. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende los aminoácidos libres lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina y serina.
13. Una composición terapéutica estéril para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición está formulada para administración enteral y consiste esencialmente en uno o más aminoácidos libres seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y agua y opcionalmente comprende además electrolitos, vitaminas, minerales y/o agentes aromatizantes; en la que la composición tiene una osmolaridad total de 230 mosm a 280 mosm y en la que la composición no comprende uno o más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina y metionina o, si estos ingredientes están presentes, la glucosa está presente en una concentración de menos de 1g/l, la glutamina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l y la metionina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l.
14. Una composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición está formulada para administración enteral y consiste en uno o más aminoácidos libres seleccionados entre lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina y agua y, opcionalmente comprende además electrolitos, vitaminas, minerales y/o agentes aromatizantes; en la que la composición tiene una osmolaridad total de 230 mosm a 280 mosm y en la que la composición no comprende uno o más ingredientes seleccionados entre glucosa, glutamina y metionina o, si estos ingredientes están presentes, la glucosa está presente en una concentración de menos de 1g/l, la glutamina está presente en una concentración de menos de 300 mg/l y la metionina está presente a una concentración de menos de 300 mg/l.

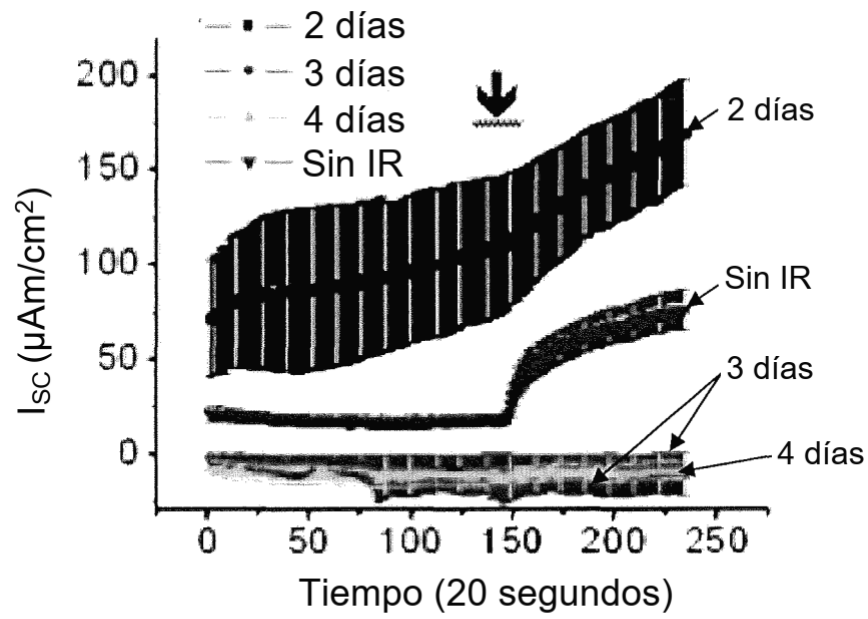


FIG. 1A

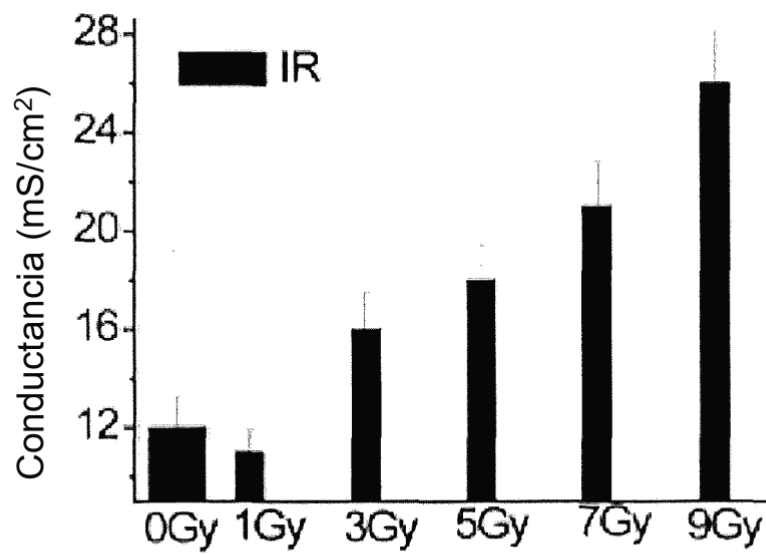


