



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina

**NUEVOS TRITERPENOS HIDROXAMATOS COMO
ACTIVADORES DE HIF. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

**NEW HYDROXAMATES TRITERPENES AS ACTIVATORS OF HIF.
THERAPEUTIC IMPLICATIONS**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina
por**

M^a Eugenia Prados González

Directores

Eduardo Muñoz Blanco

Marco Antonio Calzado Canale

Córdoba, 21 de septiembre de 2021

TITULO: *Nuevos triterpenos hidroxamatos como activadores de HIF.
Implicaciones terapéuticas*

AUTOR: *María Eugenia Prados González*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Nuevos triterpenos hidroxamatos como activadores de HIF. Implicaciones terapéuticas.

DOCTORANDA: María Eugenia Prados González

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Tesis Doctoral presentada por la estudiante de doctorado María Eugenia Prados ha estudiado el mecanismo de acción y los efectos *in vitro* e *in vivo* del compuesto VCE-005.1, el cual ha sido seleccionado de una quimioteca de análogos para su desarrollo preclínico como potencial fármaco en diferentes aplicaciones.

VCE-005.1 es un triterpeno hidroxamato derivado del ácido Betulínico y la candidata a doctora ha demostrado los efectos antiinflamatorios, antifibróticos y neuroprotectores del mismo en diferentes modelos *in vivo* de enfermedad. También ha estudiado en detalle el mecanismo de acción del compuesto identificando su diana farmacológica. Además, se han obtenido datos de mucha relevancia sobre las farmacocinética, genotoxicidad, cardiotoxicidad y metabolismo del compuesto.

Es evidente que la Doctoranda ha aprendido y utilizado numerosas técnicas durante el período de tesis y ha publicado 6 artículos relacionados en mayor o menor medida con la Tesis. De esos 6 artículos, dos lo son de primera autora en revistas Q1 y además tiene en preparación otro artículo de primera autora directamente relacionado con la Tesis.

Por todas estas razones, consideramos que la tesis tiene suficientes méritos para ser defendida ante un comité de tesis y se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 21 de Septiembre de 2021

Firma de los directores

Fdo.: Eduardo Muñoz Blanco

Fdo.: Marco Antonio Calzado Canale

*Caminante no hay camino,
se hace camino al andar.*

Antonio Machado

AGRADECIMIENTOS

Aunque siempre me gustó la ciencia y la experiencia de lo que podía ser trabajar en un laboratorio me encantó, en mis planes nunca estuvo hacer la tesis, por lo que no deja de sorprenderme haber llegado a este punto. Sin embargo, aquí estamos, y no puedo estar más contenta por todo lo que he aprendido y las maravillosas personas que me han acompañado por el camino.

A la cabeza están mis directores de tesis. Eduardo, en el máster hiciste que me picara el gusanillo de la privada y más adelante me diste la oportunidad de formar parte de Emerald. En estos años me has enseñado que la ciencia no son sólo experimentos, que no hay resultados malos, que lo hay que hacer es leer y leer hasta encontrarles un sentido y que no hay nada que no se pueda conseguir con esfuerzo. Gracias por ser un pozo de conocimiento y dejarme aprender mil y una cosas de ti. Marco, siempre disponible para aconsejar sobre cualquier tema que necesitara ayuda, gracias por demostrar que eres la persona idónea para preguntar dudas de toda índole y hacer el día a día más llevadero comentando nuestros gustos en común.

Si no fuera por los que formáis parte de la empresa Emerald Health Biotechnology España esta tesis no habría sido posible, por eso gracias a todos los que estáis o habéis estado a lo largo de estos años. Ana, Laura, Valeriano, Juandi, Pilar, M^a Luz, Auxi, Bea, Jon, Fran (última incorporación, pero siempre dispuesto a alegrarnos el día con un flan o dos), pero especialmente a Nuria y Cristina, hicisteis que ir a trabajar fuera una alegría y demostrasteis que en ciertas ocasiones en el trabajo se pueden hacer amigas de verdad con las que contar siempre, fue una suerte encontraros.

Agradecer también a los postdoc del grupo por su experiencia y paciencia infinitas. Carmen, nunca las interminables horas de animalario habían sido tan amenas, gracias por estar siempre disponible para hablar de todo lo discutible en los modelos y después continuar para bingo. Adela, gracias por enseñarme cómo es una verdadera científica, tienes las manos, la mente y un corazón excepcionales, no habría llegado hasta aquí sin tu ayuda y ánimos inagotables, media tesis y que no me haya vuelto loca es mérito tuyo. Juan Antonio, mi compi con los pedidos, eres el pilar del grupo, gracias por no desesperarte con mis infinitos “hola, ¿tienes un momentito?”, compartir conversaciones junto al Berthold y por irme a la par a la hora de decir barbaridades durante los almuerzos, que volverán, tranquilo que volverán.

A los chicos de Marco, Alex, mi no compañero de despacho y tareas, eres el que más pegos míos ha aguantado y aguantará... sumimaseñ. El pack Rafa-Laura, gracias por estar animados y dispuestos para un chinchorro rápido de desconexión cuando hace falta. Lucía, siempre con una sonrisa para alegrarnos el día, intentaré no robarte más el incubador, pero no prometo nada.

A los que han pasado y han dejado una huella imborrable. Belén, al ser tu pinche me enseñaste a hacer de todo, gracias por tu infinita paciencia con mi inexperiencia en el mundo ratonil y cómo no, gracias por traer un poco de caos a mi psicosis con el orden. Ana, mi medio limón en el laboratorio, eres la mejor compañera que podía encontrar, cultivos ya no es lo mismo sin ti. Rosario, siempre ahí para un abrazo y para hablar de qué color nuevo podríamos probar de pelo. Estrella y Víctor, gracias a vosotros la adaptación al Imibic fue tan fácil, las pausas para desayunar se volvieron nuestro momento favorito. Martín, eres un crack y te haces querer como el que más con esa labia que tienes.

Dado que fueron los que me abrieron las puertas de un laboratorio por primera vez e hicieron que descubriera un nuevo mundo, no puedo dejar por agradecer al grupo de Biología Celular. Desde Justo, Raúl, M^a del Mar y Antonio Jesús a Alex, Manuel, David, André, Mari, Anabel y Antonio Carlos, siempre os voy a sentir como mis compañeros.

También agradecer a los amigos de siempre, Helena, Belén, Luis, Alberto y Fran, por estar ahí en el día a día con conversaciones random, ratos de juegos de mesa y series, y tardes de simples paseos, sois los mejores con los que forjar recuerdos imborrables.

Por supuesto GRACIAS a mi gran familia: padres, hermanos y cuñados, por haber hecho posible que llegara hasta aquí, por vuestra confianza, vuestros ánimos y vuestro apoyo inquebrantable. También por vuestras preguntas de “¿pero niña, ahora qué estás haciendo?”, “¿ya estás otra vez contando celulitas?”, “¿tienes bichitos nuevos?”, que siempre me hacen reír y me animan a explicaros un poco de mi día a día.

En especial tengo que agradecer a Sergio (no me he olvidado de ti), por empezar conmigo y llevarme un poco a regañadientes al laboratorio, resultó que tenías razón y me gustó bastante, sólo por eso te voy a perdonar haber sido el primer Doctor de la familia. Gracias por ayudarme con las cuentas y estar siempre disponible para discusiones científicas, sobre todo la eterna “empresa vs academia”, no nos vamos a hacer cambiar de opinión, pero tampoco hace falta.

Y finalmente, a mi compañero de vida. Gracias Javi por saber sacarme todos los días una sonrisa, aguantarme en momentos que no me soporto ni yo y hacerme FELIZ. Eres mi alegría y mi equilibrio, gracias por estar conmigo a diario y prepararme el despacho perfecto en casa, todo esto habría sido mucho más complicado sin ti a mi lado.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

3-NP - Ácido nitropropiónico
AB - Ácido Betulínico
ADME - Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
AO - Ácido Okadaico
ARNT - Translocador Nuclear del Receptor de Aril Hidrocarburos
aSMA - Actina de músculo liso alfa
BDNF - Factor Neurotrófico Cerebral
BHE - Barrera Hematoencefálica
CBP - Proteína de unión a CREB
CDDO-Me - Bardoxolone
C-TAD - Dominio COOH terminal
CU - Colitis Ulcerosa
DAR - Daño Renal Agudo
DFX - Deferoxamina
DMOG - Dimetiloxailglicina
DSS - Sodio de Sulfato Dextrano
EC - Enfermedad de Crohn
ECGS - Suplemento de factor de crecimiento para células endoteliales
EH - Enfermedad de Huntington
EII - Enfermedad Inflamatoria Intestinal
EPO - Eritropoyetina
ERC - Enfermedad de Riñón Crónica
ERH - Elementos de Respuesta a Hipoxia
FDA - Administración de Medicamentos y Alimentos
FIH-1 - Proteína Factor Inhibidor de HIF
GFAP - Proteína Fibrilar Acídica de la Glia
Glut - Transportador de Glucosa
GSNO - S-nitrosoglutation
H&E - Hematoxilina y eosina
HIF - Factor Inductor de Hipoxia
HTT - Huntingtina
ICAM - moléculas de adhesión intracelular
ICC - Impacto Cortical Controlado
IF - Inmunofluorescencia
IgG - Inmunoglobulina G

IHC - Inmunohistoquímica
IL- Interleuquina
MCP-1 - Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1
MEC - Matrix Extracelular
MMP - Metaloproteasas de Matriz
NF- κ B - Nuclear Factor of kappa B
NHDF - Fibroblastos dermales Humanos
NO - Óxido Nítrico
NOG - N-oxalilglicina
N-TAD - Dominio NH₂- terminal
ODDD - Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno
PBMC- Células mononucleares de sangre periférica
PHA - Fitohemaglutinina
PHD - Prolil Hidrosilasa
PHDi - Inhibidor de las Prolil Hidrosilasas
PP2A - Proteína Fosfatasa 2A
ROS - Especies Reactivas de Oxígeno
SNC - Sistema Nervioso Central
SOD2 - Super Óxido Dismutasa
TCI - Traumatismo Craneal Inducido
TEER - Resistencia Eléctrica Trans-epitelial
TGF β - Factor de Crecimiento Transformante Beta
TIMP - Inhibidor Tisular de las Metaloproteasas
TNBS - ácido Trinitrobencenosulfónico
TNC - Tenacina
TNF α - Factor de Necrosis tumoral
VCAM - molécula de adhesión celular vascular
VEGF - Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VHL - Proteína von Hippel-Lindau
VIH - Virus Inmunodeficiencia Humana
ZO-1 - Proteína Zonula Occludens

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos

Resumen.....	31
Summary	36
1 Introducción	41
1.1 Triterpenos.....	41
1.2 Ácido betulínico (AB) y derivados semisintéticos.....	42
1.3 Ruta de activación de HIF.....	44
1.3.1 Estructura	44
1.3.2 Regulación de HIF	46
1.4 Pre-acondicionamiento hipóxico con fármacos inhibidores de PHDs	48
1.5 Potenciales aplicaciones terapéuticas de los PDHi.	49
1.5.1. Anemia renal derivada de la Enfermedad de riñón crónica (ERC)	49
1.5.2. Daño agudo renal (DAR).....	50
1.6 Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII).....	50
1.7 HIF y neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas.....	55
1.8 Enfermedad de Huntington. Generalidades y papel de HIF.....	57
1.9 Traumatismos craneoencefálicos	58
2 Objetivos	67
3 Material y métodos.....	70
3.1 Experimentos <i>in vitro</i>	70
3.1.1 Reactivos	70
3.1.2 Compuestos	70
3.1.3 Líneas celulares	70
3.1.4 Ensayo de resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER)	70
3.1.5 Ensayo de luciferasa.....	71
3.1.6 Ensayo de contracción de colágeno.....	71
3.1.7 Ensayo de angiogénesis.....	71
3.1.8 Ensayo de neuroprotección estriatal <i>in vitro</i>	71
3.1.9 Extracción de ARN mensajero de los estudios <i>in vitro</i>	72
3.1.10 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR).....	72
3.1.11 Western Blot	73
3.1.12 Transfección celular e inmunoprecipitación.....	74
3.1.13 Ensayo de pull-down de GST	75
3.1.14 Ensayo de hidroxilación de HIF-1 α	75
3.2 Proteómica.....	75
3.2.1 Preparación de las muestras para LC-MS/MS.....	75

3.2.2	Análisis cromatográfico y espectrometría de masas	75
3.2.3	Análisis de los datos LC-MS/MS	76
3.3	Experimentos <i>in vivo</i>	77
3.3.1	Animales.....	77
3.3.2	Inducción y establecimiento de los modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal.....	77
3.3.3	Modelo murino de neurodegeneración estriatal como ejemplo de Enfermedad de Huntington	78
3.3.4	Modelo murino de Traumatismo craneal inducido (TCI) por impacto cortical controlado (ICC)	78
3.3.5	Entrenamiento y evaluación neuroconductual.....	79
3.3.6	Análisis histológico del colon	79
3.3.7	Análisis histológico del cerebro	79
3.3.8	Análisis Inmunohistoquímico.....	80
3.3.9	Estudios de microscopía confocal	80
3.3.10	Ensayo Tunel	80
3.3.11	Extracción de ARN mensajero de los estudios <i>in vivo</i>	81
3.3.12	Array de PCR.....	81
3.4	Estudios de farmacocinética y ADME/Tox.....	81
3.4.1	Farmacocinética plasmática	81
3.4.2	Farmacocinética de tejido cerebral.....	82
3.4.3	Aclaramiento intrínseco (estabilidad metabólica)	82
3.4.4	Identificación de metabolitos	83
3.4.5	Ensayo Q-patch basado en células del canal de iones de potasio humano hERG.....	83
3.4.6	Test Ames y toxicidad genética.....	83
3.4.7	Inhibición del Citocromo P450 y perfil off-target.....	84
3.4.8	Ensayo de citotoxicidad.....	84
3.4.9	Ensayo Cometa.....	84
3.4.10	Screening de quinasas	85
3.5	Análisis estadístico	85
4	Resultados	89
4.1	Estudios de metabolismo, toxicología y farmacocinética del compuesto VCE-005.1.....	89
4.1.1	Metabolismo <i>in vitro</i>	89
4.1.2	Toxicidad <i>in vitro</i>	90
4.1.3	Efectos off-target.....	92
4.1.4	Screening de quinasas	93
4.1.5	Estudios de farmacocinética y biodisponibilidad	95

4.2	Mecanismo de acción del VCE-005.1	99
4.2.1	El compuesto VCE-005.1 modifica la actividad de las PHDs	99
4.2.2	El compuesto VCE-005.1 afecta tanto a la fosforilación de la Ser125 de la PHD2 como a su interactoma.....	100
4.3	Efecto terapéutico del compuesto VCE-005.1 en Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII).....	104
4.3.1	VCE-005.1 induce la retracción del colágeno y activa la vía HIF-1 α ..	104
4.3.2	VCE-005.1 alivia la inflamación y la fibrosis del colon inducida por TNBS.....	105
4.3.3	Efecto del compuesto VCE-005.1 sobre la integridad de la barrera epitelial.....	109
4.3.4	VCE-005.1 previene la inflamación del colon y la fibrosis inducida por DSS.....	111
4.3.5	El compuesto VCE-005.1 administrado por vía rectal no previene la inflamación del colon.....	115
4.4	Estudio del potencial terapéutico del VCE-005.1 en Enfermedad de Huntington (EH)	116
4.4.1	Efectos del compuesto VCE-005.1 en neuronas estriatales que expresan huntingtina normal y mutada.....	116
4.4.2	Efecto neuroprotector del compuesto VCE-005.1 en un modelo murino de degeneración neuronal del estriado	118
4.5	Estudio del potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en la angiogénesis y en un modelo de Traumatismo craneal inducido (TCI) por impacto cortical controlado (ICC).....	121
4.5.1	Efectos del compuesto VCE-005.1 en la expresión génica dependiente de HIF y en la angiogénesis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	121
4.5.2	Efectos del compuesto VCE-005.1 en la sintomatología neuroconductual de un modelo de Traumatismo craneal inducido (TCI) por impacto cortical controlado (ICC).....	124
4.5.3	Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre la BHE	125
4.5.4	Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre la vasculogénesis.	126
4.5.5	Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre la neuroinflamación.....	127
4.5.6	Efectos del VCE-005.1 sobre la apoptosis producida por TCI.....	131
4.5.7	Efectos del compuesto VCE-005.1 en la expresión génica de marcadores inflamatorios.....	132
5	Discusión.....	137
5.1	Mecanismo de acción del compuesto VCE-005.1.....	137
5.2	Potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en EII.....	138
5.3	Potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en EH.....	141
5.4	Potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en TCI.....	143
6	Conclusiones	148
7	BIBLIOGRAFÍA.....	152

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de Tablas

Tabla 1. Inhibidores de las PHDs en ensayos clínicos.	49
Tabla 2. Primers usados en las PCR a tiempo real.	73
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para los diferentes ensayos experimentales de proteínas. ..	74
Tabla 4. Capacidad inhibitoria del Citocromo P450 del VCE-005.1.	89
Tabla 5. Estudio de estabilidad metabólica en microsomas de hígado.	89
Tabla 6. Metabolitos generados tras la incubación de VCE-005.1 con microsomas.	90
Tabla 7. Evaluación de la mutagenicidad.....	91
Tabla 8. Viabilidad celular tras tratamiento con VCE005.1.....	92
Tabla 9. Porcentaje de inhibición de distintas dianas tras el tratamiento con VCE-005.1.	93
Tabla 10. Porcentaje de actividad de las distintas quinasas tras el tratamiento con VCE-005.1 y AB.	95
Tabla 11. Parámetros estudiados en el ensayo de farmacocinética.	96
Tabla 12. Concentración del VCE-005.1 en cerebro y plasma tras su administración intravenosa.	97

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del Ácido Betulínico (AB) y del VCE-005.1.	44
Figura 2. Estructura de HIF y sus dominios funcionales.	45
Figura 3. Resumen esquemático de la regulación de HIF-1 α por medio de la disponibilidad de oxígeno.	46
Figura 4. Regulación de HIF-1 α por medio de la modulación de la actividad de PHD2.	47
Figura 5. Moléculas inhibitoras de las PHDs derivadas del 2-OG.....	49
Figura 6. Mecanismos protectores de los PHDi en la EIL.	55
Figura 7. Representación del origen y consecuencias de la enfermedad de Huntington.	57
Figura 8. Mecanismo neuroinflamatorio implicado en la fisiopatología del TCI.	60
Figura 9. Comparación de los procesos que suceden en la barrera hematoencefálica de manera fisiológica y tras una lesión cerebral traumática.....	62
Figura 10. Inhibición del canal hERG.....	91
Figura 11. Imágenes representativas del ensayo cometa.....	92
Figura 12. Farmacocinética.	96
Figura 13. Penetración cerebral del VCE-005.1.	97
Figura 14. El VCE-005.1 altera la actividad de la PHD2.	99
Figura 15. El compuesto VCE-005.1 altera la actividad de PHD2 modulando la fosforilación de la Ser125.....	101
Figura 16. El tratamiento con VCE-005.1 afecta al interactoma de PHD2.....	103

Figura 17. Efecto del VCE-005.1 en la contracción de colágeno y actividad de HIF.....	104
Figura 18. El compuesto VCE-005.1 atenúa la gravedad clínica en el modelo de TNBS. .	105
Figura 19. El compuesto VCE-005.1 atenúa la fibrosis y los biomarcadores relacionados con la inflamación en el modelo de TNBS.	107
Figura 20. El tratamiento con VCE-005.1 normalizó la expresión de genes asociados con la fibrosis en el modelo de TNBS.	108
Figura 21. El tratamiento con VCE-005.1 previno el aumento del perímetro y el área de los vasos sanguíneos.	109
Figura 22. El compuesto VCE-005.1 mejora la integridad de la barrera epitelial intestinal.	110
Figura 23. El compuesto VCE-005.1 reduce significativamente la inflamación y preserva la estructura epitelial en el colon de los animales tratados con DSS.	112
Figura 24. El tratamiento con VCE-005.1 normalizó la expresión de genes asociados con la fibrosis en el modelo de DSS.	113
Figura 25. El compuesto VCE-005.1 previene la fibrosis del colon en el modelo de DSS.	114
Figura 26. El compuesto VCE-005.1 ejerce sus funciones sistémicamente pero no tópicamente en el recto.....	115
Figura 27. Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre las células estriatales con huntingtina normal y mutada.....	116
Figura 28. Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre las células estriatales con huntingtina normal y mutada.....	117
Figura 29. El compuesto VCE-005.1 es neuroprotector en ratones tratados con 3NP.....	118
Figura 30. El compuesto VCE-005.1 es neuroprotector en ratones tratados con 3NP.....	119
Figura 31. El tratamiento con VCE-005.1 indujo cambios en la expresión génica.....	120
Figura 32. El compuesto VCE-005.1 induce la expresión de genes dependientes de HIF.	121
Figura 33. El compuesto VCE-005.1 induce la angiogénesis in vitro.	122
Figura 34. El compuesto VCE-005.1 induce la angiogénesis in vivo.	123
Figura 35. El compuesto VCE-005.1 mejora el rendimiento en el test Rotarod.	124
Figura 36. El compuesto VCE-005.1 previene el aumento de la permeabilidad de la BHE a IgG.....	125
Figura 37. El compuesto VCE-005.1 aumenta la expresión de las proteínas de unión estrecha de la BHE.	126
Figura 38. El compuesto VCE-005.1 aumenta la vasculogénesis tras un TCI.....	127
Figura 39. El compuesto VCE-005.1 disminuye la activación de la microglía y de la astrogliá en el modelo de TCI.	129
Figura 40. El compuesto VCE-005.1 disminuye la expresión del marcador VCAM1 en el modelo de TCI.....	130

Figura 41. Efecto del VCE-005.1 sobre la infiltración de neutrófilos, linfocitos y macrófagos después de un TCI.....	131
Figura 42. Efecto del tratamiento con VCE-005.1 sobre la muerte celular.	132
Figura 43. El tratamiento con el compuesto VCE-005.1 produjo cambios génicos en la zona pericontusional del golpe.	133
Figura 44. Esquema del mecanismo de acción del VCE-005.1.	137
Figura 45. Esquema de la acción del VCE-005.1 sobre los modelos de EII.....	140
Figura 46. Esquema de la acción del VCE-005.1 sobre un modelo de EH.....	142
Figura 47. Esquema de la acción del VCE-005.1 en un modelo de TCI.....	145

RESUMEN

Resumen

El factor inducible por hipoxia (HIF) se estabiliza durante los procesos inflamatorios asociados a un gran número de patologías, produciendo cambios en la expresión génica con un profundo impacto en el microambiente tisular, así como en la evolución de la enfermedad. Aunque los mecanismos que inician la estabilización de HIF dependen de diferentes factores, todos ellos convergen en las proteínas prolin-hidroxilasas (PHDs) que lo hidroxilan promoviendo su ubiquitinación y degradación.

Actualmente, el desarrollo farmacológico de moléculas que funcionen como inhibidores de las PHDs estabilizando la expresión de HIF está en auge para el tratamiento de enfermedades fibróticas, inflamatorias y neurodegenerativas como son la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), la Enfermedad de Huntington (EH) y el Traumatismo Craneal Inducido (TCI).

En esta tesis, hemos estudiado la eficacia de la molécula VCE-005.1, un derivado hidroxamato del ácido betulínico con carácter hipoximimético, en distintas enfermedades que pueden beneficiarse de esta modulación. Para ello, se llevaron a cabo aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, además de estudiar su perfil farmacológico.

Los ensayos *in vitro* nos permitieron determinar el mecanismo de acción del compuesto, así como desvelar las posibles patologías en las que sería interesante su uso.

Concretamente, se determinó que el compuesto VCE-005.1 modifica la actividad de la PHD2 por medio de la modulación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A)/B55 α , afectando así a la estabilidad de HIF-1 α . En experimentos llevados a cabo en fibroblastos, el compuesto indujo la retracción de colágeno, y en células Caco-2 evitó la pérdida de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) inducida por citocinas proinflamatorias. Además, en células estriatales con una forma mutada de la huntingtina, el compuesto indujo la expresión de genes dependientes de HIF y protegió contra la citotoxicidad inducida por 3-NP. Finalmente, también se demostró en células microvasculares cerebrales que el VCE-005.1 aumenta la expresión de genes dependientes de HIF con carácter protector. Además, el compuesto también indujo la angiogénesis en células endoteliales vasculares y en un modelo de ratón basado en implantes de matrigel.

Los ensayos *in vivo* llevados a cabo en modelos animales nos permitieron determinar de una manera más preclínica los efectos que el compuesto VCE-005.1 era capaz de llevar a cabo.

Primero, en dos modelos murinos de EII demostramos que el tratamiento oral con VCE-005.1 previno la inflamación y la fibrosis del colon por medio de una mejora en la integridad de la barrera epitelial.

Segundo, en un modelo de ratón de neurodegeneración estriatal usado como aproximación a la EH, se mostró que el compuesto mejoró los síntomas clínicos, previno la pérdida neuronal, disminuyó la astrogliosis reactiva, la activación microglial y los marcadores proinflamatorios y mejoró las defensas antioxidantes en el cerebro.

Tercero, en un modelo de TCI el compuesto VCE-005.1 mejoró los síntomas clínicos y promovió una mejora de la barrera hematoencefálica, que se tradujo en una menor infiltración y en una mejora de la expresión de mediadores inflamatorios y marcadores de daño de la BHE.

Por último, el compuesto VCE-005.1 mostró una biodisponibilidad oral prometedora, una buena penetrabilidad cerebral y carece de efectos genotóxicos y cardiotoxicos.

Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran la capacidad del compuesto VCE-005.1 para activar la ruta $PP2A/B55\alpha/PHD2/HIF-1\alpha$, y proporcionan evidencias de que el tratamiento oral alivia la inflamación del colon y la fibrosis asociada a la colitis. Además, el tratamiento intraperitoneal mejora la neuroinflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas como son la EH y el TCI, identificando la mejora de la integridad de la barrera intestinal y hematoencefálica como posible mecanismo de acción y proporcionando así, una base sólida para estudios clínicos adicionales.

SUMMARY

Summary

Hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizes during inflammatory processes associated with a large number of pathologies, producing changes in gene expression with a profound impact on the tissue microenvironment, as well as on the evolution of the disease. Although the mechanisms that initiate the stabilization of HIF depend on different factors, all of them converge on the prolyl-hydroxylases proteins (PHDs) that hydroxylate it, promoting its ubiquitination and degradation.