FIG. 1B

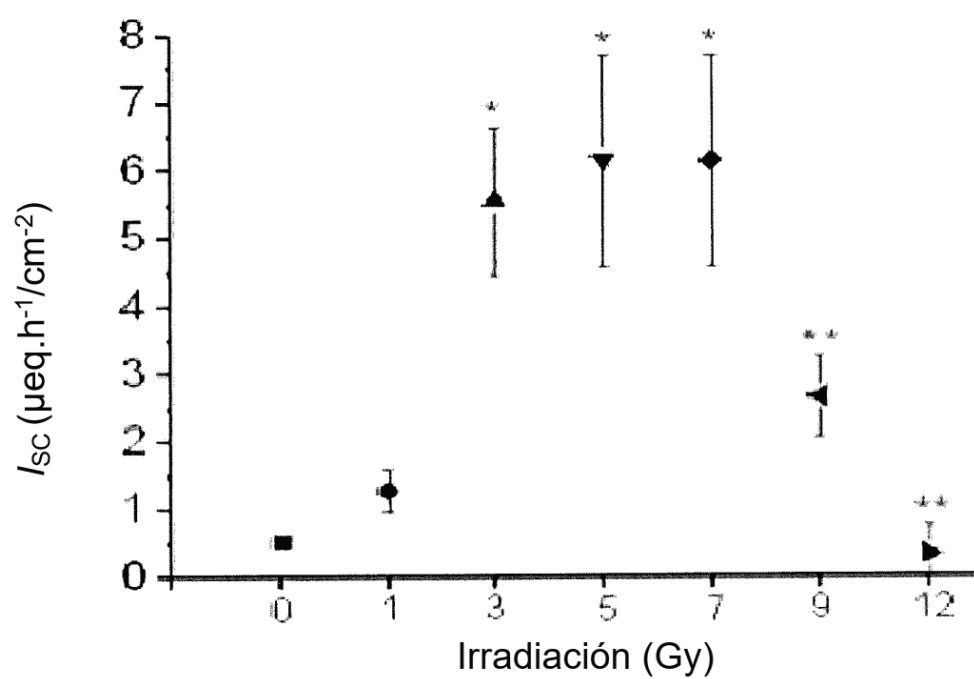


FIG. 2A

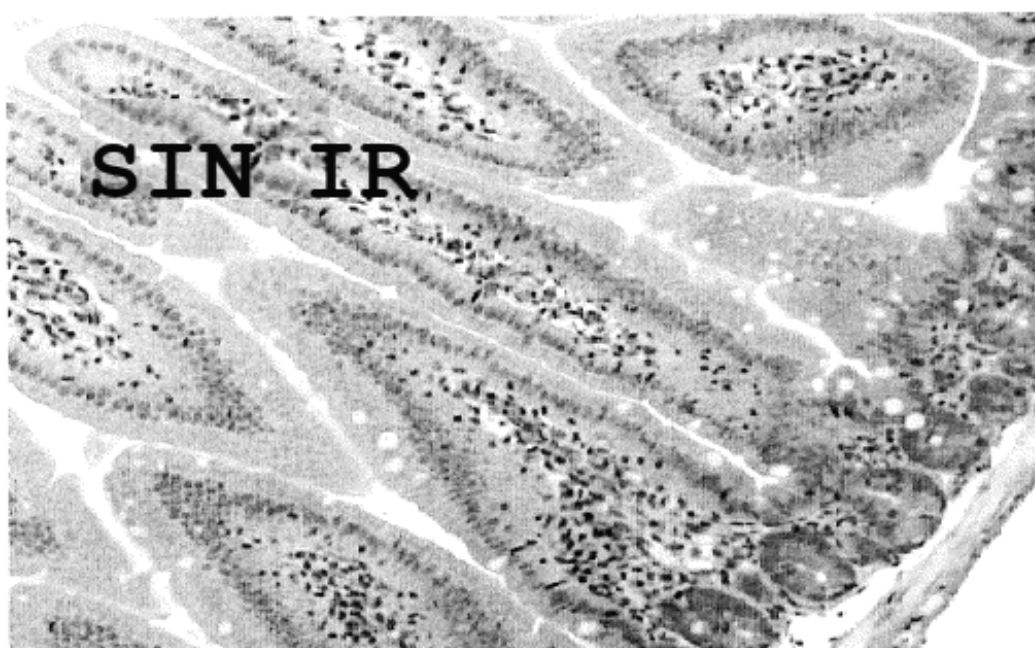


FIG. 2B



FIG. 2C

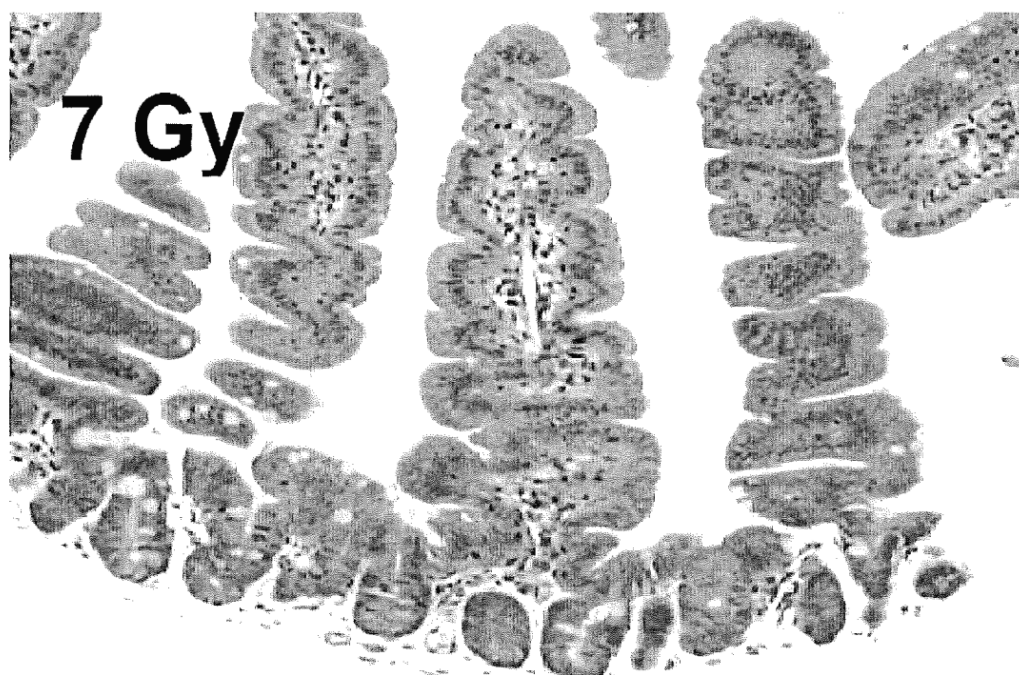


FIG. 2D

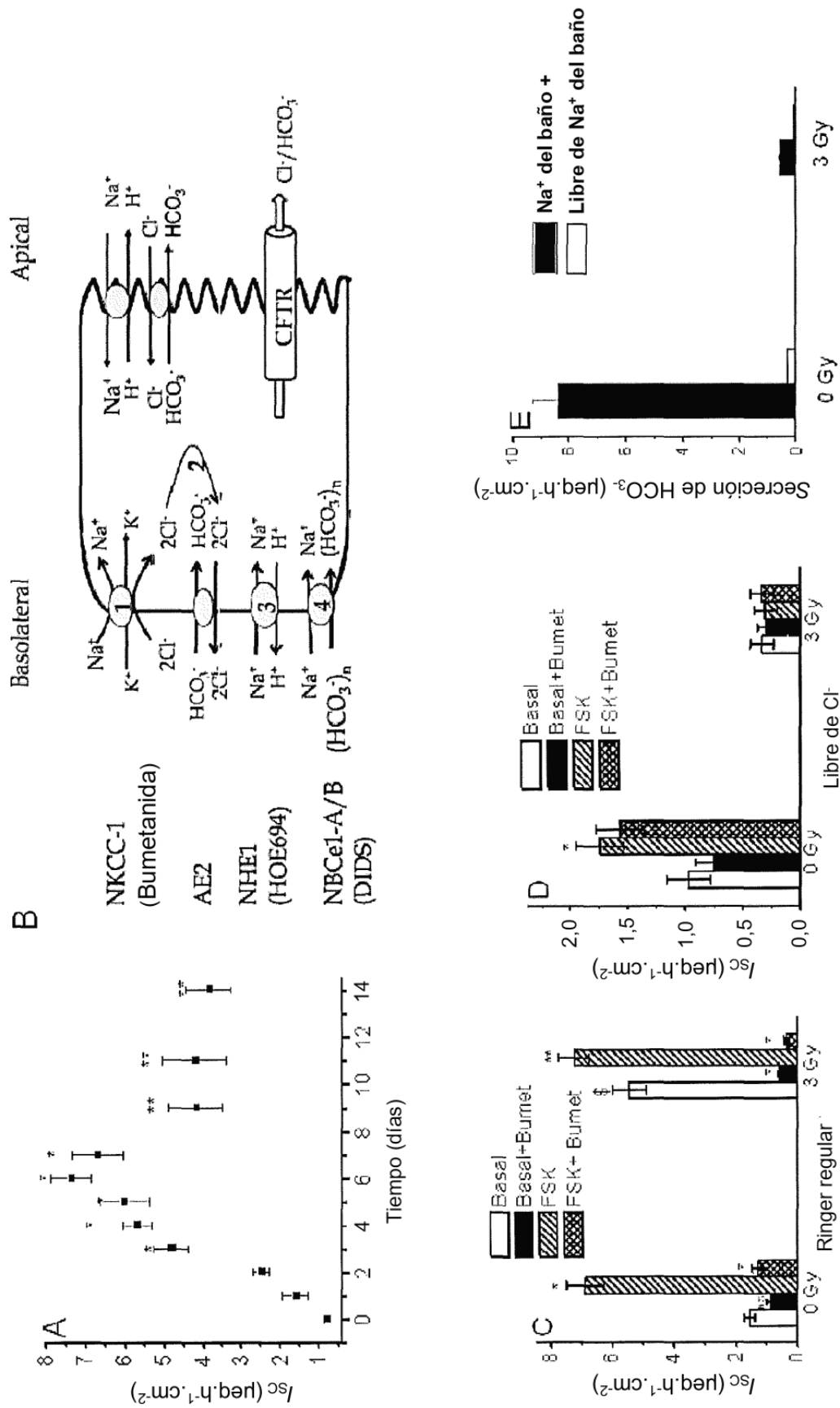


FIG. 3

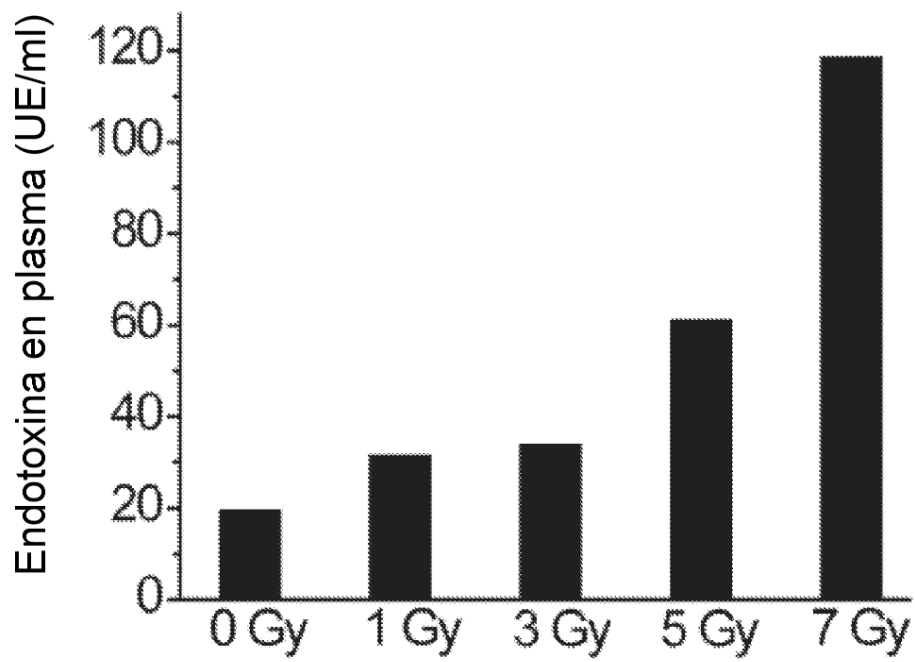


FIG. 4A

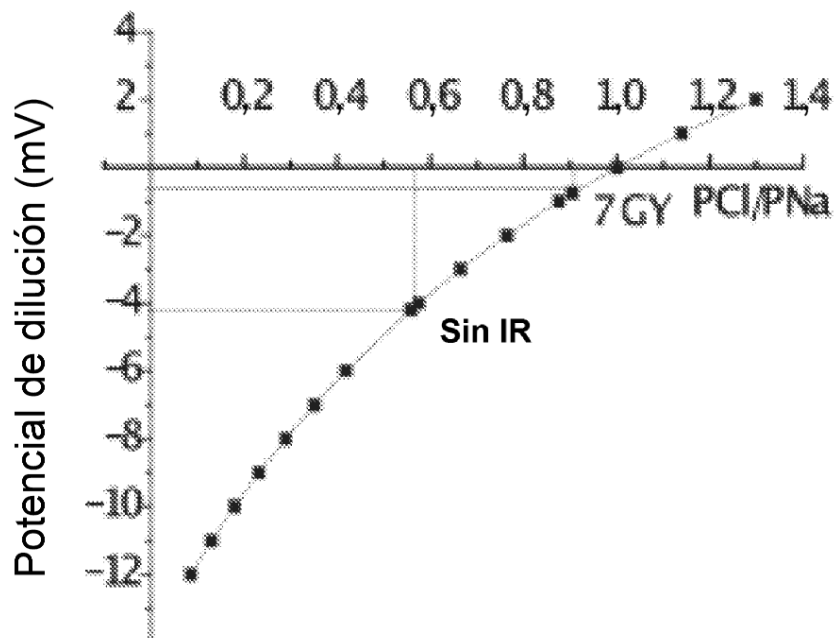


FIG. 4B

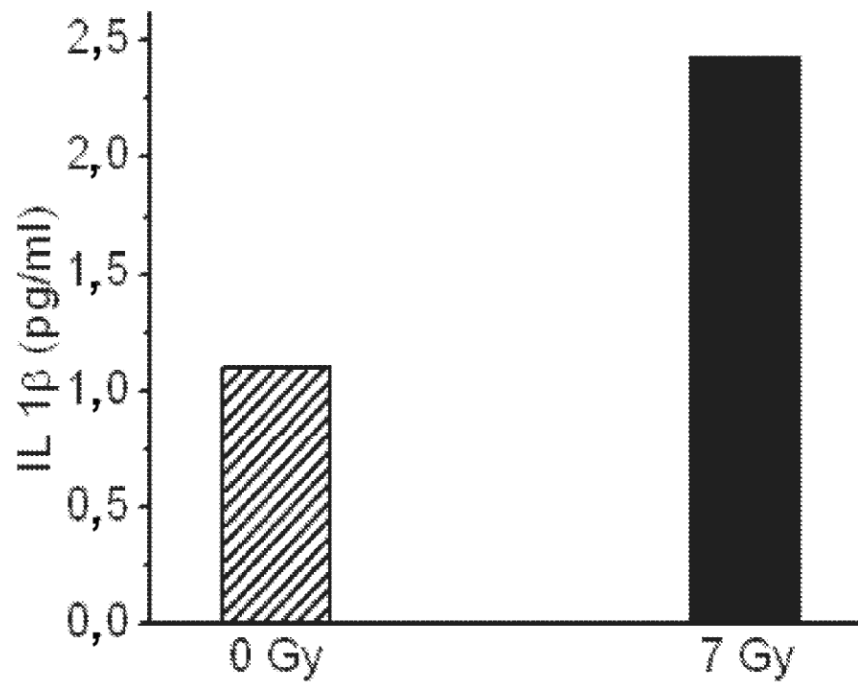


FIG. 5A

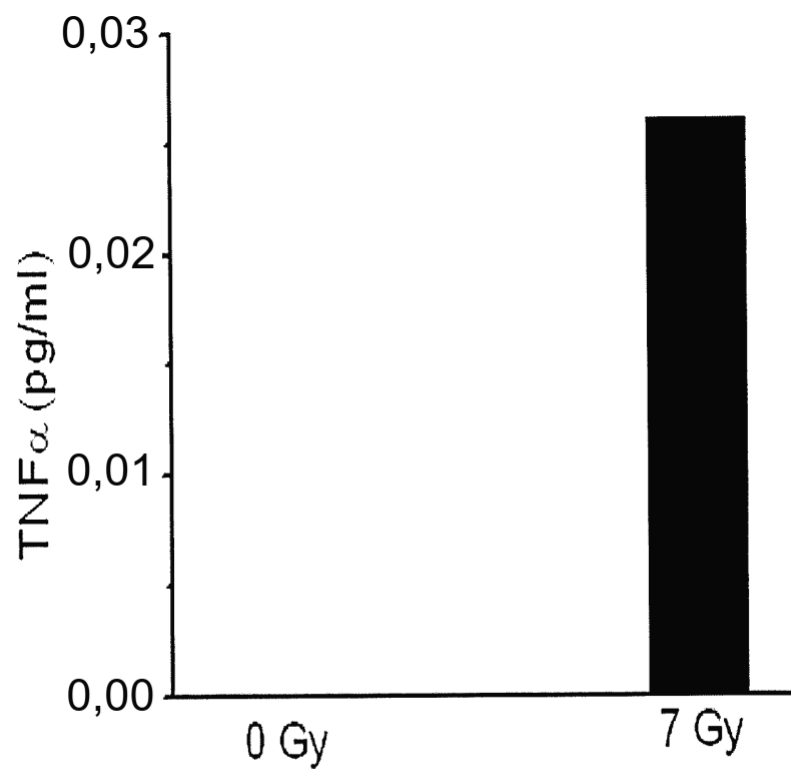


FIG. 5B

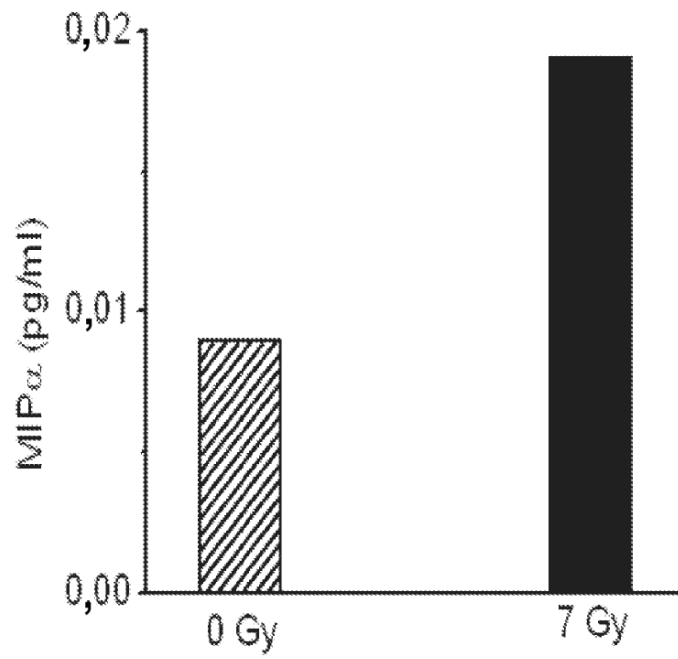


FIG. 5C

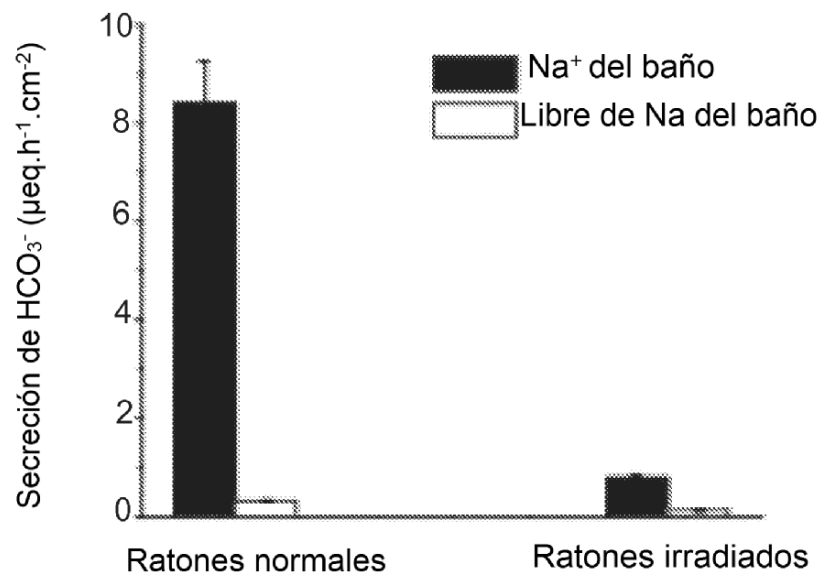


FIG. 6A

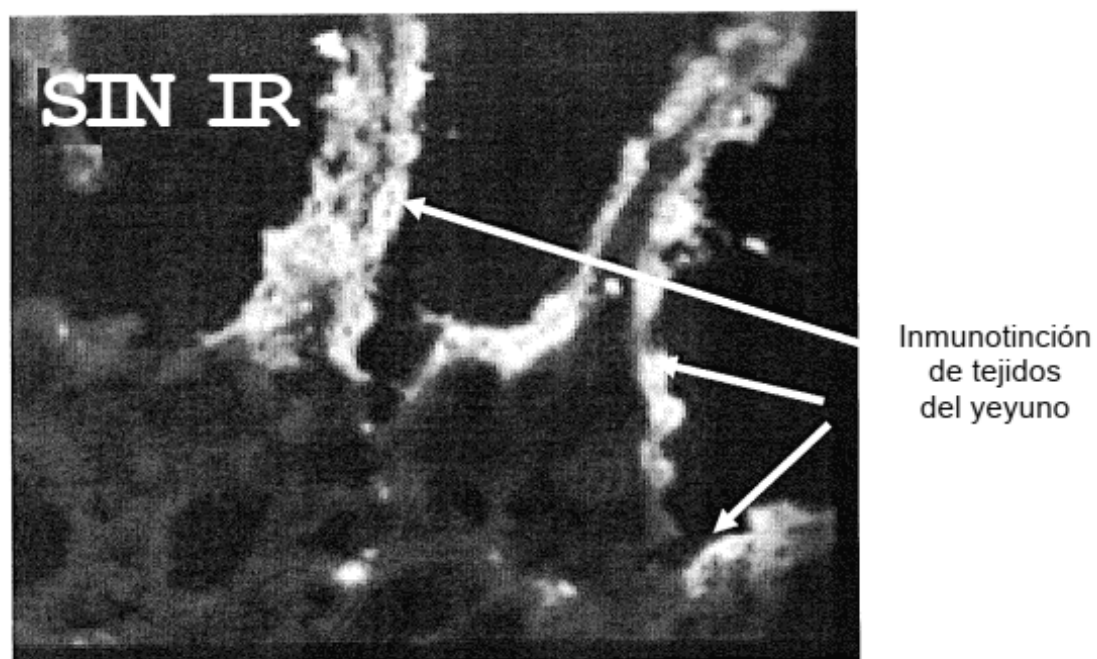


FIG. 6B



FIG. 6C

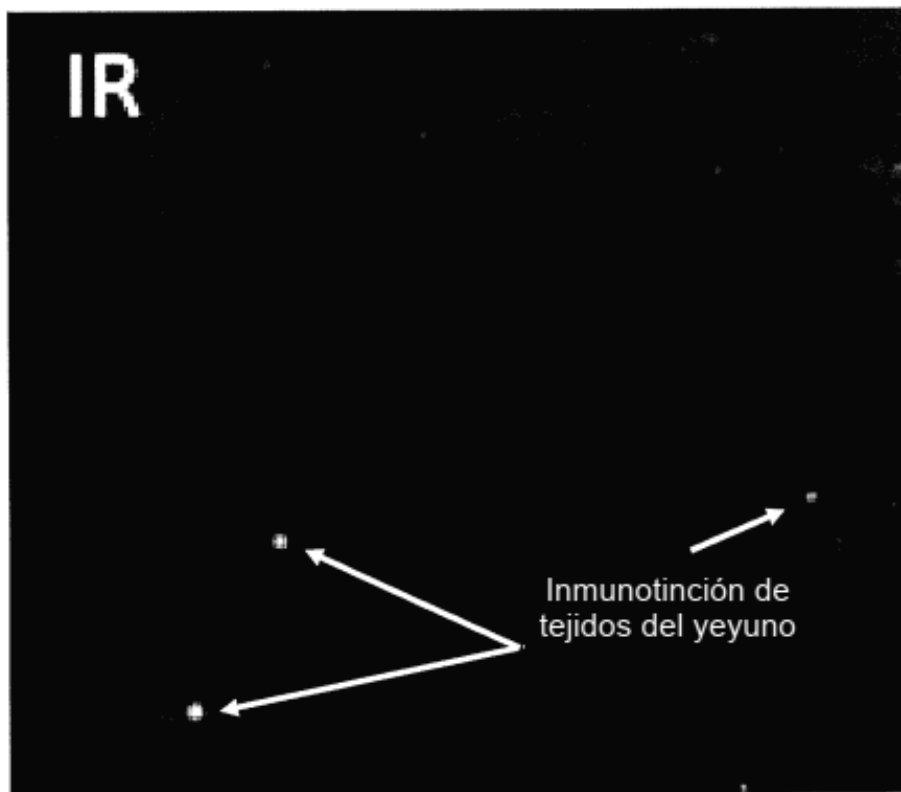


FIG. 6D



FIG. 6E

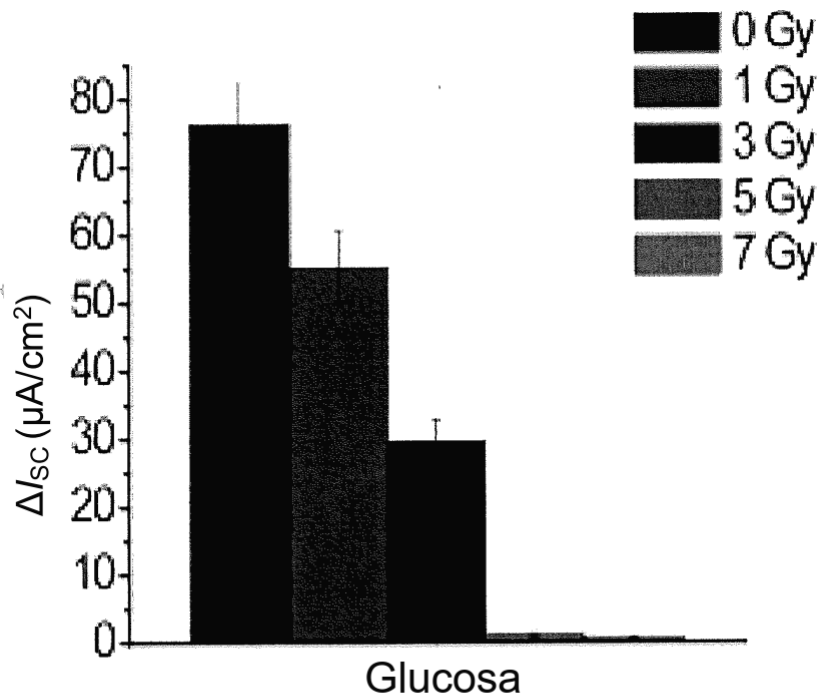


FIG. 7A

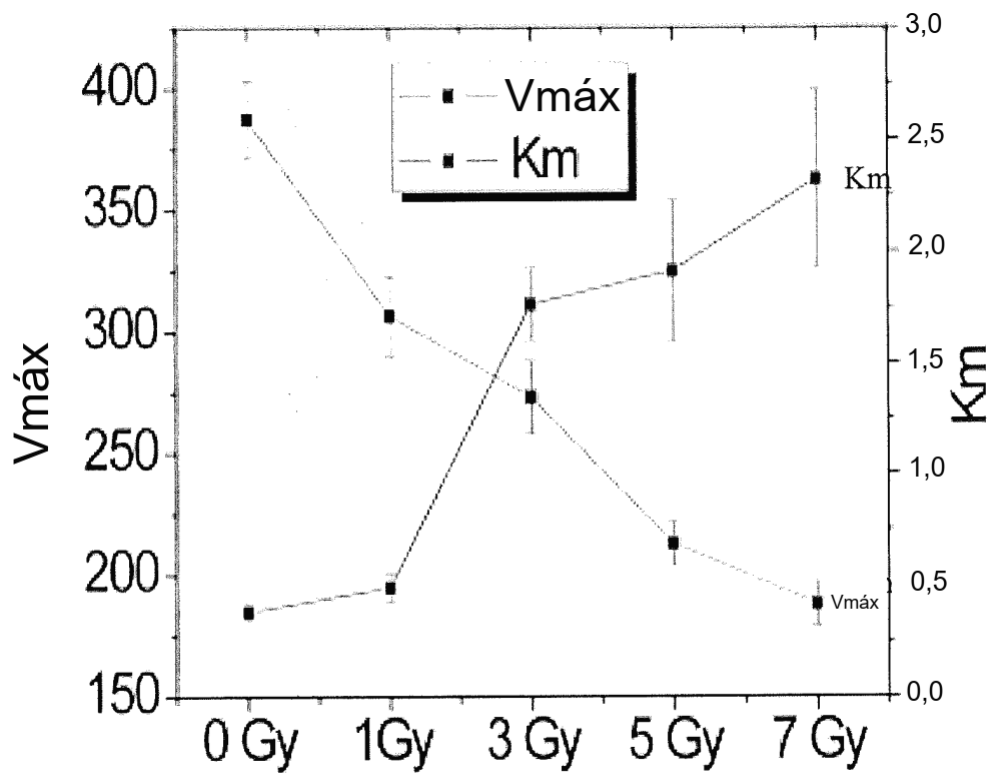


FIG. 7B

Cambio en la corriente estimulada con glucosa (Δ) después de dosis de radiación diferentes en ratones Swiss

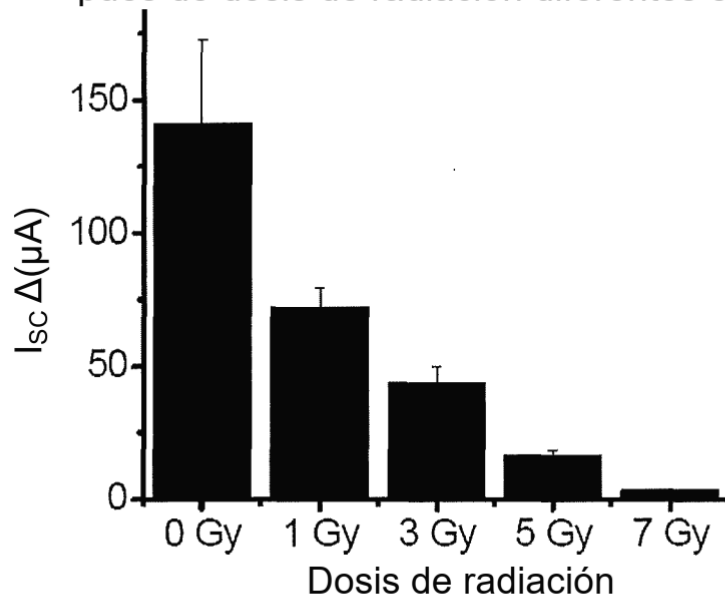


FIG. 8

Curva saturada de glucosa de tejido normal

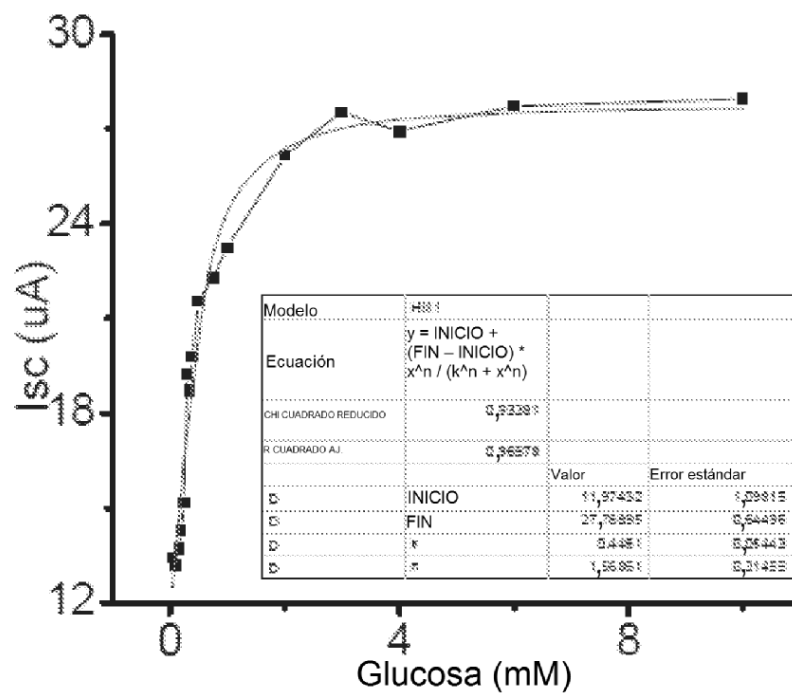


FIG. 9A

Cambio en K_m después de dosis de radiación
diferentes en ratones Swiss

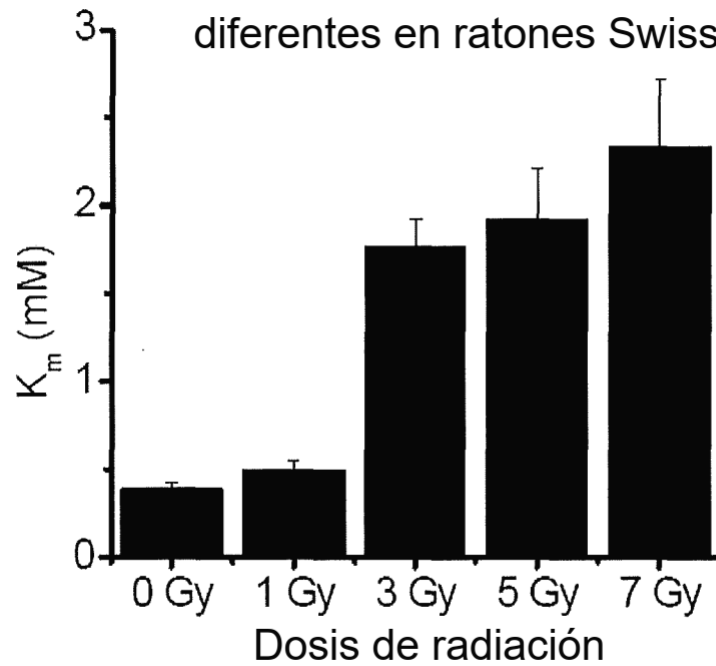


FIG. 9B

Cambio en $V_{m\acute{a}x}$ después de dosis de radiación
diferentes en ratones Swiss

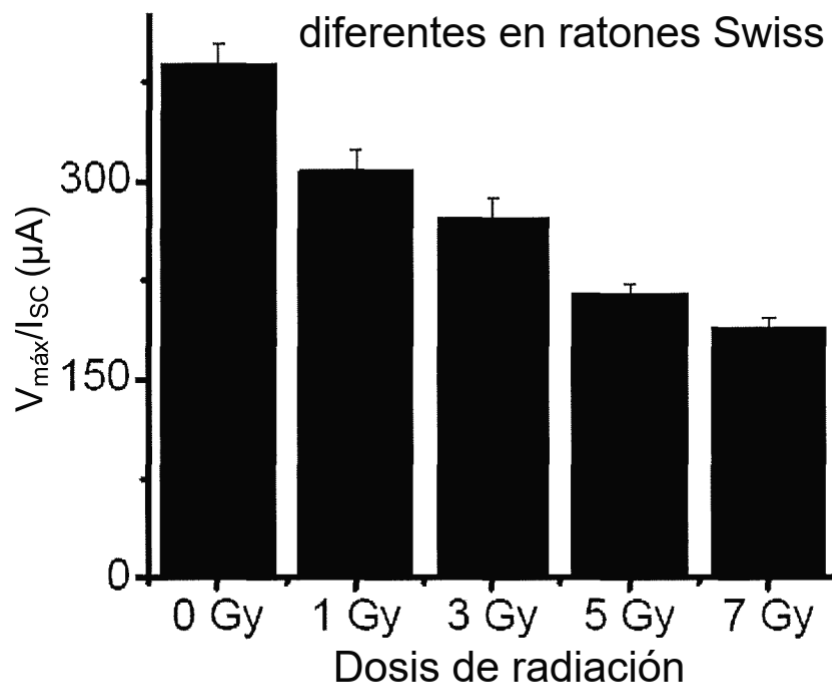


FIG. 10

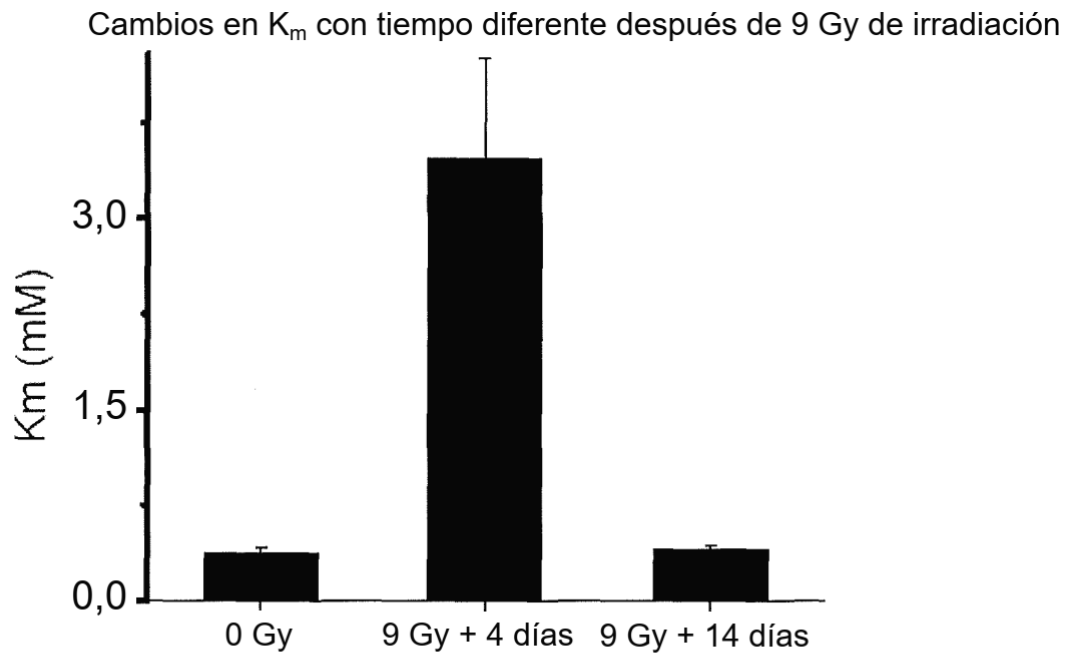


FIG. 11

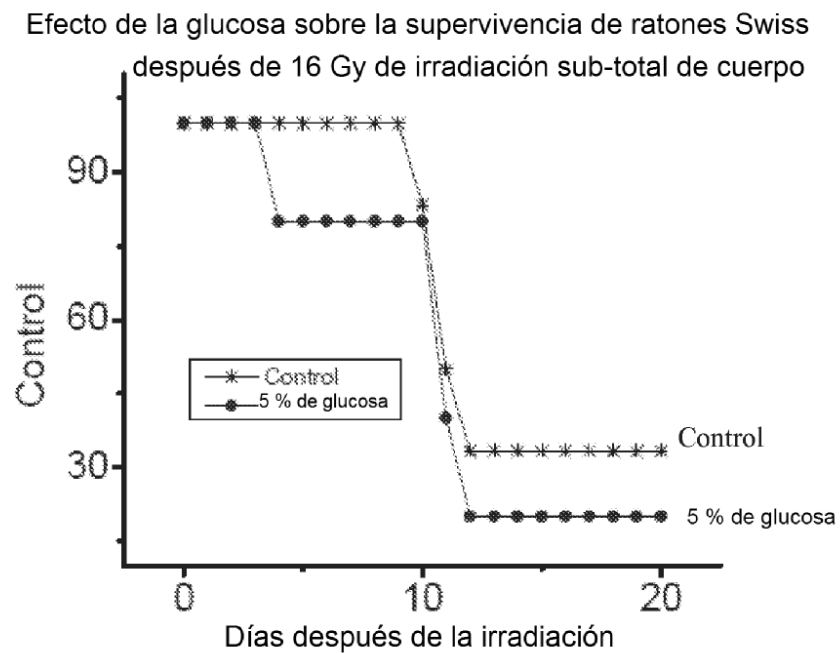


FIG. 12A

Efecto de la glucosa sobre la supervivencia de ratones Swiss después de 9 de irradiación total del cuerpo

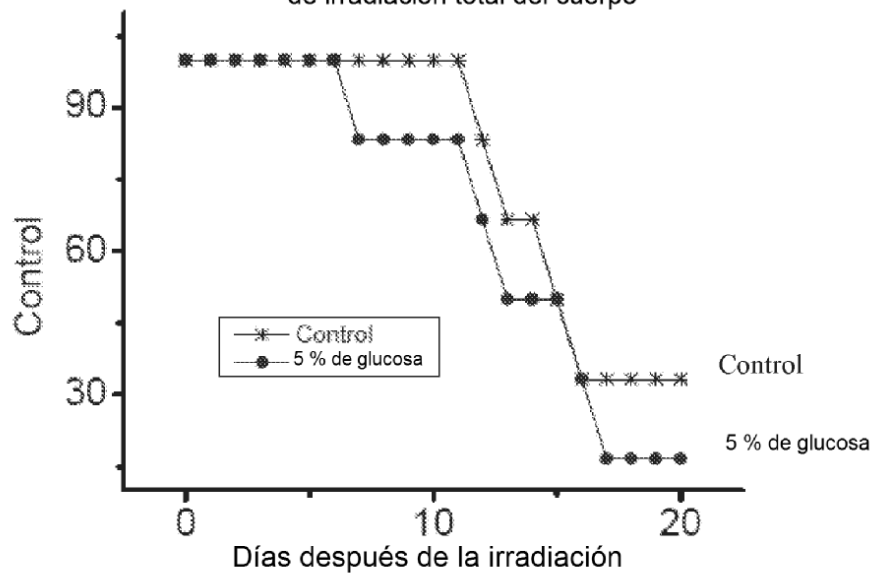


FIG. 12B

La expresión de SGLT-1 aumentó después de dosis de irradiación diferentes (lisados yeyunales)