Currently, the pharmacological development of small molecules used as inhibitors of PHD to stabilize the expression of HIF is experiencing a great increase for the treatment of fibrotic, inflammatory and neurodegenerative diseases such as Inflammatory Bowel Disease (IBD), Huntington's Disease (HD) and Traumatic Brain Injury (TBI).

In this thesis, we have studied the efficacy of the molecule VCE-005.1, a hydroxamate derivative of the betulinic acid with a hypoximimetic feature, in different diseases that can benefit from this modulation. For this, *in vitro* and *in vivo* approaches were carried out, in addition to studying its pharmacological profile.

The *in vitro* experiments allowed us to determine the mechanism of action of the compound, as well as to reveal the possible pathologies in which its use would be interesting.

Specifically, it was determined that the compound VCE-005.1 modifies the activity of PHD2 through the modulation of protein phosphatase 2A (PP2A)/B55 α , thus affecting the stability of HIF-1 α . In experiments carried out in fibroblasts, the compound induced collagen retraction, and in Caco-2 cells it prevented the loss of transepithelial electrical resistance (TEER) induced by pro-inflammatory cytokines. Furthermore, in striatal cells with a mutated form of huntingtin, the compound induced the expression of HIF-dependent genes and protected against 3-NP-induced cytotoxicity. Finally, it was also demonstrated in brain microvascular cells that VCE-005.1 increases the expression of protective HIF-dependent genes. Furthermore, the compound also induced angiogenesis in vascular endothelial cells and in a mouse model based on matrigel.

In vivo experiments carried out in animal models allowed us to determine in a more preclinical way the effects that the compound VCE-005.1 would be able to carry out.

First, in two murine IBD models we demonstrated that oral VCE-005.1 treatment prevented inflammation and fibrosis of the colon by improving the integrity of the epithelial barrier.

Second, in a mouse model of striatal neurodegeneration used as an approximation to HD, the compound was shown to improve clinical symptoms, prevent neuronal loss, decrease

reactive astrogliosis, microglial activation, and pro-inflammatory markers, and improve antioxidant defenses in the brain.

Third, in a TBI model, compound VCE-005.1 improved clinical symptoms and promoted the improvement of the blood-brain barrier, which resulted in less infiltration and improved expression of inflammatory mediators and damage markers of BBB.

Lastly, compound VCE-005.1 showed promising oral bioavailability, good brain penetrability, and lacks genotoxic and cardiotoxic effects.

Taken together, our results show the ability of compound VCE-005.1 to activate the PP2A/B55 α /PHD2/HIF-1 α pathway and provide evidence that oral treatment alleviates colon inflammation and fibrosis associated with colitis. In addition, intraperitoneal treatment improves the neuroinflammation associated with neurodegenerative diseases such as HD and TBI, identifying the improvement of the integrity of the intestinal and blood-brain barrier as a possible mechanism of action and thus providing a solid basis for additional clinical studies.

1. INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Triterpenos.

Los terpenos y especialmente los triterpenos son el grupo más grande y diverso de compuestos naturales con aproximadamente 30.000 estructuras identificadas hasta la fecha¹. Todos los terpenos están formados por varias unidades de 5 carbonos de isopreno y, según el número de éstas se clasifican en distintos grupos. Se estima que al menos el 50% de todos los terpenos conocidos pertenecen al grupo de los triterpenos, formados por 30 unidades de isopreno.

En la naturaleza, los triterpenos están formados mayoritariamente por estructuras tetra o pentacíclicas². Los triterpenos pentacíclicos se pueden dividir en tres clases principales denominadas lupano, oleano y ursano, y cada una de ellas está formada por importantes compuestos bioactivos entre los que podemos destacar al ácido betulínico, perteneciente a la clase del lupano. Los triterpenos se encuentran principalmente en la superficie de las plantas, como puede ser la cáscara de los frutos, la corteza del tallo o las hojas³, siendo sintetizados en el citosol a partir de la ciclación del escualeno⁴. Estos compuestos forman parte de la dieta humana, encontrándose en una gran variedad de frutas, aceites vegetales y cereales⁵, de hecho, parte de los efectos beneficiosos para la salud que poseen las frutas y verduras han sido asociados con su contenido en triterpenos⁶. Además, su uso como complemento alimenticio está muy extendido⁵.

Desde un punto de vista científico, los triterpenos pentacíclicos han recibido mucha atención ya que presentan un amplio espectro de actividades biológicas entre las que podemos destacar las antitumorales^{7, 8}, hepatoprotectoras⁹, cardioprotectoras¹⁰, anti-microbianas, anti-víricas¹¹, antioxidantes¹² y anti-parasíticas¹³. Además, también se han descrito efectos prometedores en trastornos asociados con la hipertensión, la obesidad¹⁴, la diabetes¹⁵, la aterosclerosis¹⁰ y en enfermedades neurodegenerativas¹⁶. Como resultado, algunos triterpenos están siendo evaluados actualmente en ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov).

Aunque estos compuestos naturales tienen amplios efectos beneficiosos y son fáciles de obtener, desafortunadamente tienen una baja biodisponibilidad oral y además su solubilidad es limitada, lo que ha provocado que durante los últimos años se hayan desarrollado derivados sintéticos que mejoren estas características, así como su potencia y eficacia, permitiendo la obtención de nuevos agentes con mejores atributos farmacológicos que pueden ser una alternativa de gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos. Así, podemos encontrar una amplia bibliografía en la que se estudia la actividad farmacológica de derivados del ácido betulínico¹⁷, del ácido ursólico¹⁸, del lupano¹⁹, del ursano²⁰ y del oleano²¹ en distintas enfermedades como son las neurodegenerativas¹⁶ y el cáncer²² entre otras.

En concreto, un compuesto que merece especial atención es el CDDO-Me, también conocido como Bardoxolone (metil 2-ciano-3,12-dioxooleana1,9 (11) dien-28-oato). Se trata de un derivado sintético del ácido oleanólico sintetizado hace más de 20 años con la intención de potenciar el comportamiento antiinflamatorio del compuesto natural. Esta molécula ha sido investigada extensamente debido a su gran capacidad para ejercer actividades antiinflamatorias, antioxidantes²¹, antiproliferativas, antiangiogénicas y antimetastásicas además de inducir la apoptosis en células cancerosas²³.

El CDDO-Me ha demostrado su eficacia como fármaco en distintas patologías. Entre ellas podemos encontrar principalmente renales como las enfermedades aguda y crónica de riñón, cáncer, desórdenes metabólicos y la hipertensión arterial pulmonar. De todas ellas se han llevado a cabo distintos ensayos clínicos que actualmente están en fases más o menos avanzadas, lo que ratifica sus efectos positivos. Sin embargo, cabe destacar que durante un ensayo clínico en el que se evaluaba su actividad en pacientes con enfermedad renal crónica y diabetes tipo 2, hubo un aumento significativo de los episodios de insuficiencia cardíaca, teniéndose que paralizar antes de su finalización²⁴. Estos acontecimientos supusieron un obstáculo para su uso clínico, pero hoy en día se sigue investigando para su desarrollo en distintas enfermedades con resultados muy prometedores²⁵.

1.2 Ácido betulínico (AB) y derivados semisintéticos.

El ácido betulínico (AB) (ácido (3)-3-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico) se aisló por primera vez de la planta *Gratiola officinalis* a principios del siglo XX recibiendo el curioso nombre de graciolon. Posteriormente, este compuesto se aisló de diferentes fuentes vegetales hasta ser finalmente identificado como AB. Es un triterpeno que pertenece a la clase lupano y que podemos encontrar en distintos géneros de plantas como *Betulla*, *Ziziphus*, *Syzygium*, *Diospiros* o *Paeonia*, aunque principalmente es aislado de la corteza del abedul blanco (*Betula alba*).

Varios estudios preclínicos han demostrado que el AB posee un amplio espectro de actividades farmacológicas²⁶. Su desventaja más importante es su muy baja solubilidad en agua que se correlaciona con una baja biodisponibilidad oral²⁷. Aun así, independientemente de esta desventaja, el ácido betulínico muestra un amplio abanico de actividades biológicas que incluyen citotoxicidad, actividad antitumoral, antiviral, antidiabética, antiinflamatoria y neuroprotectora. Esto es debido a que su mecanismo de acción es complejo y no está restringido a una diana molecular específica. En la década de 1970 aparecieron los primeros artículos sobre los efectos farmacológicos del AB, siendo la citotoxicidad uno de los campos más importantes de esta investigación²⁸. A partir de varios estudios se observó que la citotoxicidad del AB conducía a la apoptosis de células tumorales^{29, 30}. Aunque la diana molecular sobre la que actúa aún no se ha identificado, diversos trabajos indican la posibilidad

de que produzca alteraciones en la ruta anti-apoptótica de Bcl-2 y del factor de transcripción NF- κ B^{31, 32}. Asimismo, también se ha descrito su actividad contra la diabetes mellitus tipo 2. En este caso, su mecanismo de acción afecta a la absorción de glucosa, a la resistencia a la insulina, a la biosíntesis de glucógeno y a los niveles de triglicéridos³³. Igualmente, varios estudios han demostrado sus propiedades neuroprotectoras a través de diversas vías. Por ejemplo, el AB es capaz de proteger de una lesión cerebral por isquemia/reperfusión activando la vía de señalización PI3K/Akt³⁴, de daño neuronal por apoptosis en ratas recién nacidas mediante el bloqueo de FASL-FAS³⁵, mejorar el flujo sanguíneo cerebral recuperando los déficits de memoria en un modelo de demencia en ratas a través de los niveles de AMPc/GMPc y BDNF en el hipocampo³⁶, así como inhibir la neuroinflamación a través de la polarización de la microglía M2 por activación de AMPK³⁷.

En cuanto a su actividad antiviral, la mayoría de los artículos tratan sobre su actividad anti-VIH³⁸. Concretamente, el AB actúa contra el VIH previniendo la escisión del péptido espaciador de la cápside de la proteína Gag, impidiendo así la maduración viral. Además, también tiene efectos contra el virus del herpes³⁹ y de la hepatitis B, donde inhibe su replicación mediante la regulación de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2)⁴⁰. Un ejemplo de derivado del AB con capacidad antivírica es el Bevirimat (ácido 3-O- (30,30-dimetilsuccinil) -betulínico), un inhibidor muy potente de la maduración del VIH. Su mecanismo de acción consiste interferir con el procesamiento de la proteína p25, lo que da lugar a su acumulación y a la producción de partículas no infecciosas del virus⁴¹.

En 2007, el Bevirimat comenzó las fases I y II de ensayos clínicos⁴² pero estudios posteriores observaron que su eficacia era reducida ya que hasta el 40-50 % de los pacientes tenían especies virales resistentes al compuesto⁴³. Sin embargo, eso solo supuso el punto de partida para el diseño de la siguiente generación de inhibidores de la maduración del VIH que mantengan la actividad antivírica y mejoren la biodisponibilidad del fármaco.

El esqueleto del anillo del AB es idóneo como templado para numerosas modificaciones químicas que principalmente se encuentran en las posiciones C-3, C-20 y C-28. De esta manera, se han descrito derivados que poseen actividades citotóxicas usadas contra el cáncer⁴⁴, antiinflamatorias⁴⁵, anti-parasíticas⁴⁶ y antivíricas⁴⁷.

Recientemente, la empresa Emerald Health Biotechnology España ha desarrollado y patentado una serie de nuevas entidades químicas derivadas de distintos triterpenos pentacíclicos a los cuales se les ha añadido un grupo hidroxamato⁴⁸. Esta modificación los dota de una nueva actividad farmacológica que consiste en estabilizar al Factor Inducible por Hipoxia (HIF). Uno de los compuestos seleccionados para su desarrollo preclínico ha sido el VCE-005.1 (Figura 1).

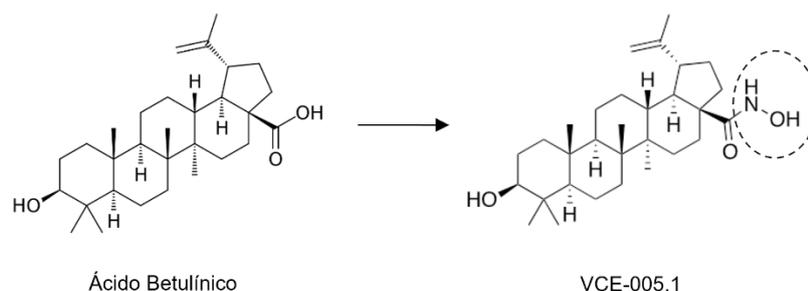


Figura 1. Estructura química del Ácido Betulínico (AB) y del VCE-005.1.

1.3 Ruta de activación de HIF

La capacidad de reconocer y adaptarse a las variaciones de oxígeno es de máxima importancia para la homeostasis y supervivencia celular de todos los organismos. Casi todas las células de los mamíferos son capaces de responder frente a una reducción en la disponibilidad de oxígeno⁴⁹ también denominada hipoxia⁵⁰. La hipoxia es una característica distintiva en numerosas enfermedades y suele ir acompañada de procesos inflamatorios⁵¹, compartiendo una relación de interdependencia. Gracias al conocimiento que se ha ido adquiriendo en los últimos años de esta conexión en diferentes patologías, se ha sugerido que la modulación farmacológica de HIF podría proporcionar protección tisular a través de potentes mecanismos antiinflamatorios⁵².

HIF, el principal factor de transcripción que media la respuesta celular a hipoxia fue descubierto por Semenza, Kaelin y Ratcliffe en 1991 durante un estudio realizado sobre el gen de la eritropoyetina (EPO)⁵³. En ese estudio identificaron una secuencia de ADN en la región promotora del gen EPO que es esencial para su activación transcripcional en respuesta a la hipoxia, denominándolos Elementos de Respuesta a Hipoxia (ERH). A partir de este momento, otros estudios descubrieron que la activación transcripcional de muchos genes se regula a través de la unión específica de una proteína a estas zonas ERH. Finalmente, esta proteína fue identificada como HIF⁵⁴. Debido a sus extraordinarios logros en el descubrimiento de la respuesta celular a variaciones en la disponibilidad de oxígeno, los autores anteriormente mencionados recibieron el Premio Lasker de Investigación Médica Básica en 2016, y el Premio Nobel de Medicina en 2019.

1.3.1 Estructura

HIF es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por dos subunidades, HIF- α y HIF-1 β , también denominada ARNT⁵⁴. La subunidad HIF- α es sensible a oxígeno y su expresión se induce en condiciones hipóxicas mientras que HIF-1 β se expresa de manera constitutiva.

En lo referente a su estructura, ambas subunidades pertenecen a la familia de proteínas bHLH-PAS, ya que sus estructuras poseen el motivo hélice básica-bucle-hélice que les permite formar el heterodímero entre ellas. La subunidad HIF- α posee dos dominios de transactivación (TAD): NH₂-terminal (N-TAD) y COOH-terminal (C-TAD)⁵⁵. Estos dominios son los responsables de la actividad transcripcional de HIF- α ; el C-TAD interactúa con coactivadores como CBP/p300 modulando la transcripción génica en situaciones de hipoxia mientras que el dominio N-TAD es el responsable de estabilizar la proteína frente a la degradación. Además, todas las subunidades HIF- α se diferencian de HIF-1 β en que poseen un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) superpuesto al dominio N-TAD, siendo este dominio indispensable para regular la estabilidad mediada por oxígeno⁵⁶.

Se conocen tres isoformas de HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α ⁵⁷. Tanto HIF-1 α como HIF-2 α muestran un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos (48%). Esta semejanza podría explicar su capacidad de heterodimerizar con HIF-1 β y unirse a las regiones ERHs. Sin embargo, HIF-1 α y HIF-2 α muestran diferentes patrones de distribución tisular; mientras que HIF-1 α se expresa de forma ubicua en todo el organismo, la expresión de HIF-2 α está restringida a ciertos tejidos^{58, 59}. HIF-3 α es la isoforma menos conocida poseyendo diferentes formas de splicing⁶⁰. Una de ellas se considera un inhibidor PAS (IPAS) ya que se une competitivamente a HIF-1/2 α , formando un complejo no funcional en el núcleo, lo que altera la expresión de los genes diana de HIF-1 α en condiciones hipóxicas⁶¹. Además, se ha informado recientemente que la expresión del gen IPAS se induce en respuesta a hipoxia y está regulada directamente por la unión de HIF-1 α , formando un nivel adicional de retroalimentación negativa en el sistema de respuesta a la hipoxia⁶².

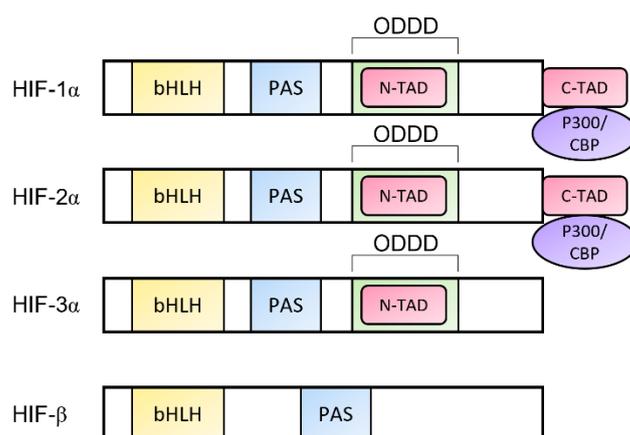


Figura 2. Estructura de HIF y sus dominios funcionales.

1.3.2 Regulación de HIF

En condiciones de normoxia (21% de oxígeno), HIF-1/2 α son hidroxilados por las proteínas prolil hidroxilasas (PHDs) en dos residuos de prolina (P402/P564 y P405/P531 en HIF-1 α y HIF-2 α , respectivamente) situados en el dominio dependiente de oxígeno (ODDD) en una reacción que requiere oxígeno, 2-oxoglutarato, ascorbato y hierro (Fe^{2+}) como cofactores. Además, también interviene la proteína Factor Inhibidor de HIF-1 (FIH-1), que hidroxila la Asn803 dentro del dominio TAD-C, interrumpiendo su interacción con los coactivadores p300/CBP (proteína de unión a CREB)⁶³. La hidroxilación de HIF-1/2 α facilita la unión de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) al dominio ODDD, lo que produce la ubiquitinación del complejo por medio de la ubiquitina ligasa E3 para su posterior degradación por el proteosoma 26S⁶⁴.

En condiciones hipóxicas, la actividad de las PHDs y FIH-1 se ve comprometida debido a la ausencia de oxígeno, por lo que se inhibe la hidroxilación dentro del dominio ODDD y se evita la interacción de HIF-1/2 α con pVHL. Como resultado, la ubiquitinación y degradación de HIF-1 α se bloquea y, en consecuencia, aumenta la estabilidad de la proteína. La proteína HIF-1/2 α acumulada se transloca al núcleo donde dimeriza con HIF-1 β a través del dominio bHLH⁵⁴. HIF-1/2 α recluta a coactivadores transcripcionales como p300/CBP y se une al elemento de respuesta a hipoxia (ERH) dentro de la región promotora de los genes diana que responden a HIF, mediando así su activación transcripcional⁶⁵.

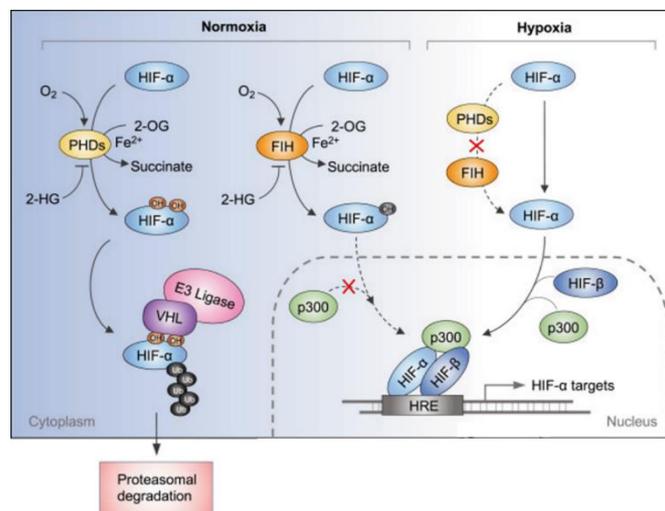


Figura 3. Resumen esquemático de la regulación de HIF-1 α por medio de la disponibilidad de oxígeno. Adaptado de ⁶⁶.

El proceso de hidroxilación se rige por tres prolil hidroxilasas conservadas evolutivamente: PHD1 (EGLN2), PHD2 (EGLN1) y PHD3 (EGLN3)⁶⁷. Son las proteínas sensibles a oxígeno mejor caracterizadas y su actividad depende de la disponibilidad de

oxígeno, hierro, 2-oxoglutarato y ascorbato⁶⁸. Poseen una baja afinidad por el oxígeno, lo que las hace idóneas para detectar cambios en los niveles de éste y así controlar la estabilización de HIF α .

Existen diferencias entre las tres isoformas de las PHDs: PHD1 está presente principalmente en testículos, pero también se puede encontrar en el cerebro, riñón, corazón e hígado. Preferiblemente, actúa sobre HIF-2 α e hidroxila tanto en Pro402 como en Pro564. La PHD2 es considerada la más importante ya que está involucrada en numerosos procesos y está presente en todos los tejidos, muestra preferencia por HIF-1 α y lo hidroxila en Pro402 y Pro564. La isoforma PHD3 solo hidroxila la Pro564 tanto en HIF-1 α como en HIF-2 α ⁶⁹.

Recientemente se ha descrito cómo la modulación de la actividad de la PHD2 influye en la estabilización de la proteína HIF-1 α . Esta modulación se lleva a cabo mediante modificaciones postranscripcionales en su Ser125 que necesita estar fosforilada para la correcta actividad de la proteína PHD2. Esta fosforilación se lleva a cabo por medio de la quinasa P70S6K y conlleva un aumento en la capacidad de PHD2 de degradar HIF-1 α . Por otro lado, la fosfatasa encargada de contrarrestar esta fosforilación es la PP2A junto con su subunidad reguladora B55 α . La desfosforilación de la PHD2 en S125 tiene como consecuencia una reducción de su actividad, lo que lleva a un aumento en la acumulación de HIF-1 α ⁷⁰.

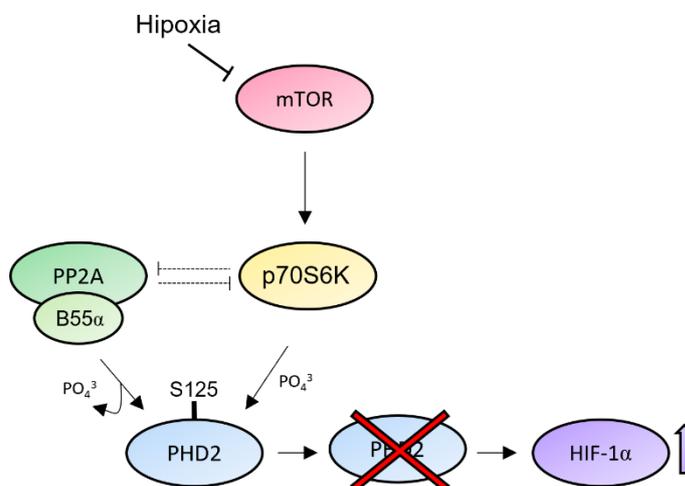


Figura 4. Regulación de HIF-1 α por medio de la modulación de la actividad de PHD2. Adaptado de ⁷⁰.

Además, se ha descrito recientemente que el complejo PP2A/B55 α juega un papel importante en la remodelación vascular⁷¹, lo que es de especial relevancia en enfermedades neuroinflamatorias donde la barrera hematoencefálica está comprometida.

Por último, los genes controlados directa o indirectamente por HIF median un amplio espectro de resultados biológicos. A nivel celular, las respuestas a HIF incluyen efectos sobre

la diferenciación, migración, citoprotección, apoptosis, control del ciclo celular y de la función mitocondrial⁷²⁻⁷⁴.

En concreto HIF posee funciones específicas según el tipo celular, teniendo un gran impacto en la expresión de génica de las células inmunes, así como en determinadas funciones inmunológicas. Por ejemplo, HIF tiene un papel clave en la regulación de la vida media y la apoptosis de los neutrófilos⁷⁵, regula la polarización M1 y M2 en los macrófagos⁷⁶ y modula la supervivencia y la síntesis de interferón en las células dendríticas⁷⁷. Asimismo, HIF es importante para la regulación no solo de la supervivencia y diferenciación de las células T, sino también de su proliferación y capacidad antitumoral⁷⁸, mientras que en las células B, HIF regula la supervivencia y la producción de anticuerpos⁷⁹.

A nivel sistémico, las actividades de HIF incluyen regulación metabólica⁸⁰, eritropoyesis⁸¹, angiogénesis⁸², remodelación tisular⁸³, tono vascular, inmunidad⁸⁴ y cicatrización de heridas⁸⁵, entre otras.

1.4 Pre-acondicionamiento hipóxico con fármacos inhibidores de PHDs

Durante el estudio de las propiedades biológicas de HIF se ha observado que varias moléculas de pequeño tamaño provocan su acumulación intracelular además de aumentar su actividad transcripcional independientemente de la concentración de oxígeno⁸⁶. De esta manera se encontró que algunas sales de Co^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} inhiben la actividad hidroxilasa actuando como antagonistas de Fe^{2+} ⁸¹ y además los quelantes de hierro la inhiben de manera enzimática⁸⁷, siendo capaces de activar HIF mediante la inhibición de las prolil y asparaginil hidroxilasas.

El desarrollo y diseño de los inhibidores de las PHDs (PHDi) comenzó con la síntesis de análogos de 2-OG. Entre ellos podemos encontrar la dimetiloxalilglicina (DMOG) y la N-oxalilglicina (NOG), que fueron las primeras moléculas mimética del 2-OG. La síntesis de análogos de 2-OG fue el primer enfoque empleado en el diseño de los PHDi, de hecho, la mayoría de las moléculas que han avanzado hasta el uso clínico son derivados de él⁸⁸.

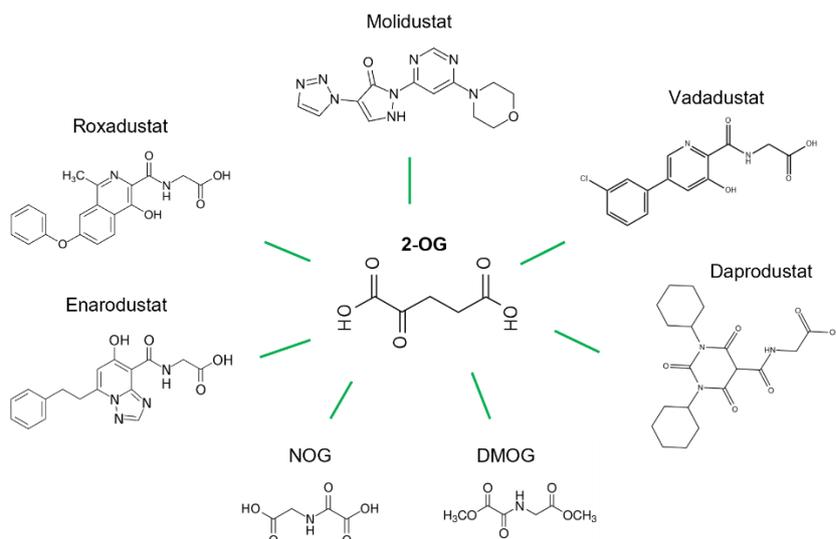


Figura 5. Moléculas inhibitoras de las PHDs derivadas del 2-OG.

Actualmente, hay cinco HIF-PHDI que han completado los ensayos de fase III: daprodustat, roxadustat, vadadustat, molidustat y enarodustat^{89, 90}. De ellos el roxadustat ha sido ya aprobado en EU y China para su comercialización.

Tabla 1. Inhibidores de las PHDs en ensayos clínicos.

Compuesto	Mecanismo	Diana	Enfermedad	Desarrollo clínico	Referencia
Vadadustat (AKB-6548)	Bloquea el sitio activo de las PHD	PHD y FIH	Anemia derivada de ERC	Fase III	NCT02865850
Daprodustat (GSK1278863)	Bloquea el sitio activo de las PHD	PHD y FIH	Anemia derivada de ERC	Fase III	NCT02969655
AKB-4924	Quelante de hierro	PHD y FIH	EII	Fase I	NCT02914262
Roxadustat (FG-4592)	Bloquea el sitio activo de las PHD	PHD y FIH	Anemia derivada de ERC	Fase III	NCT01750190
Molidustat (BAY85-3934)	Bloquea el sitio activo de las PHD	PHD y FIH	Anemia derivada de ERC	Fase II	NCT01975818

1.5 Potenciales aplicaciones terapéuticas de los PDHi.

1.5.1. Anemia renal derivada de la Enfermedad de riñón crónica (ERC)

En la actualidad, los PHDI se utilizan clínicamente para el tratamiento de la anemia asociada a insuficiencia renal crónica⁹¹⁻⁹³. En el intersticio de los riñones normales, se localizan las células renales productoras de EPO (RPEs)^{94, 95} que son las encargadas de producir EPO de manera uniforme y sensible a la concentración de oxígeno⁹⁶ y por ello, son el objetivo de los PHDI para así promover la eritropoyesis⁹⁷. Así, los ensayos clínicos demuestran que los PHDI aumentan la producción de EPO en pacientes sometidos a hemodiálisis incluso después de la eliminación de ambos riñones, sugiriendo que la producción de EPO en órganos distintos del riñón como el hígado o la piel son también de especial importancia⁹⁸. Por tanto, los PHDI

contribuyen a mejorar la anemia al estimular la producción de EPO y alterar el metabolismo del hierro a favor de la hematopoyesis⁹⁹.

1.5.2. Daño agudo renal (DAR)

Los PHDi podrían ser potencialmente eficaces en el tratamiento de otras enfermedades como el daño renal agudo (DAR) y el trasplante renal^{100, 101}. En el DAR, la hipoxia causada por la isquemia renal conduce a un deterioro funcional de las células epiteliales tubulares, lo que resulta en degeneración y necrosis^{102, 103}. Estas células son grandes consumidoras de oxígeno con abundantes mitocondrias ya que lo requieren para la reabsorción y secreción de sustancias¹⁰⁴, haciéndolas altamente vulnerables a la hipoxia^{105, 106}. Por otro lado, en el trasplante de riñón, el DAR se produce durante la extracción del riñón trasplantado del donante. Después del trasplante en el receptor, la reanudación del flujo sanguíneo causa lesiones por isquemia-reperfusión en el riñón trasplantado¹⁰⁶.

Durante el DAR, en el riñón se induce la activación de HIF en las células epiteliales tubulares y en la vasculatura, lo que es explicado como una respuesta de defensa al disminuir las ROS y retener el glucógeno¹⁰⁷.

Por todo ello, los PHDi podrían proteger contra el DAR o la isquemia-reperfusión renal al activar HIF^{108, 109}. Algunos compuestos con los que se ha descrito esta acción son el roxadustat en un modelo de ratón de nefropatía inducida por cisplatino donde su administración resultó en una mejora en la función renal y una disminución en la apoptosis acompañada de la supresión de citocinas proinflamatorias, generando nefroprotección¹¹⁰. También el uso de enalodustat ejerció efectos nefroprotectores al alterar el metabolismo de las células tubulares¹⁰⁷.

Estos resultados experimentales sugieren que los PHDi son agentes nefroprotectores prometedores contra el DAR o la lesión por isquemia-reperfusión renal producida después de un trasplante renal.

1.6 Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad inflamatoria crónica y progresiva del tracto gastrointestinal que clínicamente incluye la Enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU)¹¹¹. Ambas patologías alternan períodos de recaída y remisión¹¹² caracterizados por la inflamación de la mucosa intestinal, dando lugar a síntomas tales como dolor abdominal, diarrea, sangre en heces y pérdida de peso¹¹³. La progresión de la EII está asociada al desarrollo de una serie de complicaciones comunes como la anemia y la fibrosis, lo que provoca la necesidad de hospitalizaciones y cirugías con la consecuente disminución de la calidad de vida.

En cuanto a su distribución, la EII se da tanto en adolescentes como en adultos y afecta por igual a hombres y mujeres¹¹⁴. La enfermedad a menudo comienza en la adolescencia con un 25 % de los pacientes diagnosticados antes de los 18 años y siendo aproximadamente el 25 % de los pacientes menores de 20 años¹¹⁵. La incidencia y prevalencia de la EII aumentó notablemente durante la segunda mitad del siglo XX y desde principios del siglo XXI ha sido considerada una de las enfermedades gastrointestinales más prevalentes. Las tasas más altas se observan en Europa y América del Norte afectando a 2,6 millones y a 1,2 millones respectivamente¹¹⁶, sin embargo, se han observado tasas crecientes de incidencia en regiones como Asia, África y América del Sur a medida que estos países se vuelven más desarrollados¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Aunque la causa de la EII sigue siendo desconocida, se considera que es el resultado de una combinación de factores ambientales que conducen a agresiones inflamatorias recurrentes, que, en pacientes genéticamente predispuestos, conduce al desarrollo de una inflamación crónica^{120, 121}. El desarrollo de la inflamación crónica no resuelta se ha relacionado con problemas intestinales que incluyen tanto la disfunción de la barrera epitelial como la pérdida de tolerancia contra componentes del microbioma intestinal¹²². Primero, la pérdida de la función protectora de la barrera física aumenta la permeabilidad, facilitando el contacto entre los antígenos luminales y las células presentes en la mucosa. En segundo lugar, las células epiteliales intestinales participarían activamente en el reconocimiento de los patógenos y en el reclutamiento de células inmunes, dando lugar al comienzo de la inflamación.

Los pacientes con EII tienen un riesgo significativamente mayor de cáncer colorrectal principalmente como resultado de los efectos pro-neoplásicos de la inflamación intestinal crónica. Sin embargo, la incidencia ha disminuido en los últimos 30 años, lo que se atribuye tanto al éxito de los programas de vigilancia del cáncer colorrectal como al mejor control de la inflamación de las mucosas¹²³.

Dado que la EII es una enfermedad crónica y progresiva, lo óptimo es comenzar el tratamiento en las primeras etapas de la enfermedad con el objetivo de prevenir complicaciones. El paradigma de tratamiento actual es utilizar la terapia biológica de manera temprana para lograr la remisión clínica y la curación de la mucosa, que en última instancia disminuirá el uso de corticosteroides, cirugías y hospitalizaciones¹²⁴.

Los tratamientos de primera línea se centran en controlar la inflamación usando medicamentos como la mesalamina y los corticosteroides, sin embargo, estos compuestos a menudo son insuficientes para mantener los pacientes en remisión. En estos casos, se utilizan terapias con inmunomoduladores como azatioprina o metotrexato para prevenir las recaídas. Los tratamientos más actuales se centran en el uso de anticuerpos dirigidos contra citocinas que se sabe que juegan un rol central en el desarrollo de la patología como el TNF α ¹²⁵.

A pesar de la cantidad de medicamentos disponibles, existen altas tasas de falta de respuesta primaria, pérdida de respuesta o reacciones adversas que requieren nuevos tratamientos adicionales. Por ejemplo, el uso de azatioprina está relacionado con un mayor riesgo de cáncer y la terapia anti-TNF puede conducir a inmunodepresión y se relaciona con un mayor riesgo de enfermedades infecciosas, así como también un mayor riesgo de cáncer¹²⁵. Además, aún suelen aparecer complicaciones como la fibrosis que representa uno de los motivos más comunes de intervención quirúrgica¹²⁶.

La fibrosis intestinal es el resultado de una inflamación intestinal crónica, recurrente o no resuelta. El intento de reparar el tejido dañado puede provocar una producción excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC) así como el depósito de tejido conectivo, favoreciendo la formación de estenosis y la pérdida de la función normal. En la colitis ulcerosa, la fibrosis intestinal se restringe a las capas de la mucosa y submucosa, pero en la enfermedad de Crohn puede afectar a todo el espesor de la pared intestinal.

Actualmente no existen herramientas de diagnóstico ni predictores clínicos para la fibrosis intestinal, además, no hay ningún marcador genético o serológico habitual para su uso clínico. Por tanto, la fibrosis intestinal suele diagnosticarse cuando se vuelve clínicamente evidente y ya se ha producido la estenosis, por medio de procedimientos endoscópicos y quirúrgicos. En diversos estudios se ha descrito que en torno al 30% los pacientes de EII padecen fibrosis en un grado leve/moderado, mientras que más del 50% de los pacientes con enfermedad de Crohn desarrollan un grado severo en los primeros 10 años después de haber sido diagnosticados y una alta proporción de ellos requiere hospitalización y cirugía¹²⁷.

Aunque durante los últimos años ha habido avances en la comprensión fisiopatológica de la EII, los mecanismos que impulsan el desarrollo de complicaciones como la formación de estenosis fibróticas, no están tan claros. Como comentábamos anteriormente, la fibrosis es un mecanismo fisiopatológico de reparación que conduce al depósito de tejido conectivo en la MEC después de que se ha producido una lesión. Este intento de reparar el tejido dañado puede resultar en una reducción del diámetro de la luz, una estenosis intestinal y, en última instancia, una obstrucción. Durante este proceso, la inflamación y la fibrosis son mecanismos íntimamente entrelazados que coexisten dentro de la estenosis intestinal. La MEC está formada principalmente por fibronectina y colágeno (subtipos I, III y V) que son depositados en los espacios de la submucosa, así como en las capas musculares por un aumento en el número de fibroblastos y miofibroblastos activados. Todas las células productoras de MEC intestinal actúan de forma sinérgica y están controladas por numerosas moléculas mediadoras entre las cuales el Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) es el más importante.

La extensión de la fibrosis también depende del equilibrio entre la producción y la degradación de proteínas de la MEC. La MEC suele ser degradada por las metaloproteinasas de matriz (MMP), que pueden ser inducidas por el factor de crecimiento de los hepatocitos o inhibidas por el inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP). En la EII con fibrosis intestinal, el equilibrio entre MMP y TIMP parece estar alterado por la regulación a la baja de algunas MMP y la sobreexpresión de TIMP, favoreciendo así la fibrogénesis y la deposición excesiva de MEC¹²⁸.

A pesar de los importantes avances terapéuticos, la incidencia en la formación de estenosis en el colon no ha cambiado notablemente. Esto implica que el control de la inflamación por sí solo no necesariamente afecta al proceso fibrogénico asociado, cuyo manejo aún no está bien cubierto con las opciones terapéuticas actuales. De hecho, el uso a largo plazo de medicamentos como el anti-TNF α y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos dan lugar a anastomosis. Debido a ello, el desarrollo de agentes como pueden ser los compuestos hipoximiméticos, que puedan afectar específicamente el proceso fibrótico, es muy relevante.

En condiciones fisiológicas, el tracto gastrointestinal se caracteriza por un gradiente de oxígeno pronunciado desde la luz anaeróbica hacia la submucosa altamente vascularizada, la denominada hipoxia fisiológica, sin embargo, en la EII se observa una desregulación de este gradiente de oxígeno. El desequilibrio resultante entre el consumo y el suministro de oxígeno hace que la mucosa intestinal inflamada sea severamente hipóxica, siendo la hipoxia una característica común de la EII¹²⁹.

Curiosamente, un grado bajo de hipoxia en condiciones fisiológicas promueve las propiedades de barrera epitelial en las células del intestino. En particular, cuando las células del intestino son expuestas a hipoxia exhiben un patrón de expresión génica dirigido a preservar la función de barrera del intestino y así reducir la carga inflamatoria. Por ello, la expresión de HIF está relacionado con la producción del factor trefoil, mucinas, β -defensinas así como con la regulación de la respuesta inmune en la mucosa y la expresión de proteínas de unión como la ocludina, la zónula occludens o la claudina-1. A través de la regulación de estos factores, HIF proporciona un mecanismo de protección de la barrera intestinal en la EII ya que en diferentes estudios se ha demostrado que la inhibición de las PHDs es de hecho protectora en modelos murinos de colitis¹³⁰.

Varios estudios han proporcionado evidencias de que el uso de PHDi como DMOG o FG-4497 tiene un efecto protector en modelos murinos de colitis^{131, 132}. Esto inicialmente se demostró utilizando modelos químicos de colitis aguda y posteriormente se ha confirmado mediante modelos agudos y crónicos basados en estudios genéticos y químicos¹³³⁻¹³⁵.

Existen varios mecanismos por los cuales los PHDi son capaces de ejercer estos efectos beneficiosos y cada uno está relacionado con la actividad de las distintas PHDs. La inhibición de la PHD1 está relacionada con la mejora de la barrera epitelial a través de la inhibición de la apoptosis de las células epiteliales. El ratio de la apoptosis celular es fundamental para el mantenimiento correcto de la barrera intestinal¹³⁶. En el caso de la EII este ratio está aumentado, dando lugar a la pérdida de la función protectora de la barrera intestinal con la consecuente exposición del sistema inmune a la microbiota intestinal¹³⁷. Diversos estudios han demostrado la implicación de la isoforma PHD1 en la regulación de la apoptosis de las células epiteliales intestinales¹³¹, por lo que su modulación farmacológica por medio de los PHDi da lugar a efectos protectores en modelos experimentales de colitis¹³⁸.

Recientemente se ha identificado una firma transcripcional de protección de la barrera en células epiteliales intestinales expuestas a hipoxia o a la inhibición farmacológica por medio de PHDi. Ya que el principal artífice de esta firma transcripcional es HIF, la inhibición de la isoforma PHD2 que es su principal regulador es considerado un segundo mecanismo de especial importancia. La protección descrita en modelos murinos de colitis es llevada a cabo a través de la mejora de la expresión de una batería de genes diana de HIF con función protectora específica de la barrera epitelial. Entre ellos podemos citar a CD55 que participa en la eliminación de neutrófilos¹³⁹, a la enzima ecto-50 nucleotidasa y al receptor A2B, que promueven la señalización de la adenosina contribuyendo a la resolución de la inflamación de las mucosas^{140, 141}, a las mucinas y al factor trefoil intestinal que conducen a la formación de una capa mucosa protectora^{142, 143}, y a la glicoproteína P que está involucrada en la homeostasis de las células epiteliales intestinales y sus interacciones con las bacterias del huésped¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Un tercer mecanismo por el cual la inhibición farmacológica de las PHDs puede tener efectos antiinflamatorios en la colitis es a través de la regulación de la apoptosis de los neutrófilos¹⁴⁷. La infiltración de neutrófilos y la formación de abscesos en las criptas del colon es un evento fisiopatológico distintivo de la EII y la regulación de la vida útil de los neutrófilos es en consecuencia, un evento clave para determinar el alcance y duración de la inflamación. En este caso, la hidroxilasa implicada es la PHD3 ya que su inhibición está relacionada con el descenso de la supervivencia de los neutrófilos, así como de la inflamación inducida por medio de ellos¹⁴⁷.

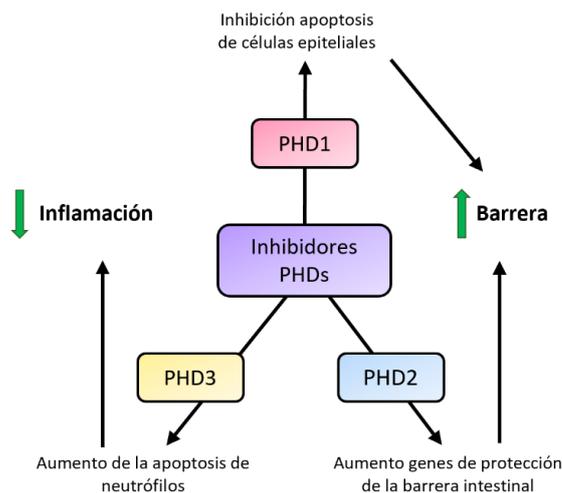


Figura 6. Mecanismos protectores de los PHDi en la EII. Adaptado de ¹²⁰.

1.7 HIF y neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas

Los procesos degenerativos del sistema nervioso central (SNC), denominados neurodegeneración, están actualmente vinculados con la pérdida progresiva de la función neuronal y su discapacidad intelectual y/o motora asociada. Actualmente, su incidencia ha aumentado de forma significativa principalmente por el aumento de la esperanza de vida, lo que representa un importante problema de salud que demanda nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento. Los procesos neurodegenerativos afectan a personas de todas las edades y se dan en varias enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington (EH), la enfermedad de Parkinson, el accidente cerebrovascular, la esclerosis múltiple y muchas otras.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes a este proceso aún no se han comprendido en su totalidad. Hasta la fecha, la etiología de la mayoría de los trastornos es de naturaleza multifactorial, existiendo complejas interacciones entre factores ambientales, endógenos y genéticos¹⁴⁸. Este origen multifactorial supone que haya diferentes vías de señalización que puedan estar implicadas durante la patogenia. Una de estas vías es indudablemente la hipoxia, ya que su desequilibrio produce desajuste energético, estrés oxidativo e inflamación.

Es remarcable que diversos estudios han descrito que la hipoxia podría desempeñar un papel central en la activación de la neurodegeneración, ejerciendo HIF-1 α un doble papel como responsable tanto de la protección, como de los efectos nocivos producidos durante el desarrollo de los trastornos más relevantes asociados a la neurodegeneración¹⁴⁹.

Dado que el cerebro es un gran consumidor de energía, es particularmente susceptible a la hipoxia. En consecuencia, la escasez severa y prolongada de oxígeno puede contribuir al daño cerebral induciendo la muerte celular y la neurodegeneración. Curiosamente, HIF-1

induce la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la eritropoyetina (EPO) y sus correspondientes receptores, lo que aumenta la disponibilidad de oxígeno al promover la eritropoyesis y la angiogénesis. Además, HIF-1 α también puede activar genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa¹⁵⁰.

Se ha observado que una hipoxia suave puede inducir tolerancia a una lesión hipóxica mayor por medio de la activación de HIF-1 α , permitiendo las modificaciones necesarias para una mejor y más rápida recuperación del tejido afectado (pre-condicionamiento hipóxico). De hecho, en condiciones isquémicas, la activación HIF-1 α en las células representa un mecanismo protector contra la isquemia cerebral o en futuras lesiones^{151, 152}. Es más, se ha descrito que, en un amplio abanico de enfermedades, incluidas algunas neurodegenerativas, HIF-1 α regula positivamente la respuesta neuroprotectora contra factores de estrés como las especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁵³ y la inflamación. Sin embargo, el papel de HIF-1 α va más allá de esta respuesta adaptativa, ya que también interviene en la regulación de otros procesos patológicos que incluyen la modulación de la apoptosis, la angiogénesis y la remielinización¹⁵⁴.

En condiciones hipóxicas, se sabe que HIF-1 α está involucrado en la protección de las neuronas a través del aumento en la captación de glucosa por medio de un mecanismo independiente de la insulina¹⁵⁵. Durante la privación de glucosa, el estrés metabólico inducido por este déficit puede producir la activación intracelular del catabolismo oxidativo de la glucosa, lo que incluye la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. Dado que el cerebro consume al menos un 20-30 % de oxígeno total, y necesita 120 g diarios de glucosa para cumplir con su función normal, una tasa disminuida de glucólisis en el cerebro produce la reducción de los mecanismos de supervivencia celular.

Las mitocondrias son quizás los principales productores de ROS y también el principal objetivo del daño oxidativo, estando descrito en varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington¹⁵⁶. En este sentido, HIF-1 α protege contra el estrés oxidativo al actuar en las mitocondrias¹⁵⁷. El déficit mitocondrial inclina el balance energético hacia la glucólisis aeróbica para compensar la fosforilación oxidativa deteriorada, siendo la regulación positiva de las enzimas glucolíticas por medio de HIF-1 α una modificación adaptativa de carácter beneficioso¹⁵⁸.

Dado que la señalización por la vía de HIF-1 α tiene un efecto neuroprotector, se entiende que los fármacos que inducen un aumento de su concentración intracelular podrían representar un objetivo terapéutico muy prometedor para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, los compuestos hipoximiméticos pueden ser potenciales medicamentos para el tratamiento de enfermedades neurológicas¹⁵⁹. Diversos quelantes de hierro han demostrado tener efectos neuroprotectores en modelos animales, aunque los

mecanismos por los que los han llevado a cabo aún no están totalmente claros. Se cree que estos compuestos podrían inhibir la producción de radicales libres, y simultáneamente, inducir la suficiente, pero no excesiva, activación de HIF-1 α , con su respectiva firma transcripcional de protección mediante la hipoxia¹⁶⁰.

1.8 Enfermedad de Huntington. Generalidades y papel de HIF

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo progresivo del SNC caracterizado por la pérdida selectiva de neuronas en el cuerpo estriado y en el córtex. Fue nombrada por primera vez en 1841 por Charles Water y finalmente fue descrita en 1872 por George Huntington, un médico estadounidense que la denominó corea hereditaria. La enfermedad se caracteriza por una disfunción motora progresiva, deterioro cognitivo y trastornos psiquiátricos¹⁶¹.

La EH es una enfermedad genética de herencia autosómica dominante cuya edad media de aparición es de 35 a 44 años y el tiempo medio de supervivencia es de 15 a 18 años tras su diagnóstico. Está causada por una expansión en las repeticiones del triplete CAG del gen que codifica la huntingtina (HTT) en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). El gen de la HTT normal presenta menos de 26 repeticiones CAG, mientras que el mutado puede presentar de 36 a 39 repeticiones (penetrancia incompleta) o 40 o más repeticiones (penetrancia completa). La expansión de estas repeticiones CAG en el gen de la HTT codifica una poliglutamina (polyQ) que resulta en una proteína mutante. Por ello, el diagnóstico se basa en antecedentes familiares positivos, hallazgos clínicos característicos y la detección de una expansión de 36 o más repeticiones de CAG en el gen de la HTT¹⁶².

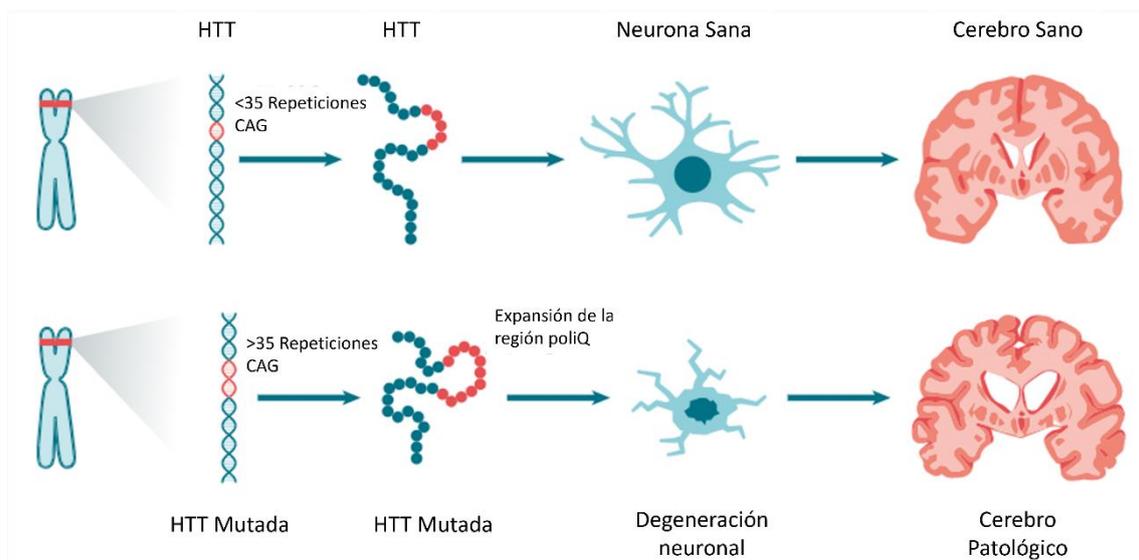


Figura 7. Representación del origen y consecuencias de la enfermedad de Huntington.

La proteína huntingtina se expresa ubicuamente, teniendo una alta expresión en neuronas y células gliales. Aunque sus funciones fisiológicas siguen siendo cuestión de debate, hay evidencias que apuntan a un papel central en el desarrollo embriogénico, en controlar la producción del factor neurotrófico cerebral (BDNF), en la transcripción de genes neuronales y en la transmisión sináptica¹⁶³.

La muerte neuronal observada en la EH podría deberse a la pérdida de función y/o ganancia de toxicidad de la HTT mutante¹⁶⁴. Aunque la causa de la EH es bien conocida y la HTT mutante es fundamental para la fisiopatología de la EH, la causa última de la muerte neuronal es aún incierta¹⁶⁴.