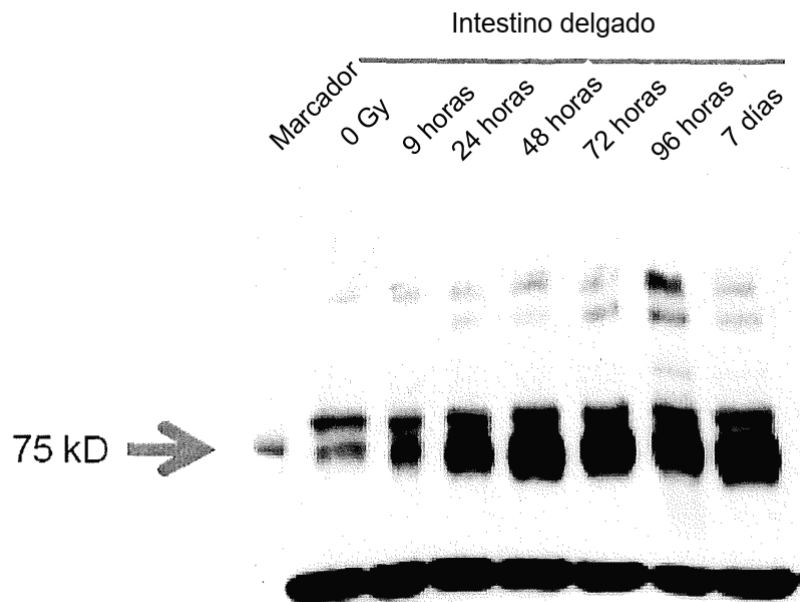


FIG. 13

La expresión de SGLT-1 aumentó después
de diferentes tiempos de irradiación
(vesículas de membrana del borde en cepillo)