Los mecanismos de daño tisular en la EH comprenden excitotoxicidad, daño mitocondrial, radicales libres e inflamación. Al principio, la neuroinflamación puede considerarse beneficiosa para el tejido neuronal, ya que promueve la eliminación de restos celulares, pero el escenario es definitivamente más complejo. Por ejemplo, además de modular las funciones de las células inmunitarias, los mediadores inflamatorios también actúan sobre las neuronas, posiblemente contribuyendo a su muerte. La muerte neuronal activaría aún más la inflamación, lo que resulta en un círculo vicioso de inflamación y neurodegeneración¹⁶⁵.

Las terapias actuales para la EH permiten controlar algunos de los principales síntomas como la corea, la psicosis o la depresión para mejorar la calidad de vida de los pacientes, sin embargo, estos tratamientos solo mejoran las características clínicas de la enfermedad, ya que los beneficios son solo temporales y desaparecen cuando se suspende el tratamiento. Desafortunadamente, ninguna terapia actual ha demostrado interferir con la historia natural subyacente de la enfermedad, ralentizando o deteniendo su progresión.

Curiosamente, algunos estudios han informado del uso beneficioso de HIF en este trastorno. El pretratamiento de las células de astrogliá C6 con compuestos que activan la señalización de HIF como el CoCl₂, la mimosina y la DFX, atenúa los efectos citotóxicos inducidos en la mitocondria por el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor de complejo II de la cadena transportadora de electrones cuyos efectos se asemejan a la EH¹⁶⁶.

Asimismo, el compuesto VK-28 mejoró los síntomas conductuales y patológicos en un modelo murino transgénico de la enfermedad de Huntington y el compuesto clioquinol disminuyó la acumulación de los agregados de HTT así como mejoró las funciones motoras y cognitivas¹⁶⁷.

1.9 Traumatismos craneoencefálicos

El traumatismo craneal inducido (TCI) se define como una lesión cerebral provocada por fuerzas mecánicas externas que causan un impacto directo sobre el cráneo o bien un

movimiento vigoroso del cerebro dentro de él, dando lugar a una función cerebral alterada. La mayoría de las veces el TCI es causado por caídas, accidentes de tráfico y asaltos con violencia¹⁶⁸.

Es una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en niños y adultos jóvenes, afectando cada año a aproximadamente 69 millones de personas en todo el mundo, viviendo más del 2 % de la población con discapacidades neurológicas causadas por él. Actualmente, el TCI representa alrededor del 30-40 % de todas las muertes relacionadas con lesiones, y se estima que será la cuarta causa de discapacidad para el año 2030¹⁶⁹.

Los síntomas del TCI incluyen mareos, dolores de cabeza, amnesia y náuseas que pueden mejorar en unos días o semanas tras el traumatismo, sin embargo, una lesión grave puede conllevar consecuencias a largo plazo como importantes enfermedades neurológicas, neuropsicológicas y deterioro cognitivo. De este modo, los pacientes sufren pérdidas de memoria, cambios de personalidad y una disminución en su capacidad de atención. Así mismo, el TCI también es un factor de riesgo para la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la encefalopatía traumática crónica¹⁷⁰.

El tratamiento del TCI varía según la gravedad de la lesión y consiste en farmacoterapia para reducir la inflamación, opciones quirúrgicas para reducir la presión intracraneal y el edema así como extirpar el tejido cerebral necrótico y por último la rehabilitación¹⁷¹. Aunque varios fármacos han tenido buenos resultados en modelos animales, ningún ensayo clínico ha tenido éxito hasta ahora, por lo que no existen medicamentos aprobados por la FDA para su tratamiento.

En los últimos años, se han revelado diferentes vías involucradas en la lesión de TCI y esto ha ayudado a comenzar a dilucidar sus mecanismos patológicos, sin embargo, las amplias conexiones entre las distintas rutas de señalización han hecho que aún quede mucho camino por recorrer.

La patogenia del TCI se puede dividir en dos mecanismos: lesión primaria y secundaria¹⁷². La lesión primaria se refiere al daño del tejido cerebral que es resultado directo de las fuerzas externas aplicadas durante el trauma, y según las características biomecánicas del impacto, puede ser focal o difuso. A menudo incluyen fracturas de cráneo, hemorragias, contusiones y lesiones axonales. Por el contrario, la lesión secundaria se refiere al daño neurológico que se desarrolla gradualmente dentro de las horas, semanas y meses posteriores al trauma. Consiste en una serie de procesos celulares, fisiológicos y moleculares que afectan a todo tipo de células del cerebro. Los principales mecanismos identificados que orquestan los mecanismos de lesión secundaria son la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE), la

excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación y la muerte celular¹⁷³.

La neuroinflamación crónica que sigue al TCI es un factor clave en el desarrollo de la lesión secundaria. Desde un punto de vista esquemático, el mecanismo neuroinflamatorio implicado en la fisiopatología de la lesión cerebral consiste en lo siguiente: el TCI causa daño tisular y neuronal, lo que resulta en la liberación de grandes cantidades de moléculas denominadas DAMP (Damage-associated molecular patterns) en el microambiente. Los DAMP, a su vez, activan las células inmunitarias innatas circundantes y reclutan células inmunitarias periféricas hacia el sitio de la lesión. La función inicial de estas células inmunitarias es contener la lesión y eliminar los residuos y células muertas. Sin embargo, los DAMP inducen la activación de las células de la microglía, que secretan moduladores proinflamatorios que exacerbaban la lesión neuronal y contribuyen al deterioro de la BHE ya que alteran la expresión de proteínas que mantienen su integridad (ZO1, Claudina-5, Ocludina). Los astrocitos también pueden activarse y dar lugar a la formación de cicatrices gliales. Este estado inflamatorio crónico agrava la lesión y altera la homeostasis del cerebro, iniciándose la neurodegeneración progresiva y aumentando el riesgo de secuelas como la disfunción cognitiva y conductual.

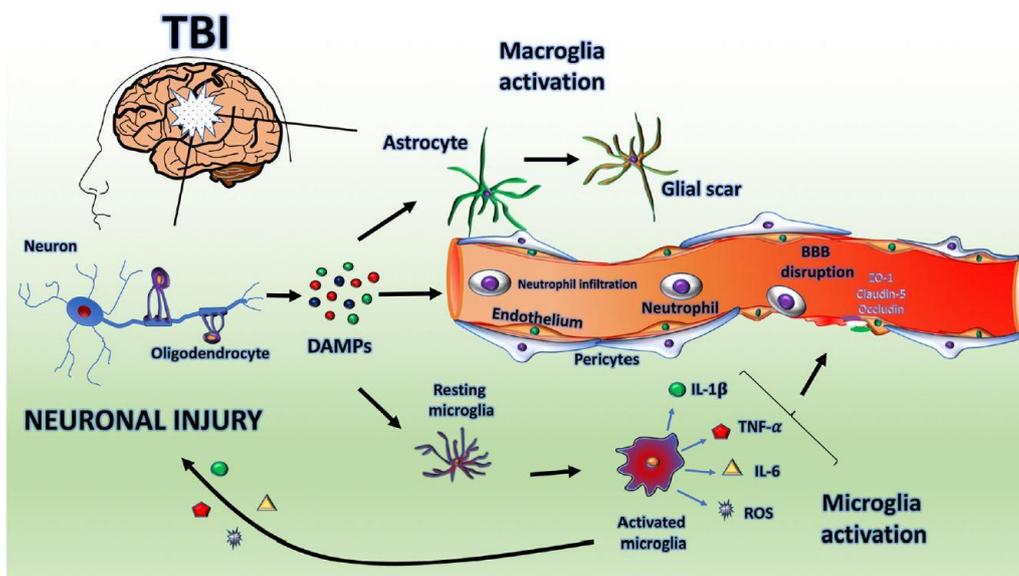


Figura 8. Mecanismo neuroinflamatorio implicado en la fisiopatología del TCI. Adaptado de ¹⁷⁴.

Como hemos mencionado anteriormente, la integridad de la BHE juega un papel esencial en la patogenia del TCI ya que, aunque es un evento temprano que ocurre pocas horas después de la lesión, puede persistir durante años¹⁷⁵. Se puede medir cuantificando la extravasación de proteína sérica, fibrinógeno y de la inmunoglobulina G (IgG). La función de

la BHE es fundamental para mantener la homeostasis cerebral al suprimir la entrada de células inmunes periféricas, proporcionar el suministro de nutrientes, eliminar sustancias tóxicas y además actuar como una barrera de intercambio de solutos entre la sangre y el cerebro. Así, la BHE proporciona una barrera semipermeable que separa la circulación sanguínea del ambiente cerebral para regular el tráfico de moléculas.

La BHE está compuesta por células endoteliales especializadas fenestradas por proteínas transmembrana conocidas como proteínas de unión estrecha (occludina y claudinas) o moléculas de adhesión de unión (JAM) que restringen la permeabilidad paracelular. Estas proteínas transmembrana están ancladas a la superficie citoplasmática a través de proteínas de anclaje (zonula occludens (ZO)). Las células endoteliales que forman la BHE están reguladas por las células circundantes, como los pericitos, astrocitos, neuronas y microglía para mantener el equilibrio iónico y la homeostasis¹⁷⁶.

Tras una agresión mecánica, en el cerebro se produce una deformación inmediata del tejido así como un daño en los vasos sanguíneos circundantes¹⁷⁷. Tras el impacto, la disrupción de la BHE contribuye al daño tisular, a la formación del edema, la inflamación y la disfunción neural. Sus efectos son duraderos y están asociados con la neurodegeneración y otras comorbilidades, lo que la convierte en un objetivo crucial para el tratamiento del TCI, ya que su restauración temprana puede ayudar a prevenir las secuelas asociadas.

En la disfunción de la BHE existen dos procesos biológicos clave cuya interrupción contribuye a su disfunción. El primero implica un aumento en el transporte paracelular provocado por la pérdida de proteínas de unión estrecha, lo que permite el paso de moléculas que normalmente estarían restringidas, además de aumentar la afluencia de células inmunitarias como como neutrófilos que pueden exacerbar la respuesta inflamatoria. El segundo proceso ocurre debido a un aumento de la transcitosis a través de las células endoteliales, lo que lleva al transporte de moléculas más grandes y proteínas séricas como la albúmina, que normalmente no pueden penetrar en el cerebro¹⁷⁸.

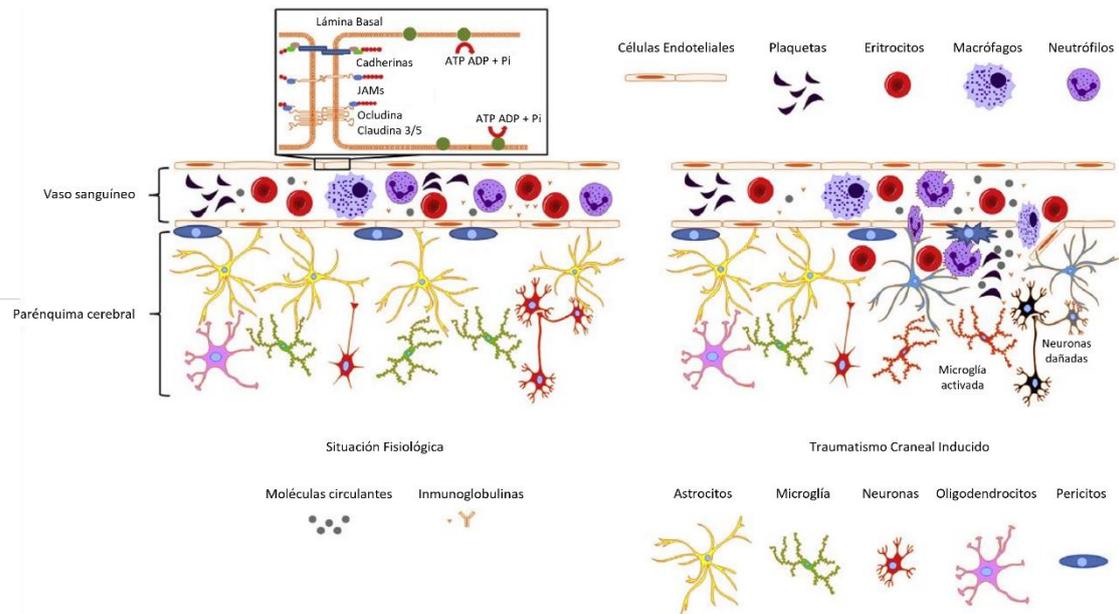


Figura 9. Comparación de los procesos que suceden en la barrera hematoencefálica de manera fisiológica y tras una lesión cerebral traumática. Adaptado de ¹⁷⁹.

Por todo ello, durante la lesión secundaria se produce la neuroinflamación y la activación glial, contribuyendo ambas a la interrupción de la BHE. El TCI provoca la activación del endotelio y la respuesta neuroinflamatoria en cuestión de minutos tras la lesión, lo que da lugar a un aumento en el reclutamiento y liberación de citocinas, quimiocinas, neutrófilos y otros mediadores proinflamatorios¹⁸⁰. Las células inmunitarias innatas también impulsan la neuroinflamación y la desregulación de BHE, por ejemplo, la microglía se activa por la albúmina que ha entrado en el cerebro, conduciendo a la liberación de las citoquinas IL1, TNF α , TGF β y MCP1, las cuales influyen en la permeabilidad de BHE y en la distribución de las proteínas de unión estrecha¹⁸¹. La extravasación de la albúmina también hace que los astrocitos liberen MMPs que degradan la membrana basal, aumentando así la permeabilidad de la BHE y el edema. La liberación de citocinas por las células gliales activa distintas vías como Rho/ROCK, PKC, o/y MAPK, que afectan a la fosforilación de las proteínas de unión y contribuyen a un aumento en la permeabilidad¹⁸².

Por otro lado, el estrés oxidativo es un disruptor conocido de la BHE y puede ser el catalizador inicial del aumento en la permeabilidad¹⁸³. Después del daño mitocondrial, las especies reactivas de oxígeno liberadas por los astrocitos, la microglía y las neuronas activan aún más la liberación glial de citocinas y quimiocinas. Las ROS afectan a las vías mencionadas, que disminuyen la expresión de las proteínas de unión y aumentan las MMPs para aumentar la permeabilidad paracelular a través de la peroxidación de lípidos. La microglía también aumenta la expresión de las moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM1), de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), la P-selectina y la E-selectina, lo que permite una

mayor adhesión y migración de leucocitos a través del endotelio del cerebro para provocar respuestas inflamatorias periféricas adicionales¹⁸⁴.

El papel de HIF-1 α en TCI es poco conocido y los estudios que existen muestran resultados contradictorios, por lo que es posible que HIF-1 α ejerza un rol dual durante la lesión. Por un lado, varios artículos han descrito el efecto neuroprotector de la activación de HIF-1 α durante la lesión secundaria mediado por óxido nítrico (NO). Tras el TCI, la deficiencia de NO y la consiguiente alteración de su metabolismo da lugar a desequilibrios en los procesos de S-nitrosilación, los cuales están implicados en el bloqueo de los procesos de neurorreparación. La actividad de HIF-1 α está regulada por NO a través de modificaciones post-transcripcionales de S-nitrosilación, la cual está regulada dinámicamente por distintos metabolitos de NO tales como S-nitrosoglutation (GSNO) y el peroxinitrito, donde el GSNO estabiliza HIF-1 α y el peroxinitrito lo desestabiliza. Se ha descrito que la administración de GSNO estabiliza HIF-1 α e induce sus genes dependientes, de este modo, estimula el proceso de regeneración y ayuda en la recuperación funcional de animales que han sufrido un TCI¹⁸⁵. Dado que el proceso de neurorreparación depende de mecanismos de regeneración que involucran una integración coordinada de la angiogénesis, la neurogénesis y la remielinización, las terapias que aumenten este proceso son muy interesantes como potencial tratamiento que sirva para estimular la recuperación de las funciones neurológicas.

En otros estudios también se ha descrito que la neurorreparación producida por medio de la estimulación de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) durante la fase crónica del TCI depende de la actividad de HIF-1 α ¹⁸⁶.

Por otro lado, se ha demostrado que el pre-condicionamiento hipóxico protege al cerebro contra la hipoxia o isquemia causada por TCI, mejorando la tolerancia a la hipoxia y atenuando la pérdida neuronal de la corteza cerebral en ratas¹⁸⁷. El mecanismo está relacionado con el aumento del transporte de glucosa mediado por la inducción de la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3, que son genes diana de HIF-1 α . Durante la hipoxia-isquemia cerebral producida después del TCI se reduce el suministro de oxígeno, lo que lleva a alteraciones en el metabolismo de la glucosa, siendo la escasez del suministro de energía una de las causas más importantes de apoptosis neuronal. Dado que la función de GLUT1 es principalmente transportar glucosa a través de las células endoteliales de la barrera BHE y ayudar a que la glucosa pase a través la membrana de las células gliales, su papel es indispensable para disminuir la apoptosis en el cerebro después de una lesión¹⁸⁸.

Por todo ello, la estabilización de HIF-1 α activa la supervivencia del tejido mediante la inducción de varias enzimas clave involucradas en el metabolismo celular como el

transportador de glucosa (GLUT1 y GLUT3), la angiogénesis (VEGF, VEGFR1, angiopoyetina) y la captación de radicales libres (hemo hidroxilasa 1; HO1). Sin embargo, la inhibición de HIF-1 α en la fase aguda del TCI también ha demostrado tener efectos neuroprotectores^{189, 190}. Esto es debido a que HIF-1 α promueve la apoptosis y aumenta la permeabilidad de la BHE y la formación de edemas por medio del VEGF y la acuaporina 4 (AQP4).

Todos estos resultados hacen que el papel de HIF-1 α tras un TCI sea controvertido, es posible que pueda tener diferentes implicaciones según el momento tras la lesión, por lo que serían necesarios más estudios que esclarezcan su posible efecto neuroprotector en esta patología.

2. OBJETIVOS

2 Objetivos

El **objetivo general** de esta Tesis fue el desarrollo preclínico farmacológico del compuesto VCE-005.1, el cual es una molécula hipoximimética que modula la ruta de la hipoxia.

El factor inducible por hipoxia (HIF) es un factor de transcripción que media la respuesta celular a bajas concentraciones de oxígeno. Desde hace unos años, se ha estudiado el potencial uso de la manipulación de la vía de la hipoxia en el tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias, isquémicas y neurodegenerativas, convirtiendo la vía HIF en una interesante diana terapéutica. Por ello, la manipulación farmacológica de la ruta de la hipoxia tiene un gran valor para la investigación biomédica y las empresas farmacéuticas.

Para llevar a cabo este objetivo general, se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

Objetivo 1. Estudio del perfil farmacológico (metabolismo y toxicología) así como de la farmacocinética del compuesto VCE-005.1.

Objetivo 2. Estudio de la modulación de la ruta de la hipoxia por el compuesto VCE-005.1 e identificación molecular de su mecanismo de acción.

Objetivo 3. Demostrar eficacia terapéutica del VCE-005.1 en modelos murinos de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), Enfermedad de Huntington (EH) y Traumatismo craneal inducido (TCI).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3 Material y métodos

3.1 Experimentos *in vitro*

3.1.1 Reactivos

El reactivo dimethylloxalylglycina (DMOG) se obtuvo de Cayman Chemical (#CAY-71210, MI, EE. UU) con una pureza de ≥ 98 %. Los plásmidos HA-PHD1, HA-PHD2 y HA-PHD3 fueron obtenidos de Addgene mientras que los plásmidos GST-PHDs fueron amablemente proporcionados por Edurne Berra (CICbioGUNE, Bilbao, España). El scramble control del siRNA (#D-001810) y el ON-TARGET plus SMART pool contra B55 α (#L-004824) se adquirieron en Dharmacon (Waltham, MA, EE. UU). El resto de los reactivos, si no se indica lo contrario, se adquirieron en Sigma (MO, EE. UU).

3.1.2 Compuestos

El compuesto VCE-005.1 (3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic ácido hydroxamato) fue proporcionado por Emerald Health Biotechnology España con una pureza del 99.11 %.

3.1.3 Líneas celulares

Las líneas celulares HEK-293T y NIH-3T3-EPO-luc fueron cultivadas en medio DMEN suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y con penicilina-estreptomicina al 1 %. La línea celular CaCo-2 fue cultivada en medio EMEN suplementado con FBS al 10 % y con penicilina-estreptomicina al 1 %. Las células endoteliales microvasculares de cerebro humanas (HBMEC) fueron mantenidas en medio de células endoteliales (ScienCell, CA, EE. UU) suplementadas con 5 % FBS, 1 % de suplemento de factor de crecimiento para células endoteliales (ECGS) y 1 % de penicilina-estreptomicina. Todas las líneas descritas anteriormente fueron mantenidas a 37 °C en un ambiente humidificado al 5 % de CO₂. Las células estriales STHdh^{Q7/Q7} y SdTHh^{Q111/Q111} fueron cultivadas en medio DMEN suplementado con FBS al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 %, a una temperatura de 33 °C en un ambiente humidificado al 5 % de CO₂.

3.1.4 Ensayo de resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER)

La permeabilidad epitelial fue evaluada midiendo la resistencia eléctrica trans-epitelial con el dispositivo Millicell® ERS-2 (Millipore, MA, EE. UU) en monocapas de CaCo-2. Las células CaCo-2 fueron sembradas a una densidad de 500.000 células sobre insertos de policarbonato (6.5 mm diámetro, 0.4 μ m de tamaño de poro) en placas de 12 pocillos. Cada inserto fue colocado en un pocillo con 0.2 ml de medio en la zona apical y 0.6 ml en la basolateral. Las células fueron tratadas con el compuesto VCE-005.1 a diferentes concentraciones durante 24 h. Después, 0.2 ml de sobrenadante de células humanas mononucleares de sangre periférica (PBMC) que habían sido previamente activadas con

fitohemaglutinina M (PHA) durante 48 h fue añadido durante 30 minutos, a continuación, se realizaron tres mediciones de TEER en cada pocillo. Los valores de TEER se calcularon sustrayendo la resistencia del blanco (resistencia eléctrica de un inserto sin células, pero con medio) y multiplicando el resultado por el área efectiva de la membrana (0.6 cm²). Los resultados están expresados como porcentaje de disrupción epitelial tomando como 0 % la disrupción de las células sin tratar.

3.1.5 Ensayo de luciferasa

Para los ensayos de transactivación de EPO-luc, se usaron las células NIH-3T3-EPO-luc que contienen 3 copias de la secuencia consenso ERH del promotor del gen de la eritropoyetina unido al gen de la luciferasa. Se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon con VCE-005.1 durante 12 horas antes de su lisis. En los ensayos con los inhibidores de la fosfatasa PP2A (LB-100 y ácido okadaico), éstos se añadieron durante 30 minutos y luego se estimuló con el compuesto durante 6 horas. La actividad luciferasa del lisado fue cuantificada mediante el sistema Dual-Luciferase Assay (Promega, WI, EE. UU) en el lector de placas TriStar LB 941.

3.1.6 Ensayo de contracción de colágeno

Los fibroblastos NIH-3T3-EPO-luc fueron tripsinizados, lavados con PBS y resuspendidos en medio completo a una densidad de 500.000 células/ml. Los geles de colágeno se hicieron conteniendo una concentración final de 150.000 células/ml y 1 mg/ml de colágeno I con las indicadas concentraciones de VCE-005.1 o DMOG. Se tomaron imágenes digitales de estos geles a tiempo 0 y tras 12 horas. El área de la superficie del gel fue cuantificada en términos de número de píxeles usando ImageJ. Los cambios relativos en el área están descritos como porcentaje del área original.

3.1.7 Ensayo de angiogénesis

Las células verdes HUVEC CytoLight fueron co-cultivadas con fibroblastos dermales humanos (NHDF) en placas de 96 pocillos y tratadas con VCE-005.1, FGF o VEGFA durante 7 días (PrimeKit cryo Essen Biosciences, MI, EE. UU). El proceso de formación de los túbulos fue monitorizado usando algoritmos integrados del equipo IncuCyte. Se muestran fotos representativas a una magnificación de 4x.

3.1.8 Ensayo de neuroprotección estriatal *in vitro*

10.000 células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} fueron sembradas en DMEN suplementado en placas de 96 pocillos y estimuladas con concentraciones crecientes de VCE-005.1 durante 6 h, luego se les añadió 3-NP a 10 mM (Merck) durante otras 30 h. Durante ese periodo de

tiempo, la citotoxicidad inducida por 3-NP fue medida por fluorescencia usando el colorante Yoyo-1 (#Y3601, Life Technologies). Las células tratadas fueron introducidas en el sistema de imagen IncuCyte FLR, donde se calculó mediante el software del equipo el número de células positivas a Yoyo-1 con respecto al total en los distintos tratamientos a lo largo del tiempo.

3.1.9 Extracción de ARN mensajero de los estudios *in vitro*

Las células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} fueron estimuladas con VCE-005.1 durante 6 h, a continuación, el ARN mensajero fue extraído mediante el kit High Pure RNA Isolation (#11828665001, Roche, Barcelona, España). El ARN fue cuantificado por espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y la integridad de este fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.1.10 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

1 µg de ARN total fue retrotranscrito usando el iScript cDNA Synthesis Kit (#1708891, Bio-Rad, CA, EE. UU). A continuación, el ADNc fue analizado mediante PCRs a tiempo real por medio de la iQTM SYBR Green Supermix (#1708882, Bio-Rad) y el equipo CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). Para estandarizar la expresión del ARNm en cada muestra se usaron distintos genes constitutivos; *Gapdh* en los estudios *in vitro* e *in vivo* de colitis y Huntington y *Ppia* para el modelo de traumatismo craneal. La expresión génica fue cuantificada usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y representada como porcentaje de expresión relativa con respecto a los controles (células sin tratar o ratones control).

A continuación, se detallan los primers usados en los estudios:

Gen	Sentido 5' → 3'	Sentido 3' → 5'
m-Tnc	CCACCAAGTTTACCACAGACCT	TCCACAGATTCATAGACCAGGAG
m-Il13	GCTTATTGAGGAGCTGAGCAACA	GCCAGGTCCACACTCCATA
m-Mrc1	CATGAGGCTTCTCCTGCTTCTG	TTGCCGTCTGAACTGAGATGG
m-Timp1	TCCTCTTGTTGCTATCACTGATAGCTT	CGCTGGTATAAGGTGGTCTCGTT
m-Il1β	CTCCACCTCAATGGACAGAA	GCCGTCTTTCATTACACAGG
m-Col3a1	GCCACAGCCTTCTACAC	CCAGGGTCACCATTCTC
m-Ccl3	ACTGCCTGCTGCTTCTCCTACA	AGGAAAATGACACCTGGCTGG
m-Mmp3	CAGACTTGTCCTCGTTTCCAT	GGTGCTGACTGCATCAAAGA
m-Mmp8	GCCTCCCAGTACCTGAACA	ACTCCACATCGAGGCATTTC
m-Mmp9	GCTGACTACGATAAGGACGGCA	TAGTGGTGCAGGCAGAGTAGGA
m-Itf	TCTGGCTAATGCTGTTGGTG	CTCCTGCAGAGGTTTGAAGC
m-Muc2	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC
m-Muc3	CGTGGTCAACTGCGAGAATGG	CGGCTCTATCTCTACGCTCTCC
m-Cldn	AGGTCTGGCGACATTAGTGG	CGTGGTGTGGGTAAGAGGT
m-Zo1	GACCTTGATTTGCATGACGA	AGGACCGTGTAAATGGCAGAC
m-Cox2	TGAGCAACTATTCCAAACCAGC	GCACGTAGTCTTCGATCACTATC

m-iNOS	AACGGAGAACGTTGGATTTG	CAGCACAAAGGGGTTTTCTTC
m-Il6	GTATGAACAACGATGATGCACTTG	ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
m-Ccl2	GGGCTGCTGTTACAGTT	CCAGCCTACTCATTGGGAT
m-Bnip3	GCTCCAAGAGTTCTCACTGTGAC	GTTTTTCTCGCCAAAGCTGTGGC
m-Bdnf	CGCTAATACTGTCACACACGC	TAGCCTGCAGCCTCACCTAT
m-Sod1	GGGATTGCGCAGTAAACATTC	AATGGTTTGAGGGTAGCAGATGA
m-Nqo1	GCCGAACACAAGAAGCTGGAAG	GGCAAATCCTGCTACGAGCACT
m-P21	CAGGGCTCAGGTAGACCTTG	GCCTACCCGGACACTCACCG
m-Ucp2	ACCAGCTCAGCACAGTTGACAATG	GGCCAATAAGATGGGTCTGA
m-Vegfa	CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG	GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC
h-Vegfa	CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG	TTCTGTATCAGTCTTTCTGGTG
h-Epo	CTCCGAACAATCACTGCT	GGTCATCTGTCCCCTGTCCT
h-Gapdh	TGTCCCACTGCCAACGTGTCA	AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT
m-Gapdh	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG
m-Ppia	CATACAGTCTGTCATCTTGTC	AGACCACATGCTTGCCATCCAG

Tabla 2. Primers usados en las PCR a tiempo real.

3.1.11 Western Blot

Después de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS y las proteínas fueron extraídas en 50 µl de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % glycerol and 1 % NP-40) suplementado con 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina y aprotinina, y 1 µl/ml PMSF saturado. Las proteínas fueron cuantificadas por el método Bradford (Bio-Rad), y se cargaron 50-70 µg de proteína previamente hervidas a 95 °C durante 3 minutos en buffer Laemmli.

La electroforesis se llevó a cabo en geles 8-10% SDS/PAGE, después, las proteínas ya separadas se transfirieron a membranas de PDVF (20 V durante 30 minutos) y se bloquearon en solución TBS (0.1 % Tween 20 y 5 % leche en polvo desnatada) durante una hora a temperatura ambiente. La inmunodetección de las proteínas se llevó a cabo mediante la incubación con los anticuerpos primarios (Ver tabla) diluidos en la solución de bloqueo a 4 °C durante la noche. Después de 3 lavados con buffer TTBS, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, volvieron a lavarse las membranas y la detección de la señal se hizo mediante quimioluminiscencia (GE Healthcare Europe GmbH).

Anticuerpo	Técnica	Dilución	Referencia	Casa comercial
anti HIF-1α humano	Western	1:1000	#610959	BD Biosciences
Conejo anti HIF-1α murino	Western e IHC	1:1000; 1:50	#ab179483	Abcam
Conejo anti PHD1 humano	Western	1:1000	#ab108980	Abcam
Conejo anti PHD2 humano	Western	1:1000	#ab109088	Abcam
Conejo anti PHD3 humano	Western	1:1000	#ab30782	Abcam
Conejo anti OH-HIF-1α humano	Western	1:1000	#3434S	Cell Signalling

Rata anti-HA	Western	1:1000	#11867431001	Merk
anti-Phospho-PHD2 Ser125	Western	1:500	Proporcionado por M. Mazzone	
Ratón anti β -actina	Western	1:10000	#A5316	Merk
Rata anti-F4/80 murino	IHC	1:50	#MCA497	Bio-Rad
Ratón anti CD3 murino	IHC	1:50	#sc20047	Santa Cruz Biotech.
Conejo anti Muc-2 murino	IHC	1:100	#ab97386	Abcam
Conejo anti Cldn-1 murino	IHC	1:200	#ab15098	Abcam
Conejo anti CD31 murino	IF	1:100	#ab28364	Abcam
Rata anti Tenascin murino	IF	1:100	#MAB2138	R&D System
Ratón anti- α -SMA conjugado a Alexa 488 murino	IF	1:100	#53-9760-80	Thermo Fisher
Caballo anti-IgG murina	IHC	1:500	#BA-2000-1.5	Vector Lab.
Conejo anti Iba-1 murino	IHC	1:100	#019-19741	Wako
Ratón anti-NeuN murino	IHC	1:100	#MAB377	Millipore
Ratón anti GFAP murino	IF	1:100	#33673	Santa Cruz Biotech.
Conejo anti MPO murino	IHC	1:200	#ab208670	Abcam
Ratón anti-Claudina-5 murino	IF	1:100	#352500	Invitrogen
Conejo anti VCAM-1 murino	IF	1:500	#ab134047	Abcam
Conejo anti Zo1 murino	IF	1:50	#40-2300	Invitrogen
Conejo anti Ki67 murino	IF	1:250	#ab16667	Abcam
Cabra anti-conejo biotilado	IHC	R.T.U	#BP-9100	Vector Lab.
Cabra anti-rata biotilado	IHC	R.T.U	#BP-9400	Vector Lab.
Cabra anti-ratón biotilado	IHC	R.T.U	#BP-9200	Vector Lab.
Cabra anti-ratón Alexa 488	IF	1:500	#A11029	Thermo Fisher
Cabra anti-conejo Texas Red	IF	1:500	#A-6399	Thermo Fisher
Cabra anti-rata Alexa 488	IF	1:500	#A-11006	Thermo Fisher

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para los diferentes ensayos experimentales de proteínas.

3.1.12 Transfección celular e inmunoprecipitación

Se realizaron transfecciones transitorias con Roti-Fect (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y se mantuvieron entre 36 y 48 h. Se mantuvo constante la cantidad de ADN transfectado mediante la adición del vector de expresión vacío. El silenciamiento de B55 α se realizó con el reactivo de transfección Lipofectamine RNAiMax (#13778100, Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron recogidas, lavadas con PBS y lisadas en buffer de inmunoprecipitación (IP). Después, la inmunoprecipitación se completó en una rueda rotatoria tras añadirle 1 μ g de los indicados anticuerpos y 25 μ l de protein A/G Sepharose beads (Santa Cruz). Las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron 5 veces en buffer IP y fueron eluidas en buffer SDS 2x, para a continuación realizar los inmunoblots.

3.1.13 Ensayo de pull-down de GST

Las proteínas recombinantes GST-PHDs (PHD1, PHD2 y PHD3) y GST-HIF fueron obtenidas de acuerdo con los protocolos estándar en bacterias BL21 y purificadas usando Glutation-Sepharosa 4B (GE Healthcare).

3.1.14 Ensayo de hidroxilación de HIF-1 α

Las células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos de las PHDs como se indica. Tras 24 horas de transfección, las células fueron estimuladas durante otras 24h. Después de ello, se inmunoprecipitaron las PHDs como se describe anteriormente¹⁹¹. La proteína recombinante humana GST-HIF-1 α (#ab48734, Abcam) y las PHDs inmunoprecipitadas fueron incubadas en el buffer de reacción (50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 50 μ M FeSO₄, 5 mM ascorbato, y 200 μ M oxoglutarato) durante 1 hora a 30 °C. La reacción de hidroxilación fue detenida añadiendo buffer Laemli a cada muestra para posteriormente ser analizada mediante western.

3.2 Proteómica

3.2.1 Preparación de las muestras para LC-MS/MS

Las bolas usadas en la inmunoprecipitación fueron lavadas 3 veces con 500 μ l de bicarbonato amónico (200 mM) y 60 μ l de Urea (6 M). Las muestras fueron luego reducidas con dithioerhitol (30 nmol, 37 °C, 60 min), alquiladas en oscuridad con iodoacetamida (60 nmol, 25 °C, 30 min) y diluidas en urea (1M) y bicarbonato amónico (200 mM) para la digestión en tripsina (1 μ g, 37 °C, 8h, #V5113, Promega). Después de la digestión, el mix de péptidos fue acidificado con ácido fórmico y desalado con la columna MicroSpin C18 (The Nest Group, Inc) antes del análisis mediante LC-MS/MS.

3.2.2 Análisis cromatográfico y espectrometría de masas

Las muestras se analizaron usando el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU) acoplado al EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific (Proxeon), Odense, Dinamarca). Los péptidos fueron cargados directamente en la columna analítica y fueron separados mediante una cromatografía de fase reversa usando una columna de 50 cm con un diámetro interno de 75 μ m, empacado con un espectrómetro de partículas C18 de 2 μ m (Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU). Los gradientes cromatográficos empezaron con el buffer A al 95% y el buffer B al 5 % con un ratio de flujo de 300 nl/min durante 5 minutos y se incrementó gradualmente hasta el 25 % del tampón B y el 75 % del A en 52 min y luego al 40 % del tampón B y 60 % del A en 8 min. Después de cada análisis, la columna se lavó durante 10 min con tampón A al 10% y tampón B al 90 %. Tampón A: ácido fórmico al 0,1 % en agua. Tampón B: ácido fórmico al 0,1 % en

acetonitrilo al 80 %. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de ionización positiva con voltaje de nanopulverización ajustado a 2,4 kV y con una temperatura de la fuente de 275 °C. Se usó el Ultramark 1621 para la calibración externa del analizador de masas FT antes de los análisis, y se realizó una calibración interna usando la señal de iones de polisiloxano de fondo en m/z 445.1200. La adquisición se realizó en modo de adquisición dependiente de datos (DDA) y se utilizaron escaneos MS completos con 1 micro escaneo a una resolución de 120.000 en un rango de masas de m/z 350-1500 con detección en el analizador de masas Orbitrap. El control de ganancia automática (AGC) se estableció en $1E5$ y se activó el filtrado del estado de carga que descalificaba los péptidos cargados individualmente. En cada ciclo de análisis de adquisición dependiente de datos, después de cada barrido, se seleccionaron los iones más intensos por encima de un recuento de iones umbral de 10000 para la fragmentación. El número de iones precursores seleccionados para la fragmentación se determinó mediante el algoritmo de adquisición de "Velocidad máxima" y una exclusión dinámica de 60 segundos. Los espectros de iones de fragmentos se produjeron mediante disociación de colisión de alta energía (HCD) a una energía de colisión normalizada del 28 % y se adquirieron en el analizador de masas de trampa de iones. El AGC se fijó en $1E4$ y se utilizó una ventana de aislamiento de 1,6 m/z y un tiempo máximo de inyección de 200 ms. Se analizó la albúmina de suero bovino digerida (#P8108S, New England Biolabs) entre cada muestra para evitar el arrastre de la muestra y asegurar la estabilidad del instrumento, y se utilizó QCloud 25 para controlar el rendimiento longitudinal del instrumento.

3.2.3 Análisis de los datos LC-MS/MS

Los espectros adquiridos se analizaron utilizando el paquete de software Proteome Discoverer (v1.4, Thermo Fisher Scientific) y el motor de búsqueda Mascot (v2.6, Matrix Science)¹⁹². Los datos fueron búsquedas en la base de datos humana Swiss-Prot¹⁹³ más una lista de contaminantes comunes y todas las decoy entries correspondientes. Para la identificación de péptidos, se usó una tolerancia de masa de iones precursores de 7 ppm para el nivel de MS1, se eligió tripsina como enzima y se permitieron hasta tres escisiones omitidas. La tolerancia de la masa del ión del fragmento se estableció en 0,5 Da para los espectros de MS2. La fosforilación de serina, treonina y tirosina, la oxidación de metionina y la acetilación de la proteína N-terminal se utilizaron como modificaciones variables, mientras que la carbamidometilación de cisteínas se estableció como una modificación fija. El área precursora de péptidos fosforilados se extrajo con el software Skyline-daily (v20.1.1.83), se calculó la mediana del área para cada condición y sus veces de inducción. La tasa de falsos positivos descubrimiento (FDR) en la identificación de péptidos se estableció en un máximo del 5%. Por último, se utilizó el algoritmo SAINTexpress para puntuar las interacciones proteína-proteína¹⁹⁴.

3.3 Experimentos *in vivo*

3.3.1 Animales

Todos los experimentos se realizaron en estricta conformidad con la Unión Europea (UE) y las regulaciones gubernamentales. La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con las directrices de cuidado animal marcadas por las directrices de la UE 86/609/CEE, y el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (UCO, Córdoba, España) que aprobó todos los procedimientos descritos en los estudios. Se establecieron medidas para mejorar el bienestar y el estado clínico, así como distintos criterios para minimizar el sufrimiento y garantizar el bienestar animal. Brevemente, se colocaron gránulos de comida húmeda en las jaulas cuando los animales comenzaron a desarrollar signos clínicos para facilitar el acceso a la comida y la hidratación. Los animales se adquirieron en Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia), ratones macho Balb/c para el modelo de colitis mediante TNBS y ratones macho C56BL/6 para los modelos de colitis por DSS, Huntington y Traumatismo craneal. Todos los animales se alojaron en el animalario bajo las siguientes condiciones controladas: ciclo de luz/oscuridad de 12 h; temperatura 20 °C (± 2 °C) y 40-50% de humedad relativa con libre acceso a alimentos y agua.

3.3.2 Inducción y establecimiento de los modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal

3.3.2.1 Modelo de TNBS

La pre-sensibilización con TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico) al 1% se realizó rasurando la zona del lomo entre los hombros de los ratones, para evitar que se lamiesen el área (día 0). Luego, los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano y se les administró TNBS por vía rectal semanalmente con una jeringa unida a un catéter de 3,5. El TNBS fue disuelto en etanol para tener la capacidad romper la barrera intestinal y permitir su interacción con las proteínas del tejido del colon. Se siguió una administración de dosis escalonada (0,75 %: día 7, 1 %: día 14 y 1,75 %: día 21) para inducir una colitis crónica¹⁹⁵. A los animales se les administró VCE-005.1 (20 mg/kg o 50 mg/kg) por sonda oral desde el día 7 al 23. Los pesos de los ratones se registraron diariamente durante todo el experimento. Una vez sacrificados los animales el día 23, se extrajeron los cólores y se midió su longitud.

3.3.2.2 Modelo de DSS

Para este modelo se usó agua complementada con DSS al 3 % (Mw: 36.000-50.000; MP Biomedicals, Solon, OH) ad libitum durante 5 días, después se cambió a agua potable normal. Los ratones sanos (control) siempre bebieron agua normal. Desde el día 5 al 20, a los animales se les administró VCE-005.1 a 50 mg/kg o vehículo por sonda oral y DMOG a 8 mg por ratón

vía intraperitoneal, siendo ésta la concentración estándar para este compuesto^{131, 196, 197}. Después del tratamiento con DSS, los ratones C56BL/6 desarrollaron fibrosis en el colon¹⁹⁸, siendo sacrificados el día 20 del experimento.

3.3.3 Modelo murino de neurodegeneración estriatal como ejemplo de Enfermedad de Huntington

La administración sistémica de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor del complejo mitocondrial II, da como resultado un deterioro locomotor progresivo y una degeneración estriatal que se asemeja a la EH en diferentes cepas de ratones¹⁹⁹. La neurodegeneración estriatal fue inducida por siete inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 3-NP (50 mg/kg) cada 12 horas mientras que los ratones control recibieron siete inyecciones de PBS. El tratamiento con VCE-005.1 (30 mg/kg) o vehículo (1:1:18 de etanol:cremophor:solución salina) se administró diariamente por vía i.p.. Doce horas después de la última administración de 3-NP, se llevaron a cabo los análisis de comportamiento midiendo la curvatura de la columna vertebral, la distonía de las extremidades traseras y del tronco y la actividad locomotora general tal y como se describió anteriormente²⁰⁰. A cada ratón se le dio una puntuación de 0, 1 ó 2 para cada prueba, donde 0 corresponde al comportamiento normal y 2 al trastorno motor máximo. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los cerebros, un hemisferio se congeló inmediatamente y se mantuvo a -80 ° C para el análisis de RT-PCR y el otro hemisferio se fijó en formaldehído al 4% seguido de un gradiente de sacarosa para los análisis histológicos.

3.3.4 Modelo murino de Traumatismo craneal inducido (TCI) por impacto cortical controlado (ICC)

El traumatismo craneal fue inducido utilizando un dispositivo de impacto cortical controlado (ICC) (Impactador de precisión #6809, RWD Life Science Co., Ltd, China). Brevemente, los ratones se anestesiaron con ketamina (125 mg/kg) más xilazina (10 mg/kg). Después de retraer el cuero cabelludo, se perforó mediante un micro taladro un orificio de 5 mm de diámetro en el hemisferio cerebral derecho (entre las suturas bregma y lambda) para exponer la duramadre intacta. Los ratones fueron impactados a 4,5 m/s con un tiempo de permanencia de 0,2 segundos y una profundidad de 2 mm utilizando una punta de 3 mm de diámetro, correspondiéndose con un TCI moderado en humanos. Después de la lesión por ICC, la incisión del cuero cabelludo sobre la craniectomía se suturó usando un adhesivo quirúrgico disponible comercialmente. Finalmente, los ratones se colocaron en una placa térmica hasta que se recuperaron de la anestesia, además, se les administró buprenorfina por vía subcutánea como analgésico. Los ratones con lesiones simuladas (Sham) recibieron todos estos procedimientos salvo por el ICC. La eficacia del compuesto VCE-005.1 en la fase aguda de

TCI se estudió mediante los siguientes grupos: grupo Sham + vehículo; Grupo de ICC + vehículo y grupo de ICC + VCE-005.1 a 30 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p) durante 24h, 72h y 7 días. La dosis inicial se administró 1 h después del impacto.

3.3.5 Entrenamiento y evaluación neuroconductual

En el modelo de TCI, la coordinación y el aprendizaje de la motricidad fina se evaluaron utilizando el aparato Rotarod. Los días previos a la lesión, los ratones fueron entrenados en el Rotarod durante tres ensayos consecutivos a una velocidad de rotación lenta (4 rpm/min) durante 1 minuto para adaptarse al aparato, seguidos de tres ensayos adicionales con una velocidad de rotación acelerada (de 4 a 40 rpm en 5 min) para obtener su tiempo de latencia inicial. Tras sufrir el ICC, los ratones hicieron tres pruebas de Rotarod con una aceleración de 300 s y un intervalo entre pruebas de 30 minutos. La latencia promedio hasta la primera caída del rodillo fue registrada y la rotación pasiva en la que el ratón acompaña al rodillo giratorio sin caminar, también se consideró una caída.

3.3.6 Análisis histológico del colon

Después de ser medidos, los cólones se abrieron longitudinalmente y se cortaron en dos mitades; uno se congeló inmediatamente y se mantuvo a -80 °C para el análisis de RT-PCR y el otro se enrolló con la mucosa hacia afuera en los llamados Swiss-rolls para permitir el examen microscópico de toda la longitud del colon. Las muestras recogidas se transfirieron a PFA al 4 % durante al menos 24 h a 4 °C. Para realizar las tinciones de hematoxilina y eosina o picrosirius red/fast green, se tiñeron secciones de cinco micrómetros de espesor de las muestras de colon previamente incluidas en parafina. Se realizó una puntuación histológica arbitraria para cuantificar el daño del colon. Esta puntuación se calculó modificando el método descrito anteriormente¹³¹ teniendo también en cuenta el porcentaje de tejido que presentaba cada característica.

3.3.7 Análisis histológico del cerebro

Los cerebros tras ser extraídos se incubaron durante 24 horas en paraformaldehído y luego se pasaron a sacarosa al 10 % (p/v) y al 30 % (p/v) en PBS para su criopreservación. Se realizaron cortes de 30 µM en un criostato con OCT. Antes de realizar las tinciones, se dejaron las muestras durante la noche sumergidas en una mezcla 1:1 de cloroformo:etanol para su fijación. Al día siguiente, se hidrataron en un gradiente de etanol para posteriormente realizar la tinción de Nissl mediante violeta de cresilo. Se fotografiaron 4-6 campos aleatorios de cada sección del cerebro, se digitalizaron usando la cámara LeicaDFC420c y se analizaron usando el software Image J.

3.3.8 Análisis Inmunohistoquímico

Para el análisis histológico (IHC), las secciones de colon (5 μm) tuvieron que ser desparafinadas mientras que las muestras de cerebro (30 μm) se fijaron con una mezcla 1:1 de metanol:acetona durante 8 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente, todas ser hervidas durante 10 min en tampón de citrato de sodio (10 mM, pH 6,0). La actividad peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno al 3,3 % en metanol. Seguidamente, se lavaron 3 veces en buffer PBS-Tween para posteriormente ser bloqueadas con blocking buffer, e incubadas durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con los anticuerpos primarios disueltos en el tampón de bloqueo. En el caso de los anticuerpos primarios provenientes de ratón, antes del bloqueo estándar, se utilizó el tampón de bloqueo Rodent Block M (#RBM961, Biocare Medical, Concord, CA) para bloquear la IgG endógena de ratón y el fondo no específico. Al día siguiente, se lavaron las muestras con buffer PBS-Tween y luego se incubaron con el kit Vectastain Elite ABC HRP (#416411, Vector Laboratories) seguido de los correspondientes anticuerpos secundarios. Finalmente, todas las muestras se visualizaron con el cromógeno de diaminobencidina (DAB) (#K346811, Dako, Santa Clara, CA), se fotografiaron y digitalizaron con una cámara Leica DFC420c y se analizaron con el software Image J.

3.3.9 Estudios de microscopía confocal

Para el desenmascaramiento antigénico, las secciones de colon y de cerebro se hirvieron durante 10 min en tampón de citrato sódico (10 mM, pH 6,0). A continuación, se lavaron tres veces en PBS-tritón X100-saponina (0,1 %) y los sitios de unión a anticuerpos inespecíficos se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino (BSA) al 3 %. Luego, las secciones se incubaron durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en PBS con BSA al 3 %. Después de un lavado extenso en PBS, los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.

Las inmunorreacciones se revelaron con los correspondientes anticuerpos secundarios y se montaron con el medio de montaje Vectashield Antifade Mounting Medium con DAPI (#H-1200, Vector Laboratories). Todas las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de barrido láser confocal espectral LSM710, (Zeiss, Jena, Alemania) con una lente Plan-Apochromat de $20\times/0,8$ y se cuantificaron 10-15 campos elegidos aleatoriamente utilizando el software ImageJ.

3.3.10 Ensayo Tunel

El ensayo de túnel (#11684795910, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche) fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los cortes de cerebro se procesaron como se describe en la sección de microscopía confocal salvo que en

vez de anticuerpo secundario, los cortes se incubaron una hora a temperatura ambiente con el reactivo de Tunel para luego añadirles el medio de montaje con DAPI y ser visualizadas con un microscopio de barrido láser confocal espectral LSM710, (Zeiss, Jena, Alemania) con una lente Plan-Apochromat de 40×/0,8. Se cuantificaron de 2-4 zonas del área pericontusional.

3.3.11 Extracción de ARN mensajero de los estudios *in vivo*

Los tejidos animales fueron extraídos y conservados en RNAlater a -80 °C. Para extraer el ARN del cerebro, se delimitó la zona del estriado en el caso del modelo de Huntington y la zona pericontusional en el modelo de Traumatismo craneal, para el colon se cogió una de las mitades longitudinales previamente descritas. El ARN total tanto del colon como de los cerebros de los ratones se extrajo usando el reactivo de lisis QIAzol y el mini kit RNeasy Lipid (#74804, Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso del colon, seguidamente fue necesario realizar una purificación del ARN con cloruro de litio²⁰¹. El ARN fue cuantificado por espectrofotometría utilizando NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y la integridad de este fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.3.12 Array de PCR

Para el Array de PCR, se utilizó el kit RT² Profiler PCR Array Mouse Fibrosis (#PAMM024ZD6, Qiagen). Se transcribió un microgramo de ARN a ADNc usando el kit de síntesis RT2 First-Strand Synthesis (#330401, Qiagen) y se analizó usando RT2 SYBR Green qPCR (#330504, Qiagen). Los cambios en la expresión génica se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ junto con cinco genes constitutivos para su normalización siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada array se realizó con un pool de 4 ratones por grupo.

3.4 Estudios de farmacocinética y ADME/Tox

3.4.1 Farmacocinética plasmática

Este estudio fue realizado por Pharmacology Discovery Services Taiwan, Ltd., una empresa del grupo Eurofins. El experimento fue aceptado de acuerdo con el procedimiento operativo estándar de validación de Eurofins. Brevemente, BioLasco Taiwan (bajo licencia de Charles River Laboratories) proporcionó ratones ICR machos que pesaban 25 ± 5 g. El estudio de FC se realizó después de una sola administración intravenosa (IV) y oral (PO) de VCE-005.1 a 2 y 20 mg/kg, respectivamente. El compuesto VCE-005.1 se formuló respectivamente en DMSO al 5 %/Solutol® HS15 al 10 %/solución salina al 85 % a 0,4 mg/ml para la administración IV y Etanol:Cremophor® EL:solución salina (1:1:18) a 2 mg/ml para la administración oral. Se recogieron muestras de plasma a los 3, 10, 60, 120, 240 y 480 minutos después de la administración IV, y a los 10, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos después del tratamiento oral. Las muestras de plasma se procesaron mediante precipitación con acetonitrilo y se analizaron por LC-MS/MS. Se generó una curva de calibración de plasma y se añadieron

alícuotas de plasma sin VCE-005.1 con el compuesto de ensayo a los niveles de concentración especificados. Las muestras de plasma enriquecidas se procesaron junto con las muestras de plasma desconocidas utilizando el mismo procedimiento. Las muestras de plasma procesadas se almacenaron a -70 °C hasta el análisis LC-MS/MS, momento en el que se registraron las áreas de los picos y se determinaron las concentraciones del compuesto de prueba en las muestras de plasma desconocidas usando la curva de calibración. Se determinó el rango lineal detectable del ensayo, junto con el límite inferior de cuantificación. Se construyeron gráficos de concentración plasmática del compuesto frente al tiempo y los parámetros farmacocinéticos fundamentales de cada compuesto después de la administración IV ($t_{1/2}$, C_0 , AUC_{last} , AUC_{inf} , AUC_{extr} , MRT , V_{ss} y CL) y la dosis oral (T_{max} , C_{max} , AUC_{last} , AUC_{inf} , AUC/D , AUC_{extr} y MRT) fueron obtenidos del análisis no compartimental de los datos de plasma utilizando WinNonlin. También se calculó la biodisponibilidad (B).