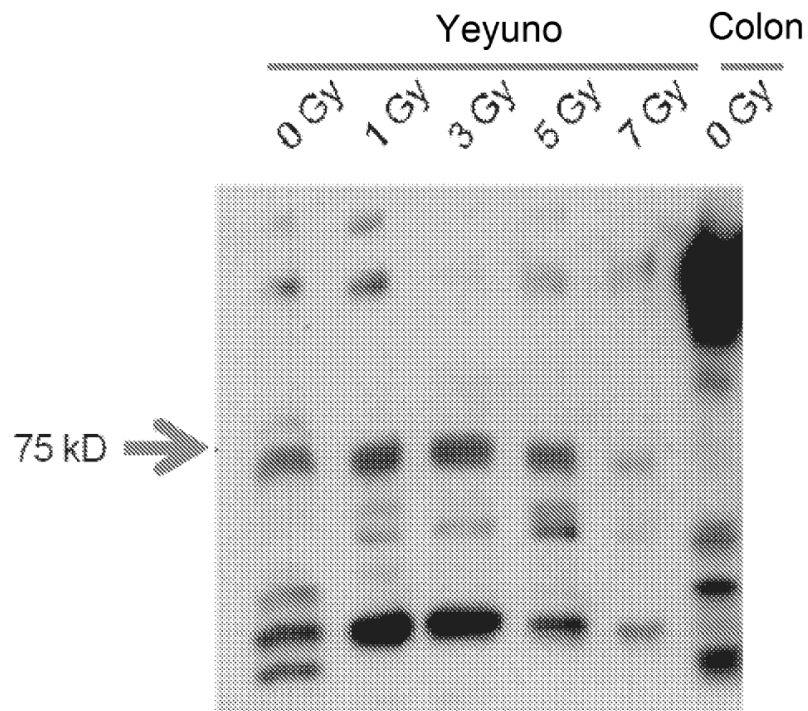


FIG. 14

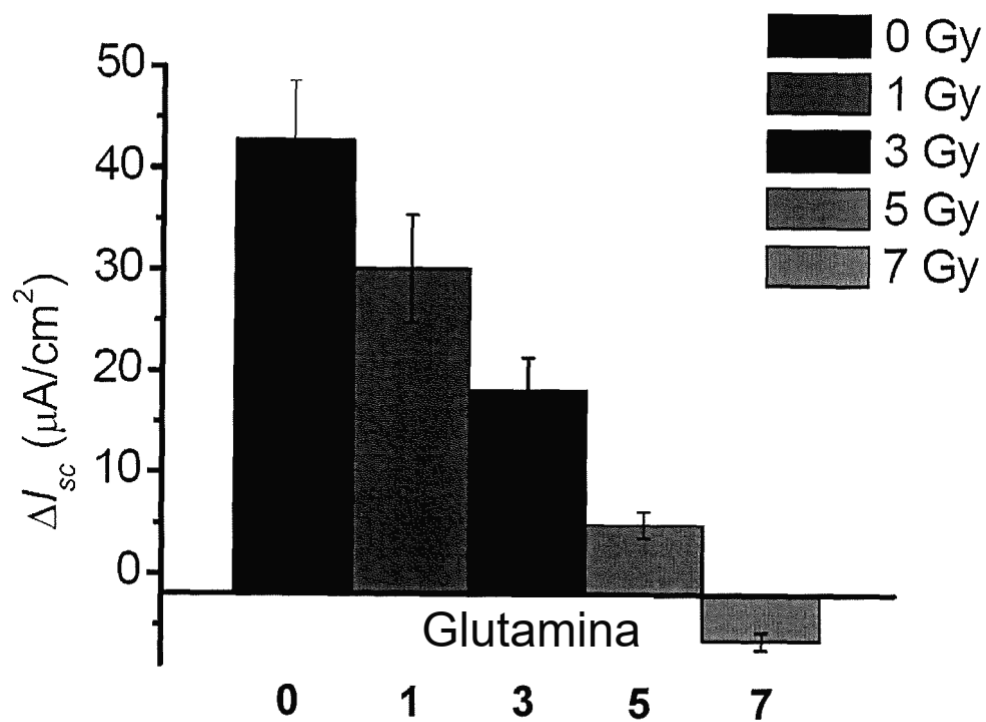


FIG. 15

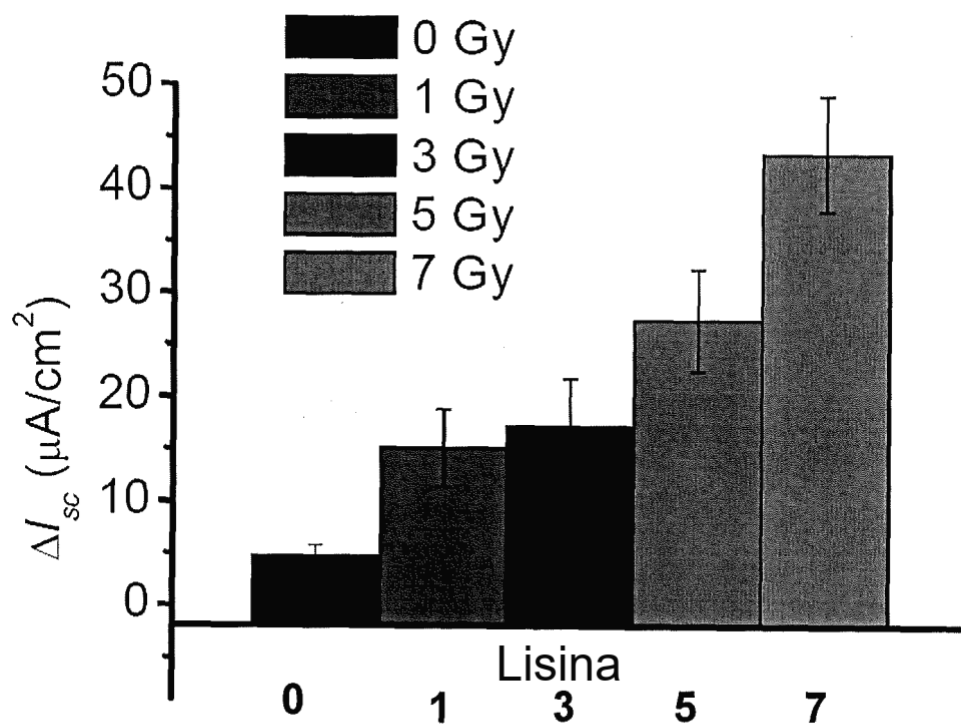


FIG. 16

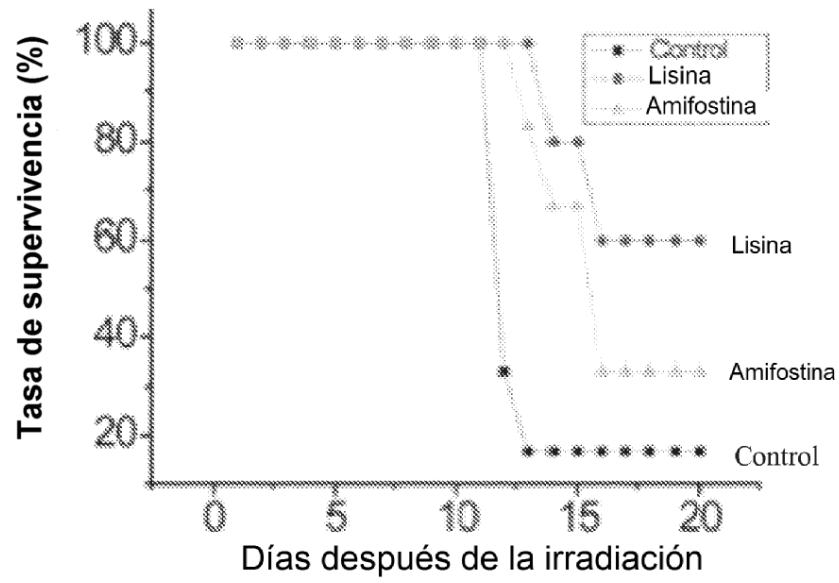


FIG. 17A

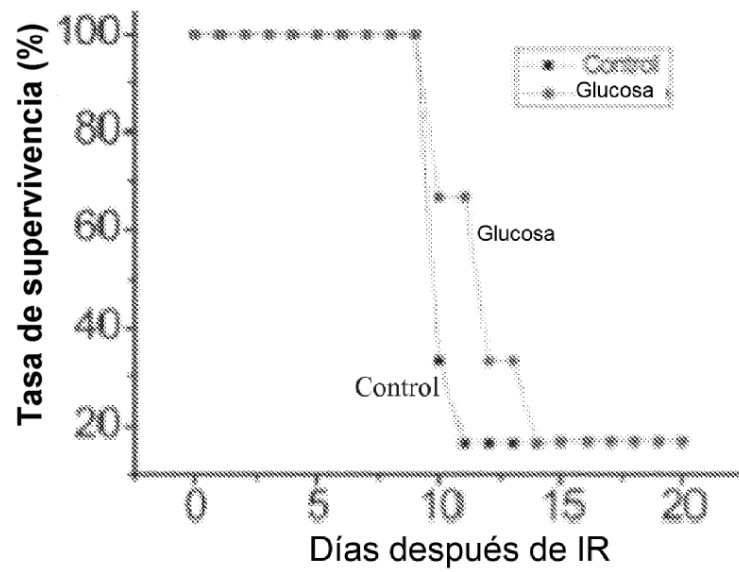


FIG. 17B

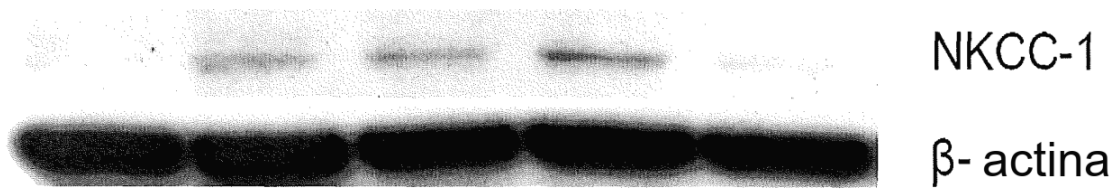


FIG. 18A