3.4.2 Farmacocinética de tejido cerebral

Este estudio también fue realizado por Pharmacology Discovery Services Taiwan, Ltd. Brevemente, ratas SD macho (180-250 g. BioLasco Taiwan bajo la licencia de Charles River Laboratories) recibieron una única administración intravenosa (IV) de VCE-005.1 a 3 mg/kg formulado en Etanol: Cremophor® EL: Solución salina (1:1:18). Se recogieron muestras de plasma y cerebros completos de 3 animales por cada punto de tiempo a las 0,5, 1 y 3 horas después de la administración intravenosa, y se utilizaron 3 animales para plasma y cerebro sin VCE-005.1. Las muestras de plasma y cerebro se procesaron mediante precipitación con acetonitrilo y se analizaron por LC-MS/MS. El análisis cuantitativo de muestras de plasma y cerebro se realizó como se ha descrito en el apartado anterior. Después del análisis, se generó el gráfico de concentraciones plasmáticas y cerebrales de VCE-005.1 frente al tiempo y se calculó la relación cerebro/plasma por cada punto de tiempo.

3.4.3 Aclaramiento intrínseco (estabilidad metabólica)

Esta medición fue realizada por Eurofins Panlabs Inc., una empresa del grupo Eurofins. Brevemente, el compuesto VCE-005.1 a 1 μ M de concentración final se incubó en la fracción S9 de hígado de rata y humano (concentración final de proteína 0,3 mg/ml) durante 0, 15, 30, 45 y 60 min a 37 °C y se analizó por HPLC-MS/MS. La estabilidad metabólica, expresada como porcentaje del VCE-005.1 restante, se calculó comparando el área del momento en que el compuesto llegó a su pico en relación a la del tiempo 0. La vida media ($T_{1/2}$) se estimó a partir de la pendiente del rango lineal inicial de la curva logarítmica del compuesto restante (%) frente al tiempo, asumiendo una cinética de primer orden. El aclaramiento intrínseco aparente (CL_{int} , en μ L/min/mg) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $CL_{int} = 0,693/(T_{1/2} * (\text{mg de proteína}/\mu\text{L}))$. Se utilizaron imipramina, propranolol, terfenadina y

verapamilo a 0,1 μM como compuestos de referencia y los datos se compararon con valores históricos determinados en Eurofins.

3.4.4 Identificación de metabolitos

Este ensayo fue realizado por Eurofins Panlabs Inc. Se incubó el compuesto VCE-005.1 a 10 μM de concentración final en microsomas de hígado humano o de rata (concentración final de proteína 1 mg/ml) durante 0 y 90 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de acetonitrilo. Las incubaciones de microsomas de control (sin fármaco) se incluyeron como blancos. Se realizó un análisis de HPLC-MS de barrido completo y se compararon los cromatogramas de corriente iónica total de las incubaciones a tiempo 0 y 90 minutos. Se identificaron y registraron los tiempos de retención y los respectivos espectros MS y MS/MS de las especies detectadas en las muestras incubadas (90 minutos) y no en el tiempo cero o en las muestras en blanco.

3.4.5 Ensayo Qpatch basado en células del canal de iones de potasio humano hERG

Este ensayo fue realizado por Eurofins Panlabs Inc. En resumen, se incubaron células de ovario de hámster chino (CHO-K1) que expresaban de manera estable el gen hERG con VCE-005.1 a 0,1, 1 y 10 μM y se analizaron durante 5 minutos de incubación a temperatura ambiente mediante la técnica de parche de membrana para medir la inhibición de hERG. El grado de inhibición (%) se obtuvo midiendo la amplitud de la corriente, que es inducida por un segundo pulso de prueba a -40 mV después de un pulso de dos segundos a +20 mV, antes y después de la incubación con VCE-005.1 (la diferencia de corriente se normalizó para controlar E4031 y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de inhibición). Las curvas de respuesta de concentración (log) se ajustaron a una ecuación logística (tres parámetros suponiendo un bloqueo completo de la corriente a concentraciones del compuesto de ensayo muy altas) para generar estimaciones de la concentración inhibidora del 50% (IC₅₀). La relación concentración-respuesta del VCE-005.1 se determinó a partir de las reducciones porcentuales de la amplitud de la corriente por concentraciones secuenciales.

3.4.6 Test Ames y toxicidad genética

Este ensayo fue realizado por Eurofins Panlabs Inc. Brevemente, para evaluar la mutagenicidad en una prueba de mutación genética inversa bacteriana, se probaron cuatro concentraciones diferentes de VCE-005.1 (5, 10, 50 y 100 μM) en las cepas TA98, TA10, TA1535 y TA1537 de *Salmonella typhimurium* en presencia y ausencia de activación metabólica S9 en hígado de rata a 37 °C durante 96 horas. Los pocillos que mostraban crecimiento de bacterias debido a la reversión de la mutación de histidina (a juzgar por la relación de DO430/DO570 superior a 1,0) se contaron y registraron como recuentos positivos.

La importancia de los recuentos positivos entre el tratamiento (en presencia del compuesto de prueba) y el control (en ausencia de compuesto de prueba) se calculó usando la prueba de Fisher. Se utilizaron como compuestos de referencia quercetina, 2-aminoantraceno, estreptozotocina y 9-aminoacridina y los datos se compararon con valores históricos determinados en Eurofins. Paralelamente, se evaluó una medición de la citotoxicidad intrínseca del VCE-005.1 en cada cepa para descartar falsos negativos.

3.4.7 Inhibición del Citocromo P450 y perfil off-target

Este estudio fue realizado por Eurofins Panlabs Discovery Services Taiwan, Ltd. Los ensayos se realizaron usando una concentración de VCE-005.1 de 10 μ M. Los resultados del ensayo bioquímico se presentan como el porcentaje de inhibición de la unión o actividad específica, siendo respuestas significativas aquellas $\geq 50\%$ de inhibición o estimulación para los ensayos bioquímicos.

3.4.8 Ensayo de citotoxicidad

Las células DU145 y A549 modificadas con el sistema de lentivirus NucLight (#4476, Essen BioScience) que les confiere fluorescencia roja, fueron sembradas a una densidad de 5.000 células en placas de 96 pocillos y tras 24 horas, fueron estimuladas con el compuesto VCE-005.1 a las concentraciones señaladas e introducidas en el sistema de imagen IncuCyte ZOOM (Essen BioScience) donde se tomaron medidas a las 0, 24 y 48h tras el tratamiento. Los datos se analizaron con el software perteneciente al equipo midiendo la intensidad total integrada. Los resultados se muestran como porcentaje de viabilidad respecto al 100% obtenido en las células control.

3.4.9 Ensayo Cometa

Se sembraron 100.000 células Jurkat en placas de 24 pocillos y se trataron con VCE-005.1 (10 μ M), ácido betulínico (10 μ M) o etopósido (25 μ M) durante 4 h. El daño en el ADN se detectó utilizando el kit OxiSelect™ Comet Assay (Cell Biolabs Inc, San Diego, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se recolectaron y se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión. Luego, las células incluidas se lisaron y se trataron con una solución alcalina para desnaturalizar el ADN. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis en condiciones alcalinas a 1 V/cm y 300 mA durante 30 min. Las muestras se tiñeron con colorante de fluorescencia Vista Green durante 15 min en la oscuridad y se analizaron con un microscopio fluorescente Leica DM2500. Las imágenes mostradas fueron tomadas con una amplificación de 10x.

3.4.10 Screening de quinasas

El ensayo fue llevado a cabo por el International Center for Kinase Profiling de la Universidad de Dundee. El método utilizado es un ensayo de unión de filtro radiactivo usando ^{33}P -ATP²⁰² que consiste en la adición de los complejos enzima-sustrato a una placa previamente tratada con los controles y el compuesto, para posteriormente añadir el ^{33}P -ATP durante un tiempo determinado según la enzima y finalmente parar la reacción con ácido ortofosfórico. Este método es sensible y proporciona una medida directa de la actividad de un panel de 140 quinasas.

3.5 Análisis estadístico

Todos los datos *in vitro* están expresados como la media \pm SD mientras que los *in vivo* se representan como la media \pm SEM. Los datos primero se sometieron a pruebas de normalidad para determinar si los datos se distribuían de manera paramétrica o no. A continuación, según el resultado se realizó el análisis One-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey's o la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunnett's. Se consideró un valor significativo cuando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 9.1.1 (GraphPad, CA, EE. UU).

4. RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Estudios de metabolismo, toxicología y farmacocinética del compuesto VCE-005.1

4.1.1 Metabolismo *in vitro*

Con el objetivo de predecir las posibles interacciones farmacológicas que pueda producir el VCE-005.1 con otros fármacos se evaluó su capacidad de inhibir al Citocromo (CYP) P450. Para tal fin, se determinó la inhibición producida por el compuesto sobre las formas recombinantes de las isoenzimas humanas P450 más predominantes, resultando en una mínima capacidad de inhibición de todas las isoformas a excepción de la isoforma 3A4 que resultó en una moderada inhibición con VCE-005.1.

VCE-005.1	
Isoenzima	% de inhibición
CYP450, 1A2	4
CYP450, 2C19	4
CYP450, 2C9	0
CYP450, 2D6	0
CYP450, 3A4	49

Tabla 4. Capacidad inhibitoria del Citocromo P450 del VCE-005.1.

En paralelo, se llevó a cabo un estudio de estabilidad metabólica para determinar la susceptibilidad del VCE-005.1 de ser biotransformado a nivel hepático, mediante la realización de un ensayo *in vitro* utilizando la fracción S9 de hígado humano y de rata. Este ensayo estableció un valor intrínseco de excreción hepática estimada (Intrinsic clearance, CL_{int}) y un tiempo de vida media similares en ambas especies testadas.

Tiempo de incubación (minutos)	% Compuesto	Vida media (minutos)	Clint (μL/min/mg)	Tiempo de incubación (minutos)	% Compuesto	Vida media (minutos)	Clint (μL/min/mg)
Fracción S9 de hígado humano				Fracción S9 de hígado de rata			
0	100	22	105.9	0	100	24	103.4
15	51			15	25		
30	38			30	26		
45	22			45	19		
60	15			60	14		

Tabla 5. Estudio de estabilidad metabólica en microsomas de hígado.

El estudio metabólico se completó mediante un análisis de identificación de metabolitos para conocer las posibles diferencias entre especies del perfil de metabolitos generado por el VCE-005.1 tras su incubación en microsomas humanos y de rata, como dato predictivo del metabolismo *in vivo*. Este análisis identificó un perfil de metabolitos idéntico entre las

especies, lo que permitirá extrapolar a humanos los futuros resultados que se obtengan con la experimentación animal.

Posible modificación	Precursor iónico observado (m/z)	Tiempo de retención observado (minuto)	Área de pico en muestras de microsomas, 90 minutos		Iones de productos principales (m/z)
			Humano	Rata	
Compuesto original	472,380	4.21	4,154 (tiempo 0) 1,811 (tiempo 90)	4,972 (tiempo 0) 2,758 (tiempo 90)	421.24, 270.32
Hidroxilación	488,375	3,48	63	107	476.41, 364.28
Hidroxilación+ formación de cetona	502,356	3,67	112	85	475.40, 460.37
Hidroxilación y desaturación	486,363	3,77	102	86	428,15

Tabla 6. Metabolitos generados tras la incubación de VCE-005.1 con microsomas.

4.1.2 Toxicidad *in vitro*

A continuación, se realizaron distintos ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad con el compuesto VCE-005.1.

Mutagénesis: La capacidad mutagénica se evaluó mediante la realización de la prueba de fluctuación de Ames sobre las cepas TA98, TA100, TA1535 y TA1537 de *Salmonella typhimorium* en presencia y ausencia de la fracción S9 de hígado de rata, que permite detectar mutaciones de cambio de marco de lectura y de sustitución de pares bases. Para ello, se testaron 4 concentraciones diferentes (100, 50, 10 y 5 μM), obteniéndose un resultado negativo en todas ellas, lo que determinó el perfil no mutagénico del VCE-005.1. Además, la activación metabólica, mediante la utilización de la fracción S9 de hígado de rata, permitió determinar la ausencia de metabolitos mutagénicos generados. En paralelo, para evitar falsos negativos debidos a efectos bacteriocidas o bacteriostáticos del compuesto, se realizó un ensayo de citotoxicidad bacteriana que resultó también negativo.

Cepa	Compuesto	Concentración más alta testada (M)	Resultado Ames	Comentarios
Ames test (TA98 - S9)	VCE-005.1	10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA98 + S9)		10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA100 - S9)		10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA100 + S9)		10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA1535 - S9)		10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA1535 + S9)		10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA1537 - S9)		10^{-4} μM	Negativo	-
Ames test (TA1537 + S9)		10^{-4} μM	Negativo	-

Ames test (TA98 - S9)	Quercetin	$3 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA98 + S9)	2-Aminoanthracene	$10^{-5} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA98 + S9)	Quercetin	$3 \cdot 10^{-5} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA100 - S9)	Streptozotocin	$2.5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA100 + S9)	2-Aminoanthracene	$2.5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA100 + S9)	Streptozotocin	$2.5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA1535 - S9)	Streptozotocin	$2.5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA1535 + S9)	2-Aminoanthracene	$2.5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA1535 + S9)	Streptozotocin	$2.5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA1537 - S9)	9-Aminoacridine	$10^{-5} \mu\text{M}$	Positivo	Control
Ames test (TA1537 + S9)	2-Aminoanthracene	$10^{-5} \mu\text{M}$	Positivo	Control

Tabla 7. Evaluación de la mutagenicidad. Se realizó una prueba de mutación genética inversa en las cepas bacterianas de *S. typhimurium* TA98, TA10, TA1535 y TA1537 en presencia y ausencia de activación metabólica S9.

Cardiotoxicidad: La toxicidad cardíaca del VCE-005.1 se evaluó mediante la realización del ensayo de seguridad sobre el canal de potasio hERG. Este ensayo permite conocer el potencial de un compuesto para inhibir el canal hERG y por tanto retrasar la repolarización ventricular. Para ello, se testaron 3 concentraciones diferentes (10, 1 y 0.1 μM), obteniéndose un resultado negativo en todas ellas, lo que determinó el perfil no cardiotoxico del compuesto (Figura 10).

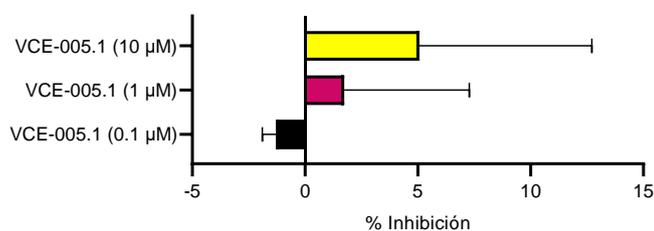


Figura 10. Inhibición del canal hERG.

Genotoxicidad (ensayo cometa): Se evaluó la capacidad del compuesto VCE-005.1 de producir daño en el ADN mediante la realización del ensayo cometa, técnica empleada para evaluar la genotoxicidad inducida por sustancias químicas. Para ello, se midió la capacidad genotóxica de la concentración activa, 10 μM , de VCE-005.1 sobre la línea celular Jurkat (células T leucémicas humanas) testándose, en paralelo, células sin tratamiento como control negativo, y células tratadas con 25 μM de etopósido como control positivo de daño al ADN. Este ensayo resultó en una ausencia de daño al ADN tras el tratamiento con VCE-005.1 lo que determinó el perfil no genotóxico del compuesto (Figura 11).

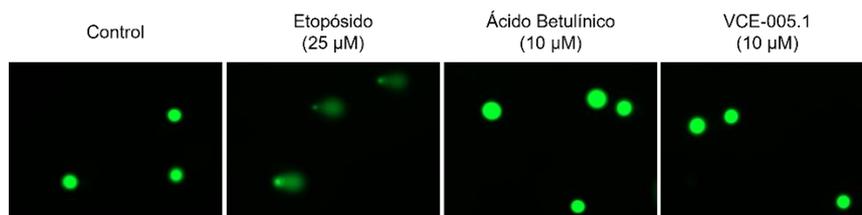


Figura 11. Imágenes representativas del ensayo cometa.

Citotoxicidad: La citotoxicidad del VCE-005.1 se evaluó a tres concentraciones (25, 10 y 1 μM) mediante la realización de un ensayo de proliferación celular basado en fluorescencia usando células A549 (células de cáncer de pulmón humano) y DU145 (células de cáncer de próstata humano) modificadas con el sistema NucLight (Essen Bioscience). Este ensayo mostró un resultado negativo en todas las concentraciones evaluadas, lo que determinó el perfil no citotóxico del compuesto.

VCE-005.1	DU145		A549	
	Viabilidad (%)	SD (%)	Viabilidad (%)	SD (%)
1 μM	102,4	2,0	71,2	6,9
10 μM	85,9	2,8	57,1	18,4
25 μM	65,9	8,8	90,0	6,8

Tabla 8. Viabilidad celular tras tratamiento con VCE005.1. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes (n=3). SD, desviación estándar.

4.1.3 Efectos off-target

También se realizó un estudio más detallado sobre dianas de relevancia en desarrollo preclínico. Se determinó la inhibición producida por el VCE-005.1 sobre las formas recombinantes de las 68 dianas que se indican a continuación, demostrándose que presenta un perfil de seguridad idóneo para realizar su desarrollo preclínico.

Diana	Inhibición (%)
GPCR 5-HT1A Serotonina Humano	-7
GPCR 5-HT2B Serotonina Humano	13
GPCR 5-HT3 Serotonina Humano	-6
GPCR A1 Adenosina Humano	-27
GPCR A2A Adenosina Humano	53
GPCR A3 Adenosina Humano	11
GPCR alpha1A Adrenoceptor Rata	3
GPCR alpha1B Adrenoceptor Rata	-6
GPCR alpha1D Adrenoceptor Rata	20
GPCR alpha2A Adrenoceptor Humano	2
NHR AR Andrógeno Humano (receptor nuclear hormonal)	7
GPCR B1 Bradykinin Humano	5

Diana	Inhibición (%)
Glutamato (No Selectivo) Canal iónico Rata	4
Glutamato, Kainate Canal iónico Rata	-13
Glutamato, NMDA, Glicina Canal iónico Rata	6
NHR GR Glucocorticoide Humano	0
GPCR H1 Histamina Humano	27
GPCR H2 Histamina Humano	11
GPCR H3 Histamina Humano	-13
hERG Canal iónico de potasio Humano	6
Imidazolina I2, Receptor Central Rata	-4
Interleuquina IL-1 R1 Receptor de superficie celular Humano	-15
GPCR kappa (KOP) Opiode Humano	23
KATP Hamster Canal iónico de potasio	-1

GPCR B2 Bradykinin Humano	13	GPCR M1 Acetylcholina (Muscarinic) Humano	1
GPCR beta1 Adrenoceptor Humano	-13	GPCR M2 Acetylcholina (Muscarinic) Humano	-7
GPCR beta2 Adrenoceptor Humano	3	GPCR M3 Acetylcholina (Muscarinic) Humano	9
Cav1.2 (tipo L) Canal iónico de calcio Rata	23	GPCR MT1 Melatonina Humano	21
Cav1.2 (tipo L) Canal iónico de calcio Rata	4	GPCR mu (MOP) Opiode Humano	27
Cav2.2 (tipo N) Canal iónico de calcio Rata	-1	nAChR (alpha1) Canal iónico Humano	19
GPCR CB1 Cannabinoide Humano	26	nAChR Acetilcolina (Nicotínico) Canal iónico Humano	-7
GPCR CysLT1 Leucotrieno Humano	13	NET Transportador Norepinefrina Humano	34
GPCR D1 Dopamina Humano	27	GPCR NK1 Tachykinin Humano	33
GPCR D2S Dopamina Humano	-1	No Selectivo GABAA Canal iónico Rata	7
GPCR D3 Dopamina Humano	39	No Selectivo GABAA Canal iónico Rata	-7
GPCR D4.2 Dopamina Humano	1	No Selectivo P2X Canal iónico Rata	-1,7
DAT Transportador Dopamina Humano	48	GPCR No Selectivo P2Y Rata	11
GPCR delta (DOP) Opiode Humano	15	No Selectivo enzima PDE (fosfodiesterasa) Rata	12
EGFR RTK Quinasa Humano	1	No Selectivo Canal iónico de sodio Rata	30
GPCR EP4 Prostanoid Humano	-2	GPCR PAF Factor activador de Plaquetas Humano	15
NHR ER alpha Estrógeno Humano	28	Receptor Phorbol Ester	-11
GPCR ETA Endotelina Humano	16	SET Transportador Serotonina Humano	-22
GPCR ETB Endotelina Humano	-2	Receptor Sigma1 Humano	-30
GABA (No Selectivo) Transportador Rata	6	NHR TR (No Selectivo) Hormona Tiroidea Rata	27
GPCR GABAB (B1a/B2) Humano	10	GPCR Y1 Neuropeptido Y Humano	1
Glutamato (NMDA, No Selectivo) Canal iónico Rata	23	GPCR Y2 Neuropeptido Y Humano	13

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de distintas dianas tras el tratamiento con VCE-005.1.

4.1.4 Screening de quinasas

Además, también se realizó un estudio detallado del efecto del VCE-005.1 sobre un panel de quinasas de relevancia. Para ello, se determinó la inhibición producida por el VCE-005.1 sobre las formas recombinantes de 140 quinasas comparadas con el efecto producido por su precursor el ácido betulínico. Este estudio ha puesto de manifiesto que *in vitro*, el VCE-005.1 inhibe de forma significativa a las quinasas SGK1, CAMK1, NEK6 y VEG-FR y activa a Src, quinasas todas relacionadas con la actividad de HIF-1 α , mientras que el AB no tiene ningún efecto sobre ellas. Sin embargo, la concentración usada en este ensayo es de 10 μ M y en ningún caso se observa una inhibición total, lo cual sería lo deseable para continuar con posteriores estudios.

Quinasa	VCE-005.1 (10 μ M)		Ácido Betulínico (10 μ M)	
	Actividad (%)	SD	Actividad (%)	SD
NEK6	16,27	4,89	92,89	17,95
SGK1	32,73	8,67	69,94	2,11

Quinasa	VCE-005.1 (10 μ M)		Ácido Betulínico (10 μ M)	
	Actividad (%)	SD	Actividad (%)	SD
ABL	90,12	4,18	101,18	2,02
CDK9-Cyclin T1	90,61	2,26	77,36	5,09

CAMK1	33,44	6,05	131,68	26,38
VEG-FR	36,94	1,28	72,98	3,25
TrkA	47,63	2,49	79,41	4,96
TIE2	47,68	7,18	70,48	15,83
PIM2	52,16	1,34	103,65	0,94
DYRK3	57,46	0,58	85,91	4,58
CAMKKb	58,95	2,50	111,91	1,14
PKBb	58,96	7,73	92,28	7,17
BTK	59,48	3,48	79,94	12,89
p38g MAPK	60,04	7,48	104,71	12,18
MSK1	60,18	10,40	64,89	3,73
EPH-B3	62,53	8,94	82,95	2,59
RSK1	65,98	2,56	95,56	12,99
SRPK1	66,33	14,37	95,96	8,59
IKKb	66,85	9,52	103,02	6,70
PIM1	69,20	4,50	80,57	1,95
Aurora B	69,48	8,16	80,59	10,37
ZAP70	70,79	11,15	105,18	12,11
PIM3	71,21	6,06	97,01	12,36
ULK2	72,88	7,27	81,00	1,45
HIPK2	73,63	12,01	93,64	0,95
HIPK3	73,76	1,71	95,97	15,74
JAK3	74,02	0,94	77,66	5,07
MAPKAP-K3	74,43	15,64	99,75	6,44
GCK	75,60	8,03	78,23	0,29
MLK3	76,00	7,75	105,48	6,34
MLK1	76,45	9,22	89,08	14,88
CLK2	77,30	14,31	94,82	11,04
ERK1	77,93	2,91	106,56	5,34
MAPKAP-K2	77,98	2,01	77,32	2,73
MEKK1	78,29	9,69	117,62	15,59
NUAK1	78,76	4,81	79,94	17,13
TESK1	79,31	3,81	81,81	7,79
GSK3b	79,92	0,27	102,77	4,30
CSK	80,49	13,17	122,93	31,14
MARK2	80,70	10,18	108,59	17,68
FGF-R1	80,91	0,94	90,52	8,18
MARK3	81,29	0,31	77,90	3,37
IKKe	81,49	13,15	87,13	12,02
TTBK1	81,51	2,47	80,19	6,42
p38b MAPK	81,65	9,65	128,98	15,13
p38a MAPK	81,66	1,07	123,24	6,60
TLK1	82,02	4,75	137,27	5,40
TSSK1	82,13	3,66	90,24	17,45
PRAK	82,31	8,61	110,58	2,71

PKBa	90,70	2,96	97,60	0,24
MNK2	91,52	3,42	99,80	5,20
ERK2	91,60	2,05	106,74	16,81
HIPK1	91,61	3,99	101,89	8,54
MST2	91,74	11,49	112,54	2,20
SIK3	91,80	1,17	80,88	0,68
TBK1	92,37	17,70	113,21	6,84
Aurora A	92,84	17,48	98,19	9,65
CK1δ	93,11	9,85	90,16	2,47
IR	93,16	9,47	132,85	15,67
CK2	93,17	2,82	89,66	10,35
MAP4K3	93,65	7,64	97,30	17,67
MARK4	93,80	1,00	100,71	16,44
MINK1	95,08	8,13	111,27	2,72
ERK5	95,10	7,45	98,57	14,81
IRR	95,43	19,75	91,50	3,85
IGF-1R	95,46	20,18	110,62	10,04
PKCz	96,36	5,79	122,86	1,39
PKD1	96,67	5,49	84,96	13,04
PKCa	96,69	4,80	113,54	4,01
PRK2	96,99	5,22	118,33	2,44
PAK4	97,38	9,46	101,50	21,35
PLK1	97,56	13,16	87,33	8,13
DAPK1	97,64	0,29	110,71	10,67
RIPK2	99,19	1,93	112,43	6,54
CHK1	99,78	8,29	99,19	9,48
EPH-B2	99,84	22,29	85,43	3,10
BRK	99,94	9,29	102,57	5,93
PDK1	100,06	11,75	101,38	10,99
IRAK1	100,13	8,39	106,40	5,52
BRSK2	100,17	0,56	94,81	12,25
MARK1	100,27	6,50	87,08	1,18
CHK2	100,57	3,84	121,79	8,08
EPH-A4	100,78	19,04	107,44	6,35
EPH-B4	102,29	7,96	112,76	14,96
TTBK2	103,76	14,00	113,95	12,03
MKK2	104,08	19,04	95,41	3,74
IRAK4	104,32	10,32	122,83	0,66
PAK6	105,74	5,99	106,10	11,61
MELK	106,12	7,33	96,42	3,42
MST3	106,50	7,11	122,66	0,37
EIF2AK3	107,42	12,49	104,61	19,66
OSR1	107,50	18,45	134,14	2,27
EPH-B1	107,57	8,70	77,24	4,74
CK1γ2	107,80	0,47	117,40	14,50

TGFBR1	83,27	12,96	94,70	11,95	STK33	108,44	4,41	99,67	15,70
DYRK1A	83,47	1,05	94,28	13,13	p38d MAPK	108,87	8,93	107,58	19,05
PHK	83,69	11,71	77,64	4,64	PAK2	110,17	5,99	124,67	16,78
JNK3	83,78	4,53	76,04	12,79	EF2K	110,77	12,64	107,32	9,99
ERK8	84,16	1,51	104,79	15,78	PKC γ	112,67	11,08	87,73	1,54
TAO1	84,89	3,30	102,67	16,21	ASK1	112,96	13,22	123,45	9,02
RSK2	85,13	5,93	107,60	12,69	MPSK1	113,61	10,56	111,99	1,70
TAK1	85,28	9,73	103,71	10,81	MNK1	113,64	17,68	104,16	15,21
HER4	85,99	5,87	117,48	32,22	SmMLCK	114,49	0,07	121,69	16,90
EPH-A2	86,27	6,17	129,20	29,54	CDK2-Cyclin A	115,36	1,87	105,39	1,36
ULK1	86,47	4,92	97,81	3,97	NEK2a	115,38	6,41	111,87	2,00
DDR2	86,70	0,47	111,74	1,80	DYRK2	116,51	0,73	105,50	5,78
TTK	86,73	4,28	64,97	10,78	PINK	117,07	19,49	124,76	16,87
PKA	87,83	6,44	101,79	1,41	S6K1	119,91	4,42	121,35	2,91
Lck	88,66	1,28	98,08	4,20	SYK	120,52	6,07	105,53	5,14
SIK2	89,05	2,27	86,94	4,03	JNK1	123,66	13,49	116,67	14,15
MKK1	89,06	11,02	80,38	4,12	MST4	125,44	7,86	120,10	0,94
LKB1	89,10	12,82	114,79	6,05	MKK6	127,93	13,31	135,06	4,86
MAP4K5	89,27	5,94	105,96	0,91	JNK2	128,52	24,88	113,73	1,28
AMPK (hum)	89,33	5,43	88,21	9,95	PAK5	149,00	3,47	103,79	24,21
BRSK1	89,38	0,52	115,31	5,07	WNK1	149,79	6,68	84,56	4,70
PDGFRA	89,96	12,83	96,06	20,29	YES1	154,70	9,42	121,43	7,66
ROCK 2	90,00	10,07	112,30	11,85	Src	221,84	6,51	145,13	7,89

Tabla 10. Porcentaje de actividad de las distintas quinasas tras el tratamiento con VCE-005.1 y AB.