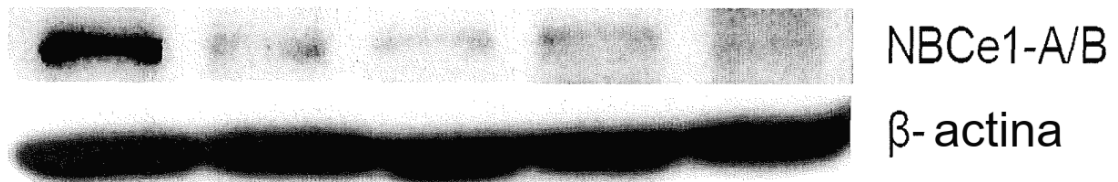


FIG. 18B

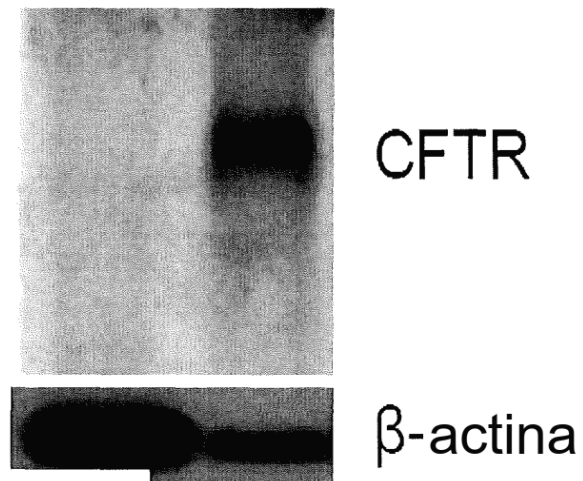


FIG. 18C

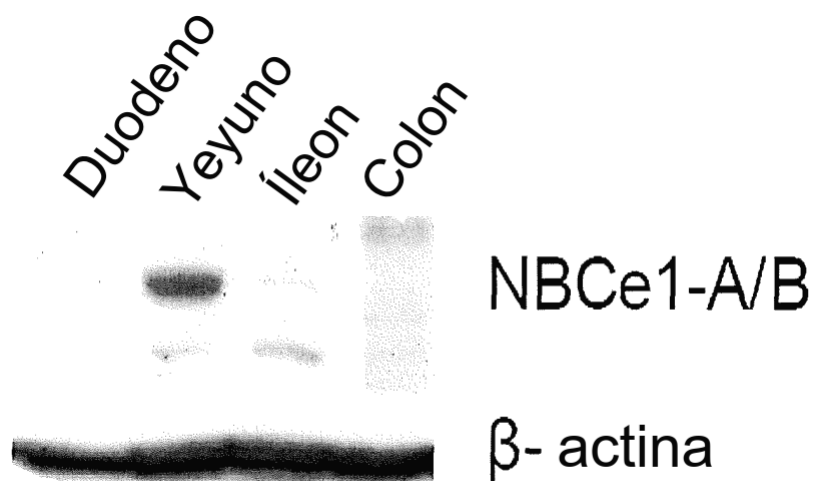


FIG. 18D

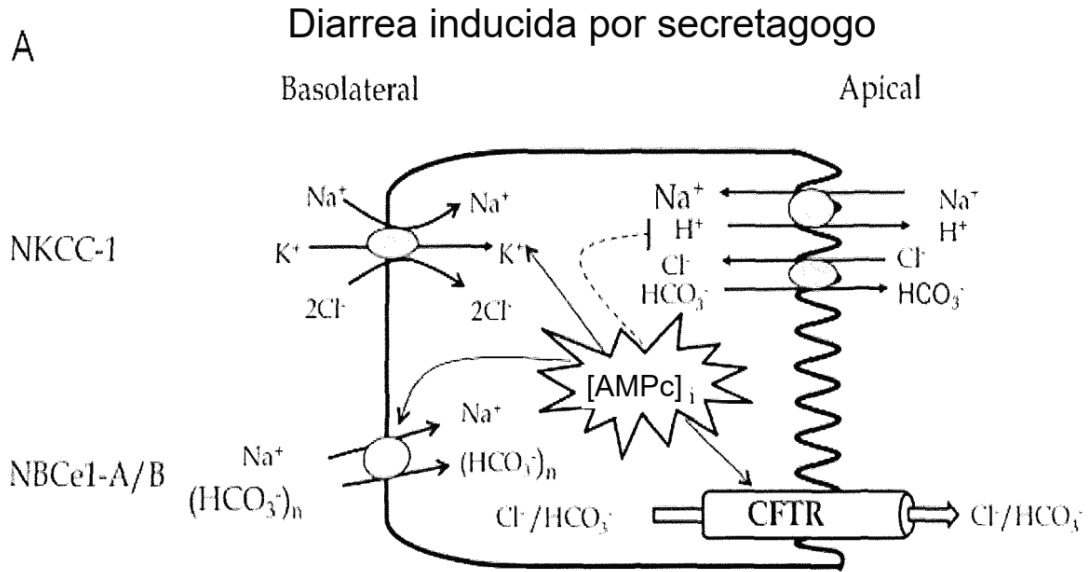


FIG. 19A

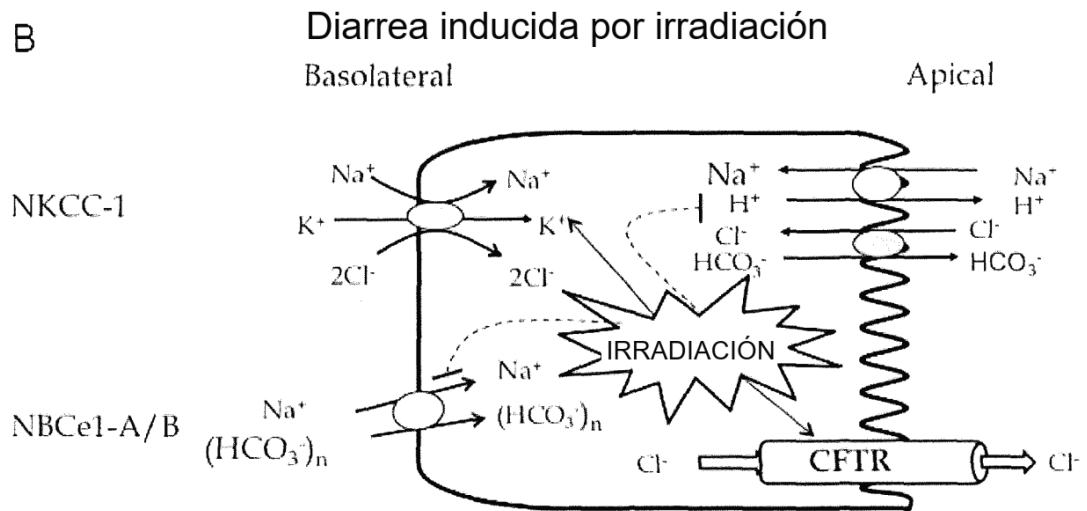


FIG. 19B

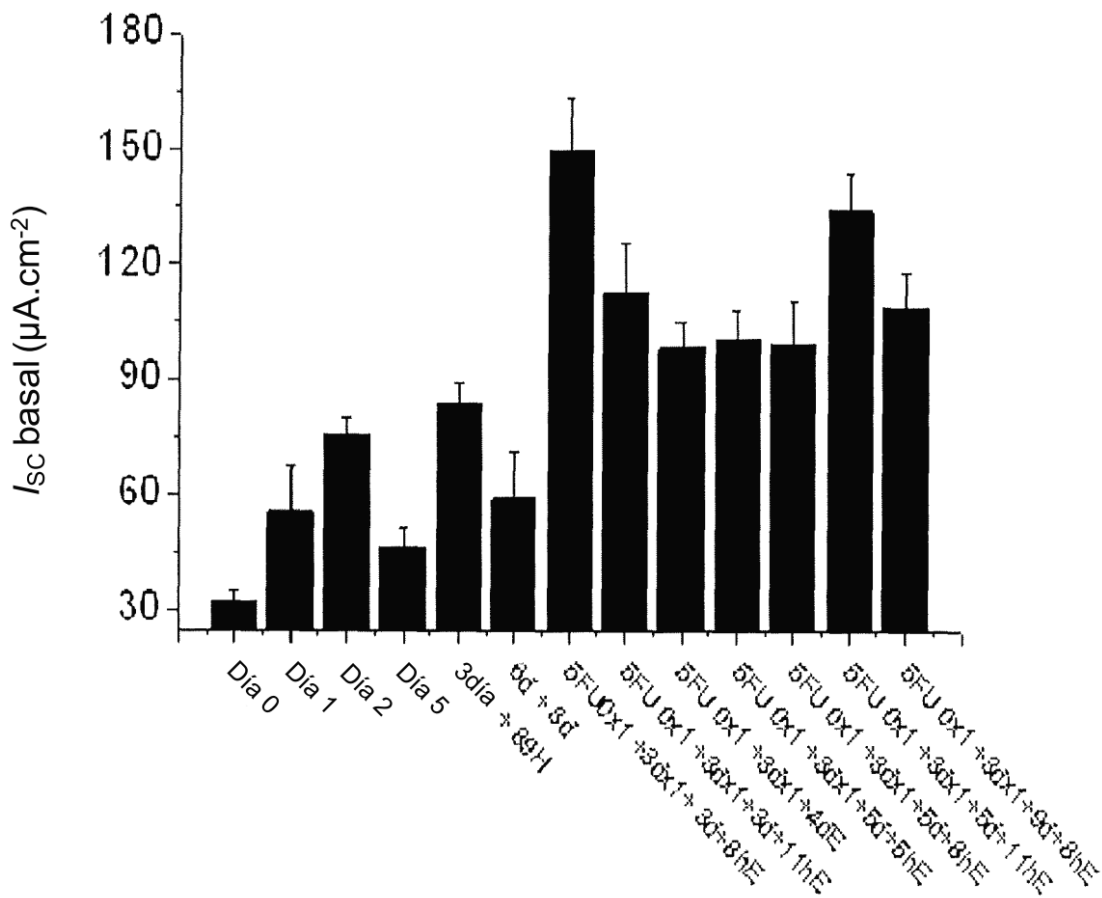


Fig. 20A