4.1.5 Estudios de farmacocinética y biodisponibilidad

Por último, se llevaron a cabo dos estudios la biodisponibilidad por vía oral del compuesto VCE-005.1.

En una primera fase, se evaluó la biodisponibilidad oral del compuesto. Para ello se realizó un análisis farmacocinético en ratones macho ICR tras la administración oral de una única dosis de 20 mg/kg de VCE-005.1 formulado en 1:1:18: etanol Cremophor EL: Salino. En paralelo, ha evaluó la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg formulado en 5 % DMSO/10 % Solutol® HS15/85 % de solución salina. Para cada grupo se recogieron muestras de sangre a 6 tiempos (a los 3, 10, 60, 120, 240 y 480 minutos después de la administración intravenosa, y a los 10, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos después del tratamiento por vía oral) y la concentración del VCE-005.1 presente en plasma en cada tiempo de análisis se cuantificó mediante LC-MS/MS. Este análisis mostró que el compuesto VCE-005.1 formulado en dicho vehículo se absorbe rápidamente por vía oral alcanzando una concentración plasmática máxima a las 0.5 h, siendo su biodisponibilidad total del 7.6 %.

Ruta de administración	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{Tmf} (h·ng/mL)	Biodisponibilidad (%)
Intravenosa	0.05	5659	2240	N/A
Oral	0.5	618	1894	7.6

Tabla 11. Parámetros estudiados en el ensayo de farmacocinética.

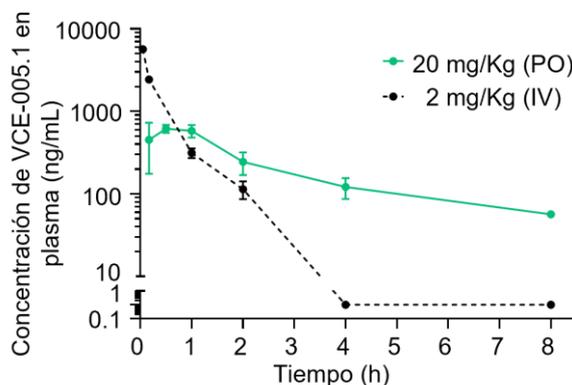


Figura 12. Farmacocinética. Perfil de concentración plasmática media en el tiempo de VCE-005.1 después de su administración oral (20 mg/kg) e intravenosa (2 mg/kg) en ratones. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 3 animales por grupo).

También se llevó a cabo un estudio de la farmacocinética del VCE-005.1 para conocer su penetrabilidad en cerebro y estudiar su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Este es un punto importante ya que esta barrera protectora obstaculiza la eficacia terapéutica de los fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, siendo más del 95% de los agentes terapéuticos moléculas pequeñas incapaces de traspasarla.

Para ello, se realizó un análisis farmacocinético en ratas macho Sprague-Dawley en dos fases. Una primera fase donde se estudió la administración intravenosa de una dosis única de 2 mg/kg de VCE-005.1 formulado en 5 % DMSO/10 % Solutol® HS15/85 % de solución salina y 5 % Cremophor EL: 20 % Capmul PG8/75 % de solución salina, y una segunda fase donde se estudió la administración intravenosa de una dosis única de 3 mg/kg de VCE-005.1 formulado en etanol 1:1:18: Cremophor EL: Salino, 5 % DMSO/10 % Solutol® HS15/85 % de solución salina y 5 % Cremophor EL: 20 % Capmul PG8/75 % de solución salina. Para los grupos de la primera fase se recogieron muestras de sangre a los 30, 60 y 120 después de la administración intravenosa, y a los grupos de la segunda fase se recogieron muestras de sangre a los 30, 60, y 180 minutos después de la administración intravenosa. La concentración del VCE-005.1 presente en plasma y en cerebro en cada tiempo de análisis se cuantificó mediante LC-MS/MS. Este análisis mostró que el compuesto VCE-005.1 formulado en cualquiera de los vehículos estudiados alcanza ratios plasma/cerebro que indican que el candidato penetra rápidamente en cerebro.

	Time (h)		Concentración en el cerebro (ng/g)	Concentración en el plasma (ng/mL)	Cerebro/Plasma Ratio
VCE-005.1 (2 mg/kg, IV) 5 % DMSO/10 % Solutol-HS15/85 % Saline	0,5	Mean	296,7	298,0	1,02
		SD	65,4	99,8	0,11
	1	Mean	76,3	75,7	1,24
		SD	23,2	28,7	0,93
	2	Mean	0,0	17,3	0,00
		SD	0,0	6,5	0,00
VCE-005.1 (2 mg/kg, IV) 5 % Tween 20/20 % N-Methyl-2- pyrrolidone/75 % Saline	0,5	Mean	199,7	177,0	1,14
		SD	63,5	22,5	0,39
	1	Mean	158,7	117,3	1,36
		SD	112,1	86,2	0,08
	2	Mean	17,0	21,3	0,55
		SD	29,4	9,5	0,95
VCE-005.1 (3 mg/kg, IV) 5 % DMSO/10 % Solutol-HS15/85 % Saline	0,5	Mean	491,3	480,3	1,03
		SD	58,9	88,3	0,07
	1	Mean	240,3	150,3	1,61
		SD	9,0	17,0	0,21
	3	Mean	22,3	2,7	6,00
		SD	24,2	4,6	NA
VCE-005.1 (3 mg/kg, IV) 5 % Ethanol/5 % Kolliphor/90 % Saline	0,5	Mean	333,7	314,7	1,08
		SD	15,0	50,1	0,17
	1	Mean	176,3	84,0	2,48
		SD	5,9	45,2	1,10
	3	Mean	12,0	9,7	1,34
		SD	10,4	1,5	1,17

Tabla 12. Concentración del VCE-005.1 en cerebro y plasma tras su administración intravenosa.

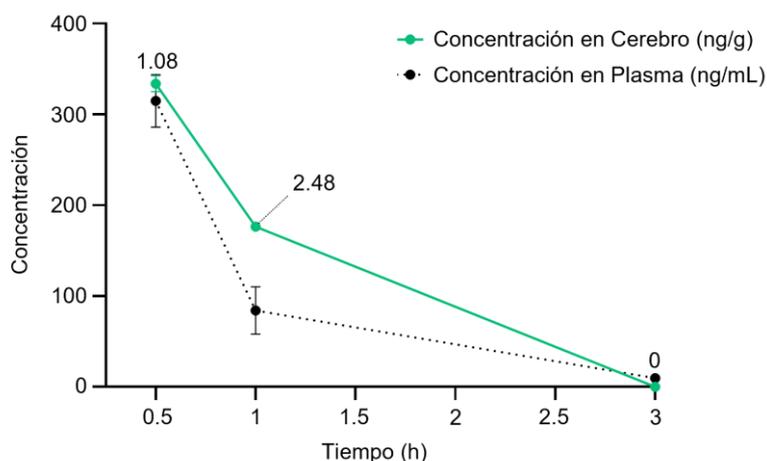


Figura 13. Penetración cerebral del VCE-005.1. Perfiles farmacocinéticos plasmáticos y cerebrales de VCE-005.1 en 1: 1: 18 Etanol: Cremophor® EL: Solución salina administrada por vía i.v. a ratas SD macho (3 mg/kg; n = 3 ratas por tiempo, media ±

SEM). Los valores de las relaciones cerebro/plasma por punto de tiempo se indican en la gráfica.

Estos resultados apoyan la posibilidad de que el VCE-005.1 pueda ser empleado por vía intravenosa para patologías agudas o por vía oral para patologías crónicas.

4.2 Mecanismo de acción del VCE-005.1

4.2.1 El compuesto VCE-005.1 modifica la actividad de las PHDs

Previamente se ha descrito que el compuesto VCE-005.1 es un derivado del ácido betulínico al cual se le ha añadido un grupo hidroxamato con capacidad de estabilizar a HIF-1 α ⁴⁸. Para identificar el mecanismo de acción del compuesto en la vía del HIF, primero analizamos su efecto sobre la actividad de las PHDs mediante experimentos *in vitro*. Para ello, estudiamos la capacidad de las proteínas PHDs recombinantes de hidroxilar HIF-1 α en presencia o ausencia de VCE-005.1. Como se muestra en la Figura 14A el VCE-005.1 no afectó a la actividad enzimática de las PHDs *in vitro*.

A continuación, decidimos analizar el efecto del VCE-005.1 sobre la actividad de las PHDs inmunoprecipitadas a partir de células que habían sido previamente estimuladas con el compuesto. En este caso, encontramos que el tratamiento con VCE-005.1 produjo una clara inhibición de la capacidad de las enzimas PHD2 y PHD3 de hidroxilar HIF-1 α . Sin embargo, no se observó ninguna alteración en la actividad de hidroxilación de PHD1 (Figura 14B).

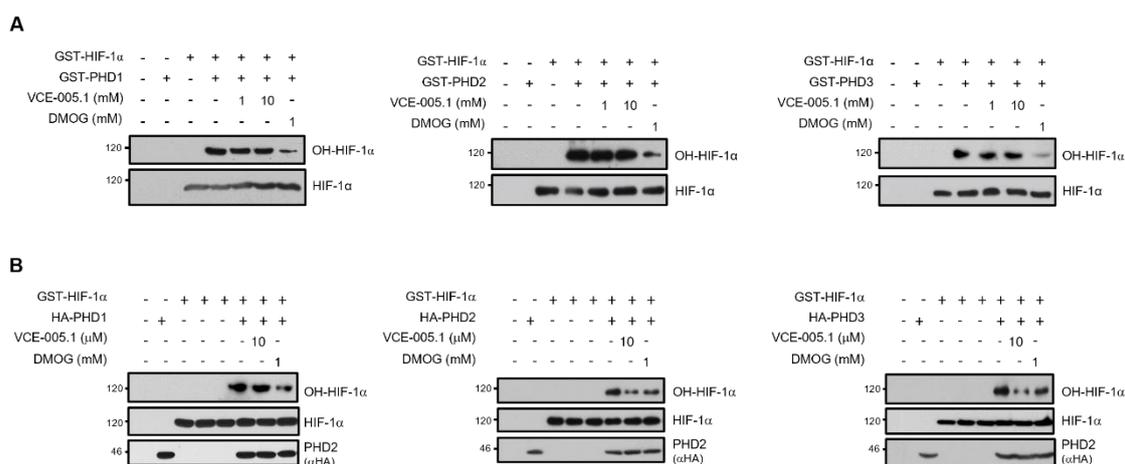


Figura 14. El VCE-005.1 altera la actividad de la PHD2. **A.** Se llevaron a cabo reacciones de hidroxilación *in vitro* empleando proteínas GST recombinantes para HIF1 α y las distintas PHDs. Los niveles de hidroxilación de HIF1 α , así como la señal de HIF1 α total se analizaron mediante Western Blot. **B.** Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos HA-PHD1, HA-PHD2 o HA-PHD3. A las 24 h se realizaron los tratamientos indicados con VCE-005.1 o DMOG (como control positivo). 48 h después de las transfecciones, se obtuvieron lisados celulares y las PHDs se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos anti-HA. Finalmente, estas fracciones de proteínas se utilizaron para realizar ensayos de hidroxilación *in vitro* y los niveles de HIF1 α hidroxilado se analizaron mediante inmunotransferencia.

En conjunto, estos resultados sugieren que el compuesto VCE-005.1 tiene la capacidad de modificar la actividad de PHD2 y PHD3 de forma indirecta.

4.2.2 El compuesto VCE-005.1 afecta tanto a la fosforilación de la Ser125 de la PHD2 como a su interactoma

A continuación, decidimos analizar los cambios producidos en el interactoma así como las modificaciones postraduccionales (PTM) de la proteína PHD2 después de la estimulación con VCE-005.1. Para ello, se inmunoprecipitó la proteína PHD2 a partir de células que habían sido previamente estimuladas con VCE-005.1 (Figura 15A), para posteriormente analizar las PTM y el interactoma por LC-MS/MS. Los péptidos identificados permitieron obtener una cobertura del 78 % de la secuencia de PHD2.

A partir de las PTM identificadas, se observó una clara diferencia en los niveles de fosforilación de la Ser125 después del tratamiento con VCE-005.1 en comparación con la situación control. Para confirmar esta observación, se analizó su estado de fosforilación utilizando un anticuerpo fosfoespecífico. Los resultados demostraron que la estimulación con VCE-005.1 produjo una reducción del 14 % de la fosforilación de la Ser125 (Figura 15B). Como mencionamos en la introducción, estudios anteriores habían confirmado que la proteína fosfatasa 2A junto con su subunidad reguladora B55 α (PP2A/B55 α) se considera uno de los principales moduladores de la fosforilación de la Ser125 de PHD2⁷⁰. Para verificar si la estimulación con VCE-005.1 modifica la fosforilación de la Ser125 de la PHD2 a través de la desfosforilación mediada por el complejo PP2A/B55 α , que se asocia con la remodelación vascular de las células endoteliales²⁰³, emprendimos un enfoque de “pérdida de función”. Así, el silenciamiento de B55 α por medio de un siRNA específico disminuyó sustancialmente el nivel de la proteína HIF-1 α tras la estimulación con VCE-005.1 (Figura 15C).

De la misma manera, empleamos inhibidores de la proteína PP2A bien caracterizados como son el LB-100 y el Ácido Okadaico (AO). Como se muestra en la Figura 15D, el aumento en el nivel de proteína HIF-1 α mediado por VCE-005.1 disminuyó claramente después de la estimulación con ambos inhibidores. Además, esta observación se complementó mediante un experimento de transactivación de EPO-luc en el que se midió la actividad transcripcional de HIF-1 α en presencia de LB-100 y AO. Como se muestra en la Figura 15E, la actividad sobre HIF-1 α mediada por VCE-005.1 se vió reducida de una manera dosis-dependiente con ambos inhibidores de la PP2A.

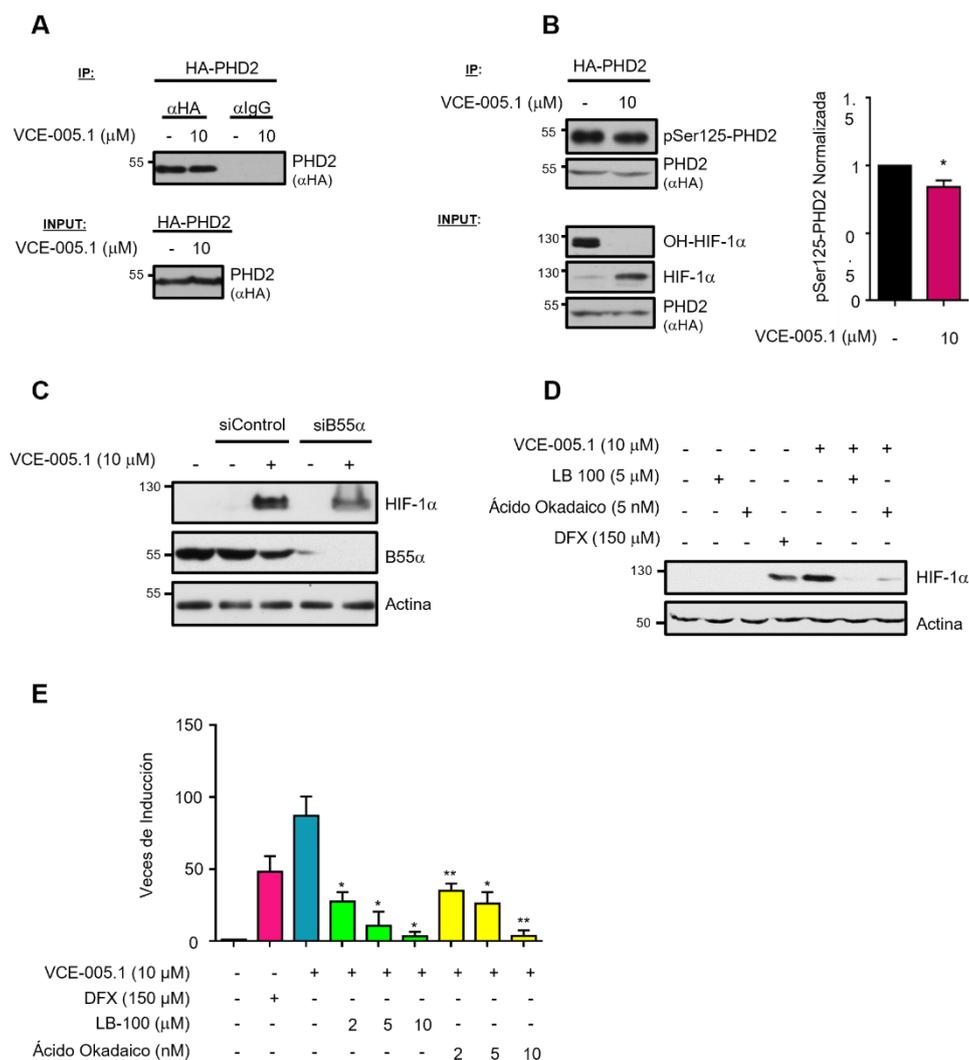


Figura 15. El compuesto VCE-005.1 altera la actividad de PHD2 modulando la fosforilación de la Ser125. **A.** Se transfectoron células HEK-293T con el plásmido HA-PHD2, se trataron con VCE-005.1 a 10 μM durante 24 h y finalmente se lisaron. La proteína PHD2 se inmunoprecipitó usando un anticuerpo específico (anti-HA) o uno inespecífico (IgG de rata) y su presencia se observó mediante Western Blot (n = 3). **B.** Se transfectoron células HEK-293T para expresar HA-PHD2, se trataron con VCE-005.1 a 50 μM durante 24 h y se lisaron. Una fracción se sometió a inmunoprecipitación (IP) usando un anticuerpo anti-HA. Después de la elución, la fosforilación se midió con un anticuerpo anti-fosfo Ser125-PHD2 específico, mientras que los niveles de la proteína HA-PHD2 exógena se visualizaron con un anticuerpo anti-HA mediante Western Blot (panel superior). La fracción de extracto restante se analizó para determinar la presencia de las proteínas indicadas (panel inferior). Además, las imágenes se cuantificaron (derecha) utilizando el software ImageJ. Los datos representan la media ± SD (n = 3). * p < 0,05. **C.** Se transfectoron las células HEK-293T con los siRNAs B55α o scrambled (siControl), después de 2 días en cultivo tratados con VCE-005.1 a 10 μM durante 6 h, se analizó la expresión de B55α y HIF-1α mediante Western Blot (n = 2). **D.** Se pre-trataron las células HEK-293T con inhibidores de PP2A LB-100 (5 μM) y ácido okadaico (5 nM) durante 30 minutos. Luego, se trató con VCE-005.1 a 10 μM durante 6 h y finalmente se lisó. La proteína HIF-1α se detectó usando un anticuerpo específico (n = 3). **E.** Se estimularon los fibroblastos NIH-3T3 transfectorados de forma estable con el plásmido EPO-luc con las concentraciones indicadas de VCE-005.1, LB-100 y ácido okadaico. Los datos representan la media ± SD (n = 3). * p < 0,05, ** p < 0,01.

Por otro lado, los resultados del estudio del interactoma identificaron en un principio 277 proteínas que interactuaban en condiciones normales con PHD2, mientras que después de la estimulación con VCE-005.1 se encontraron 232 interactores. Para eliminar posibles interactores no específicos, se empleó el algoritmo SAINT con un umbral de 0,2 para seleccionar específicamente aquellas proteínas que no están presentes en el control de la inmunoprecipitación (IgG). Después de esa restricción, las proteínas obtenidas en condiciones control se redujeron a 28, mientras que las encontradas después del tratamiento con VCE-005.1 fueron 23 (Figura 16A). El tratamiento adicional de los datos permitió clasificar estas proteínas identificadas en tres grupos diferentes. El primer grupo estaba formado por aquellas proteínas presentes solo en las células no tratadas, que en consecuencia se pierden tras el tratamiento con VCE-005.1 (28,12 % de las proteínas identificadas). El segundo grupo lo formaron aquellas proteínas que permanecieron inalteradas entre los distintos tratamientos (58,38 %). Finalmente, el último grupo contenía las proteínas que aparecieron solo tras el tratamiento con VCE-005.1 (12,5 %) (Figura 16B). La posterior caracterización funcional de estos datos a través de un análisis de sobrerrepresentación nos ha permitido tener una visión global de cómo la estimulación con VCE-005.1 modifica el interactoma PHD2 y cómo afecta a diferentes funciones celulares, entre las que podemos mencionar una clara reducción en vías relacionadas con la translocación de proteínas a la membrana, el inicio de la traducción o moléculas de adhesión celular (Figura 16C).

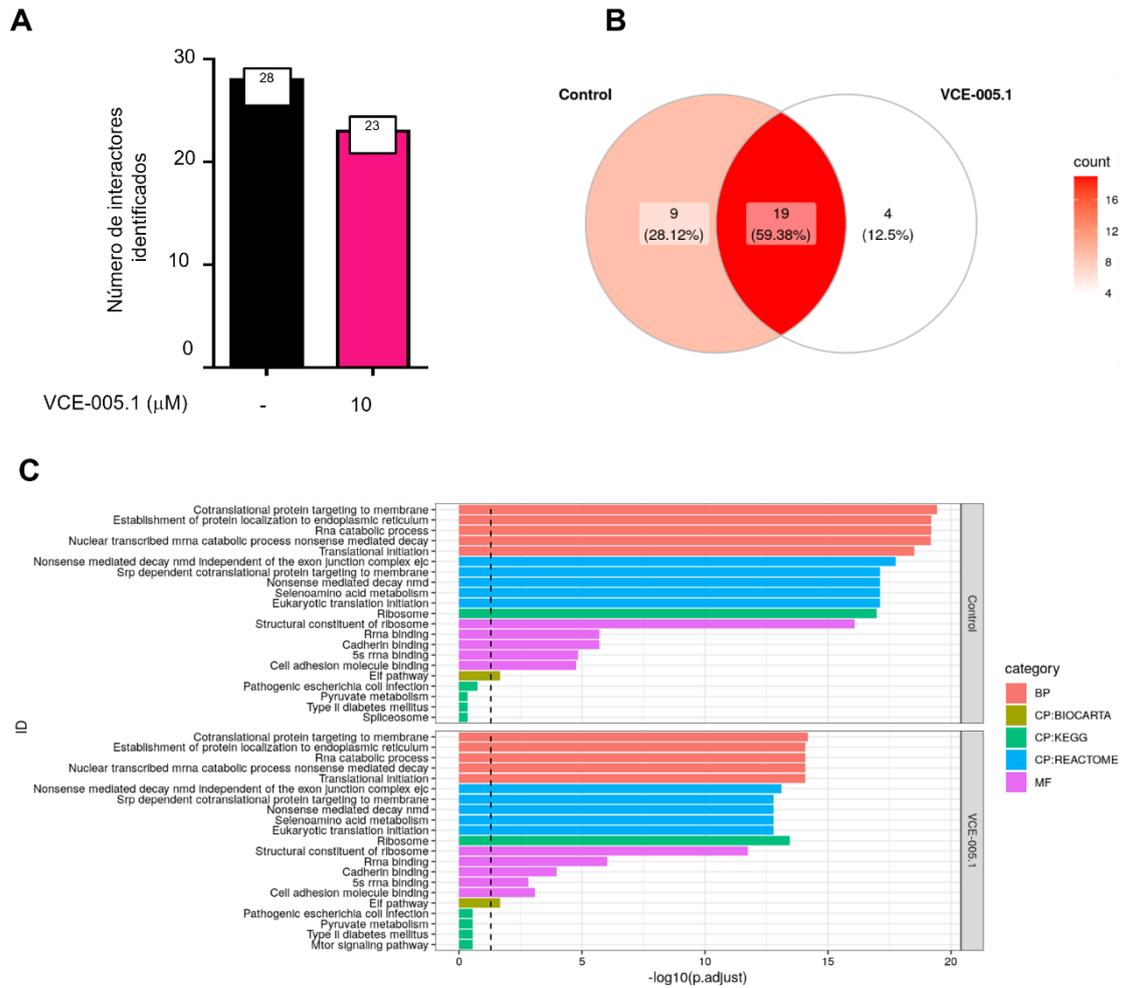


Figura 16. El tratamiento con VCE-005.1 afecta al interactoma de PHD2. **A.** Datos significativos de los análisis de interactoma realizados: la barra del gráfico muestra el número de proteínas de cada grupo. **B.** Diagrama de Venn donde se clasifican las proteínas obtenidas utilizando categorías de MSigDb e interactores individuales para el control y VCE-005.1. **C.** Vías inducidas representadas por categoría y tratamiento donde las etiquetas indican el número de genes superpuestos en una categoría funcional dada y la longitud de la barra el enriquecimiento. La línea discontinua indica el límite de $P = 0.05$.