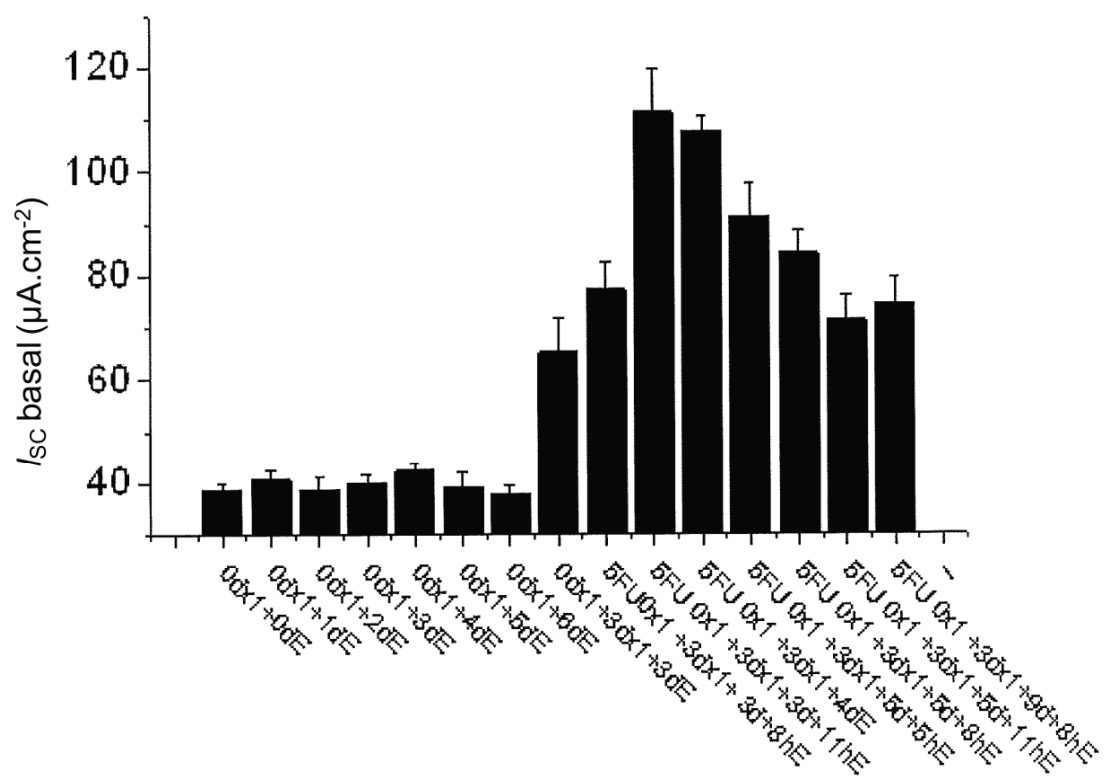


FIG. 20B

Trazo de registro de I_{sc} en diferentes composiciones

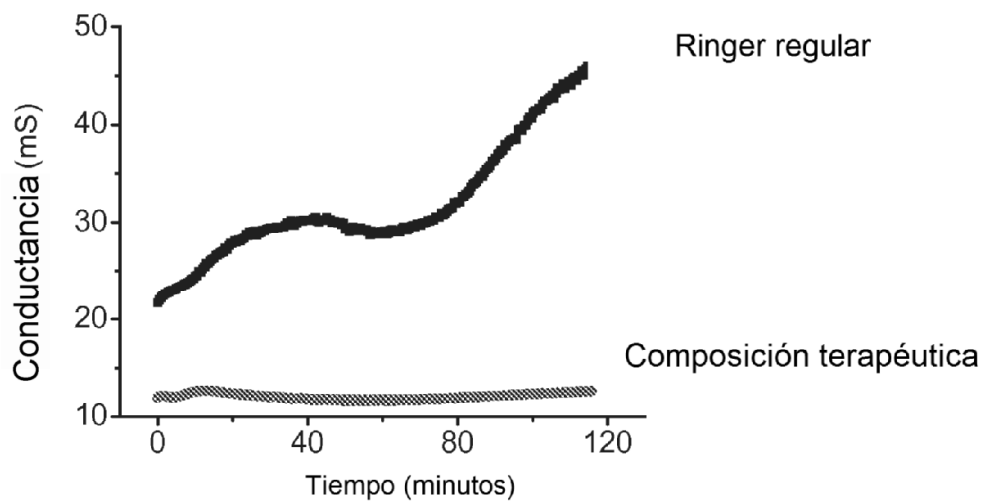


FIG. 21A

Diferencia de conductancia entre tejidos
en diferentes composiciones
(ratones tratados con 5FU)

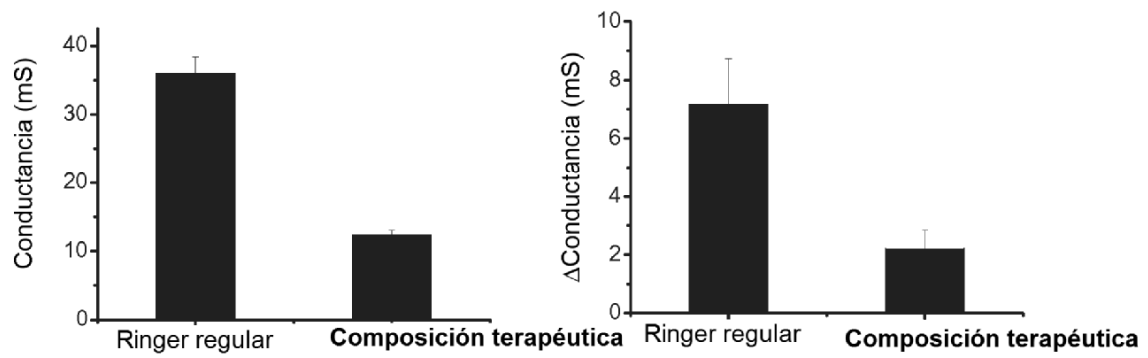


FIG. 21B