4.3 Efecto terapéutico del compuesto VCE-005.1 en Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

4.3.1 VCE-005.1 induce la retracción del colágeno y activa la vía HIF-1 α

Como hemos visto, el compuesto VCE-005.1 disminuye la capacidad de PHD2 de hidroxilar HIF-1 α . Dado que los inhibidores de las PHDs mejoran la cicatrización de heridas y la remodelación tisular, comenzamos evaluando si, y en qué medida, nuestro compuesto podría inducir respuestas similares. Para ello, se llevó a cabo un experimento de contracción de gel de colágeno como modelo de cicatrización de heridas utilizando las células NIH-3T3-EPO-Luc¹³². Como se muestra en las Figuras 17A y 17B, el tratamiento con VCE-005.1 de los fibroblastos inmersos en los geles de colágeno mejoró la contracción de estos geles de una manera concentración-dependiente, resultados que se corroboran con el efecto que ejerce el compuesto sobre la activación de la vía de HIF (Figura 17C). Además, ambos experimentos se correlacionan de manera lineal como se muestra en el gráfico que enfrenta la actividad de HIF frente a la contracción del gel (Figura 7D). Al mismo tiempo, el compuesto VCE-005.1 indujo la estabilización de la proteína HIF-1 α en esta línea celular (Figura 17E). Estos hallazgos implican una relación directa entre VCE-005.1 y HIF durante la remodelación tisular y la contracción de la herida.

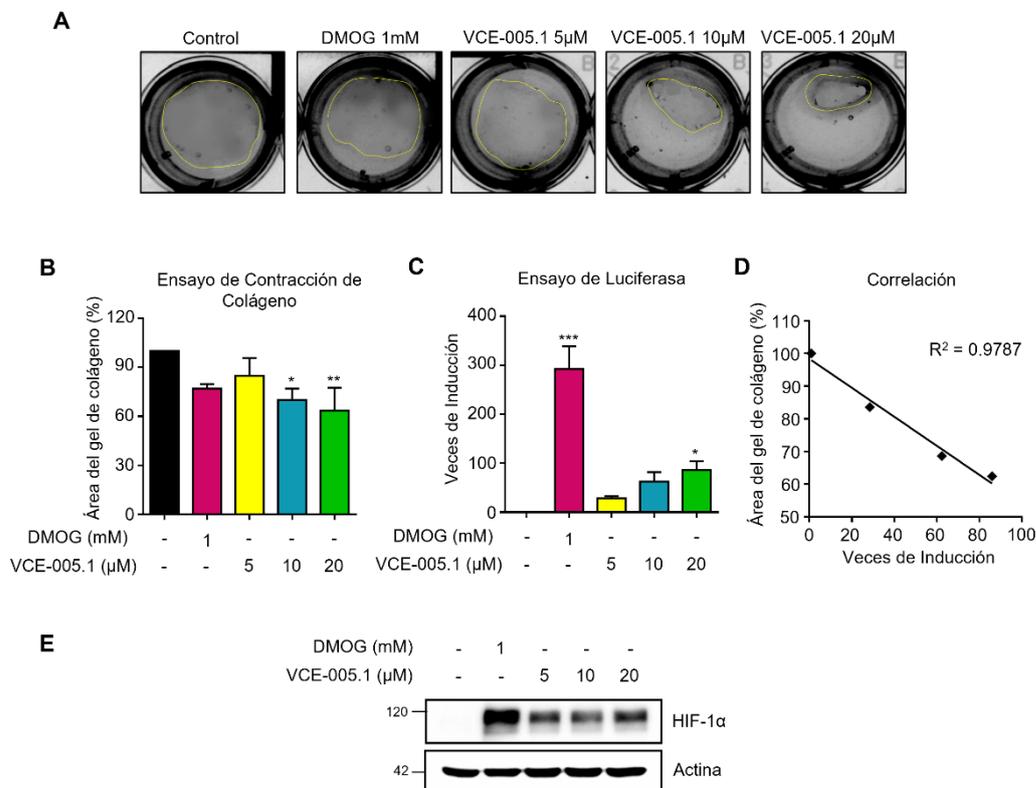


Figura 17. Efecto del VCE-005.1 en la contracción de colágeno y actividad de HIF. **A.** Imágenes de los geles contraídos en respuesta a VCE-005.1 durante 12 h. **B.** Área de la superficie del gel cuantificada en términos de número total de píxeles utilizando ImageJ. **C.** Se estimularon los fibroblastos NIH-3T3 transfectados de forma estable con plásmido reportero de luciferasa (NIH3T3-EPO-luc) con las concentraciones indicadas de VCE-

005.1 o DMOG. **D.** Correlación entre la actividad de HIF inducida por VCE-005.1 y la contracción del gel de colágeno. **E.** Expresión de la proteína HIF-1 α en células NIH-3T3-Epo-luc después de 6 h de tratamiento con VCE-005.1 y DMOG. Los valores se expresan como media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupo Control y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett.

4.3.2 VCE-005.1 alivia la inflamación y la fibrosis del colon inducida por TNBS

Después de la primera administración rectal del TNBS (día 7), se les administró el compuesto VCE-005.1 de manera oral a los ratones durante 2 semanas. Durante este tiempo, el grupo de control mostró un aumento de peso corporal progresivo en comparación con el día 0. Por el contrario, los ratones a los cuales se les estaba induciendo la colitis mostraron una pérdida de peso transitoria durante los 2 días posteriores a cada administración de TNBS (Figura 18A). A tiempo final (día 23), los ratones sometidos a la inducción de la colitis (grupo TNBS) mostraron una pérdida significativa del peso corporal en comparación con el grupo control. Aunque los ratones tratados con las diferentes dosis de VCE-005.1 también mostraron una pérdida de peso transitoria después de cada administración de TNBS, la pérdida de peso se mitigó significativamente durante todo el transcurso del modelo en comparación con el grupo del TNBS.

Finalmente, el día 23 se sacrificó a los ratones y se les extrajo el colon que posteriormente fue evaluado macroscópicamente. Los cólores de los ratones TNBS habían experimentado un acortamiento en comparación con el grupo de control, lo cual fue evitado significativamente con el tratamiento del VCE-005.1 (Figura 18B).

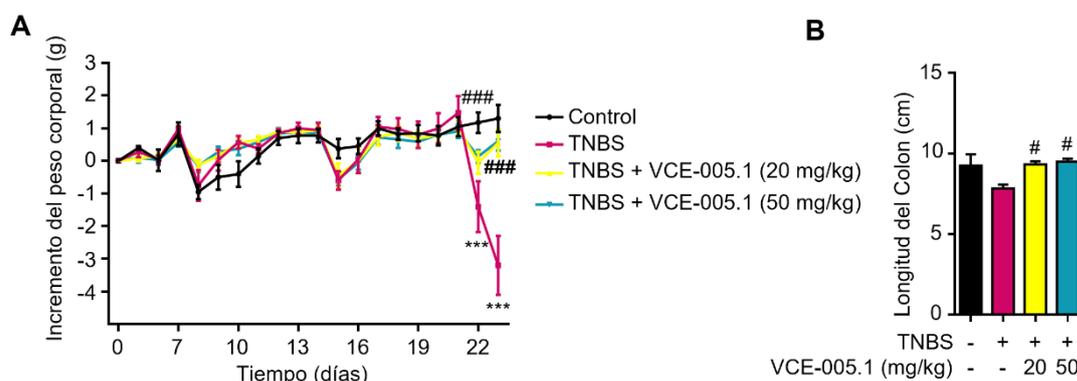


Figura 18. El compuesto VCE-005.1 atenúa la gravedad clínica en el modelo de TNBS.

A. El VCE-005.1 mejoró significativamente la disminución del peso corporal inducida por TNBS. La significancia se determinó mediante un two-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. **B.** La longitud del colon se midió en el momento del sacrificio y se comparó entre los grupos. La significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. Todos los resultados se muestran como media \pm SEM ($n = 4$ a 10 animales por grupo). *** $p < 0,001$ TNBS + Vehículo vs Control + Vehículo; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ TNBS + VCE-005.1 frente a TNBS + Vehículo.

A continuación, se confirmó el efecto beneficioso del VCE-005.1 mediante un examen histológico (Figura 19A-B). En el análisis histopatológico de colon utilizando H&E, se pudo detectar la ruptura de la barrera epitelial, inflamación transmural, ulceraciones, pérdida de células caliciformes, destrucción marcada de las criptas, así como áreas mucosas necróticas en los ratones tratados con TNBS, pero no en los tratados con el compuesto.

Para evaluar el proceso inflamatorio se realizó un análisis de la infiltración de células del sistema inmune mediante los marcajes F4/80 para macrófagos y CD3 para linfocitos por IHC. Se observó un aumento en el número de células F4/80⁺ y CD3⁺ acumuladas en la mucosa del lugar de la lesión del colon de los ratones tratados con TNBS, produciendo el tratamiento con VCE-005.1 una reducción significativa del número de células infiltradas en el tejido (Figura 19A-B). Para evaluar la existencia de fibrosis en el colon de los ratones TNBS, se realizó la tinción Picosirius Red/Fast green y la inmunofluorescencia de Tenascin C (Tnc) (Figura 19A-B). En el grupo del TNBS se observó una clara fibrosis por medio de la acumulación de colágeno y Tnc en el tejido en comparación con los animales control, sin embargo, esta acumulación se vio reducida mediante el tratamiento con el compuesto VCE-005.1. Estos resultados sugirieron que el compuesto puede mejorar con éxito la colitis y la fibrosis inducida por TNBS.

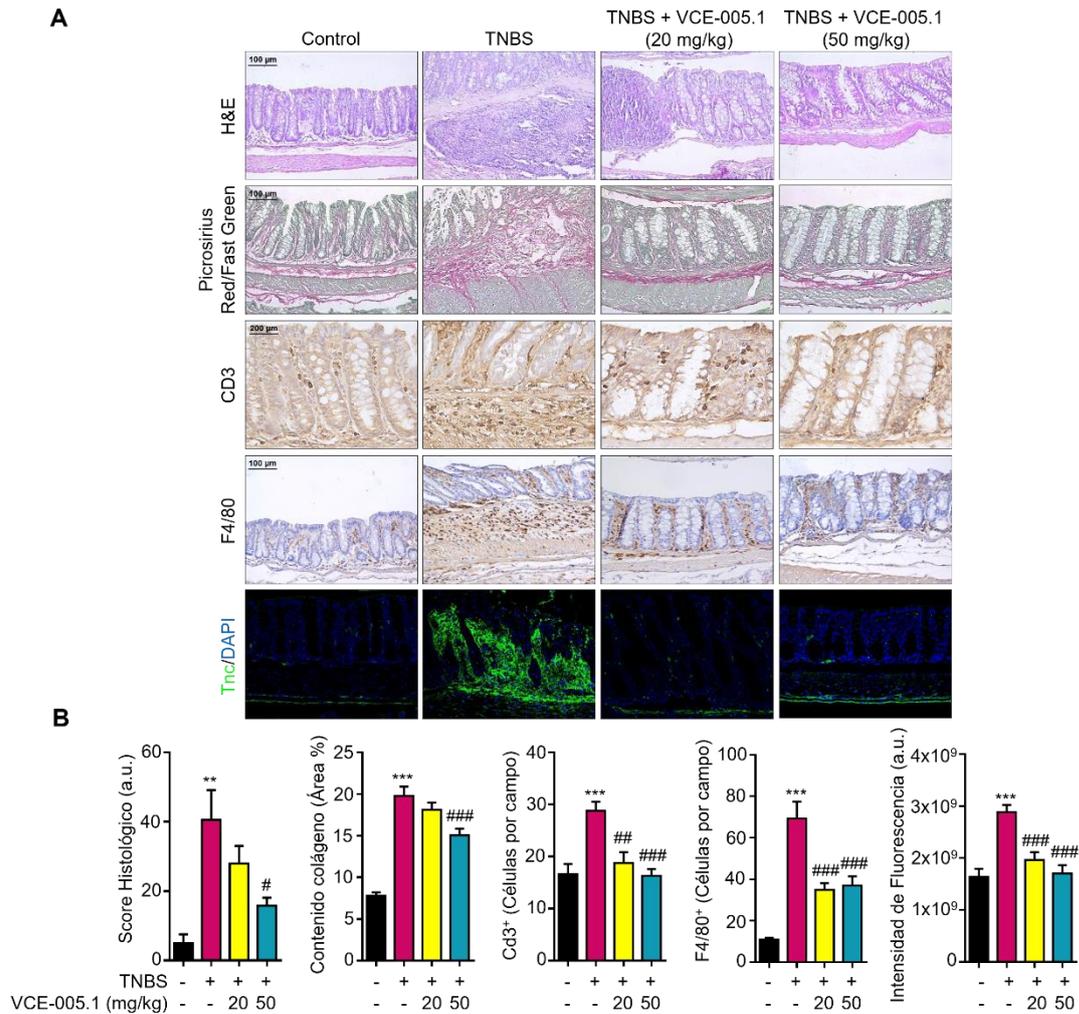


Figura 19. El compuesto VCE-005.1 atenúa la fibrosis y los biomarcadores relacionados con la inflamación en el modelo de TNBS. **A.** El panel presenta secciones histológicas teñidas con H&E o Picrosirius Red/Fast green, las IHC de macrófagos (F4/80) y linfocitos T (CD3) así como la inmunofluorescencia de TNC. Las imágenes representativas se muestran con el aumento indicado. **B.** Cuantificaciones de los marcadores del panel A. Todos los resultados se muestran como media \pm SEM (n = 4 a 10 animales por grupo). La significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey, excepto el score histológico (prueba Dunnett). ** p < 0,01, *** p < 0,001 TNBS + Vehículo vs Control + Vehículo; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 TNBS + VCE-005.1 frente a TNBS + Vehículo.

Para evaluar más a fondo la actividad antifibrótica del compuesto VCE-005.1 en el modelo de TNBS, se realizó un array de qPCR con genes relacionados con la fibrosis. Lo que pudimos observar es que varios genes relacionados con procesos inflamatorios y fibróticos se desregularon tras la administración de TNBS en comparación con el grupo control, y este efecto se vio minimizado con el compuesto a una dosis de 50 mg/kg (Figura 20A). Estos resultados fueron confirmados por qPCR, evidenciando que el aumento de la expresión de *Tnc*, *Ccl3*, *Il1 β* , *Mmp3*, *Mmp8* y *Timp1* fue prevenido por el tratamiento con VCE-005.1. Por el contrario, la expresión de *Il13* y *Mrc1* aumentó con el tratamiento del compuesto (Figura 20B).

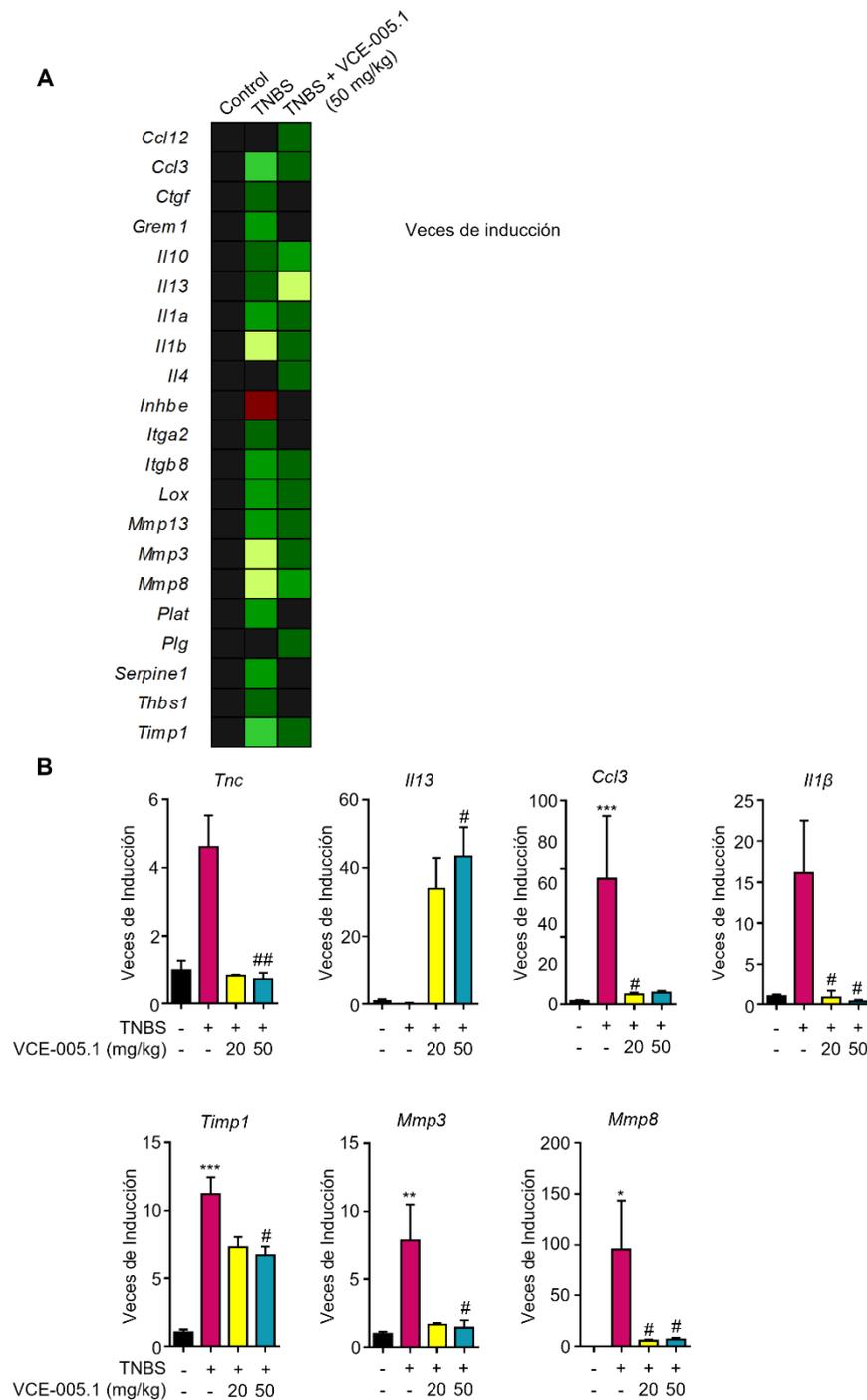


Figura 20. El tratamiento con VCE-005.1 normalizó la expresión de genes asociados con la fibrosis en el modelo de TNBS. **A.** Se utilizó ARN de tejido de colon para determinar la expresión de genes implicados en la fibrosis mediante un Array de PCR. Los heat-maps mostraron genes significativamente incrementados (verde) o reducidos (rojo) en TNBS + Vehículo o TNBS + VCE-005.1 en comparación con Control + Vehículo. **B.** La expresión de ARNm de genes relacionados con la fibrosis (*Tnc*, *Il13*, *Timp1*, *Il1β*, *Ccl3*, *Mmp3*, *Mmp8* y *Mrc1*) se cuantificó mediante qPCR y se normalizó frente a *Gapdh*. Los datos representan la media \pm SEM (n = 3 a 7 animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 TNBS + Vehículo vs Control + Vehículo; # p < 0,05, ## p < 0,01 TNBS + VCE-005.1 frente a TNBS + Vehículo.

El sangrado rectal es una de las características comunes de la EII²⁰⁴ y por ello se investigó el daño vascular en los ratones TNBS mediante un análisis morfométrico con consistió en medir el perímetro y el área de los vasos sanguíneos marcados con el marcador endotelial CD31. De esta manera pudimos observar que ambos parámetros aumentaron significativamente en el grupo TNBS en comparación con los ratones control y se recuperaron en los ratones tratados con VCE-005.1 (Figura 21A-B).

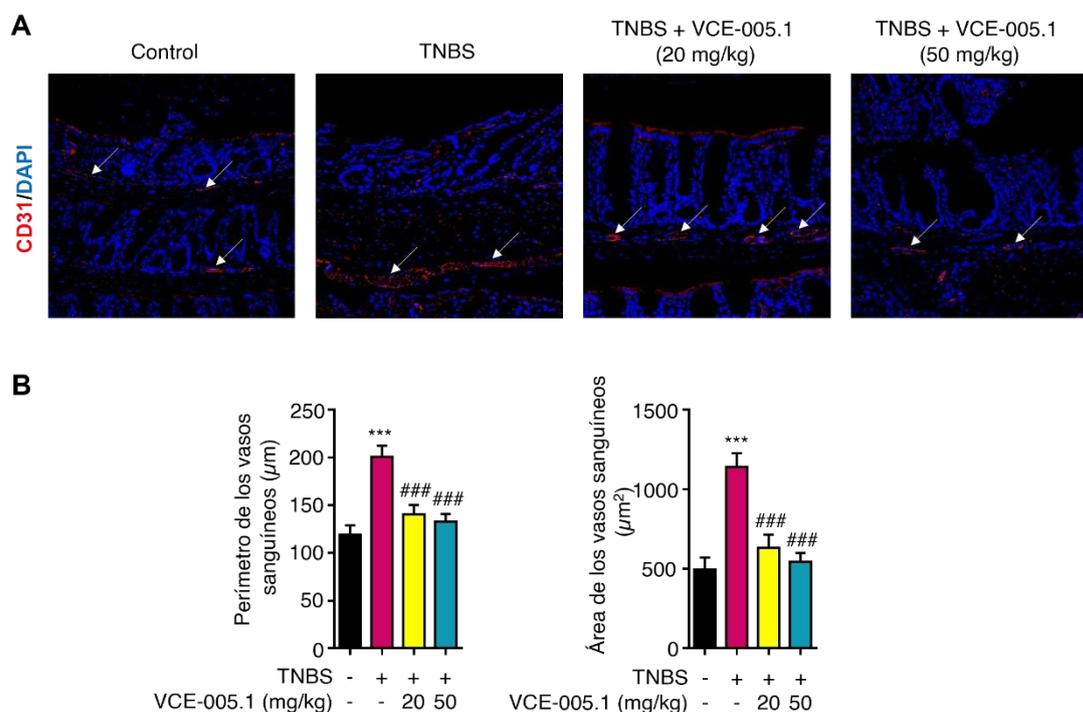


Figura 21. El tratamiento con VCE-005.1 previno el aumento del perímetro y el área de los vasos sanguíneos. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal (aumento original 20x) de los vasos marcados con CD31 (flechas blancas). **B.** Las cuantificaciones del perímetro y el área se muestran como media \pm SEM ($n = 4$ animales por grupo), y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0,001$ TNBS + Vehículo vs Control + Vehículo; ### $p < 0,001$ TNBS + VCE-005.1 vs TNBS + Vehículo.

4.3.3 Efecto del compuesto VCE-005.1 sobre la integridad de la barrera epitelial

Para explorar más a fondo el efecto del VCE-005.1 en el colon de ratones con colitis inducida por TNBS, primero examinamos los niveles de ARNm de genes regulados por HIF asociados con la integridad de la barrera intestinal como son las mucinas y las proteínas de unión estrecha²⁰⁵. En nuestros experimentos, el tratamiento con TNBS redujo notablemente la expresión de estos genes, pero el VCE-005.1 pudo restaurar o incluso mejorar la expresión de *Itf*, *Muc2*, *Muc3*, *Cldn1* y *Zo1* (Figura 22A). Para confirmar estos resultados a nivel de proteína, se estudió la expresión de Muc-2 y Cldn-1 mediante IHC (Figura 22B-C). En conjunto, estas observaciones indican que el compuesto VCE-005.1 ejerce un efecto beneficioso sobre la alteración de la mucosa inducida por TNBS.

Dado que citocinas como el TNF α o IFN γ inducen disrupción epitelial²⁰⁶, se investigó adicionalmente el efecto del VCE-005.1 sobre la disrupción de la barrera epitelial en un modelo *in vitro* fisiológicamente relevante como es el TEER. Se incubaron células Caco-2 con diferentes concentraciones de VCE-005.1 durante 24 h, y posteriormente se les añadió sobrenadantes de PBMCs activados con PHA justo 30 min antes de la medición. Como se muestra en la Figura 22D, el sobrenadante de las PBMCs estimuladas con PHA, al contener un cóctel de citocinas proinflamatorias, fue capaz de inducir una ruptura epitelial clara, la cual se previno significativamente en las células que habían sido tratadas con VCE-005.1. En general, todos los datos experimentales apoyan la opinión de que el compuesto VCE-005.1 tiene un efecto positivo sobre la integridad de la barrera epitelial intestinal.

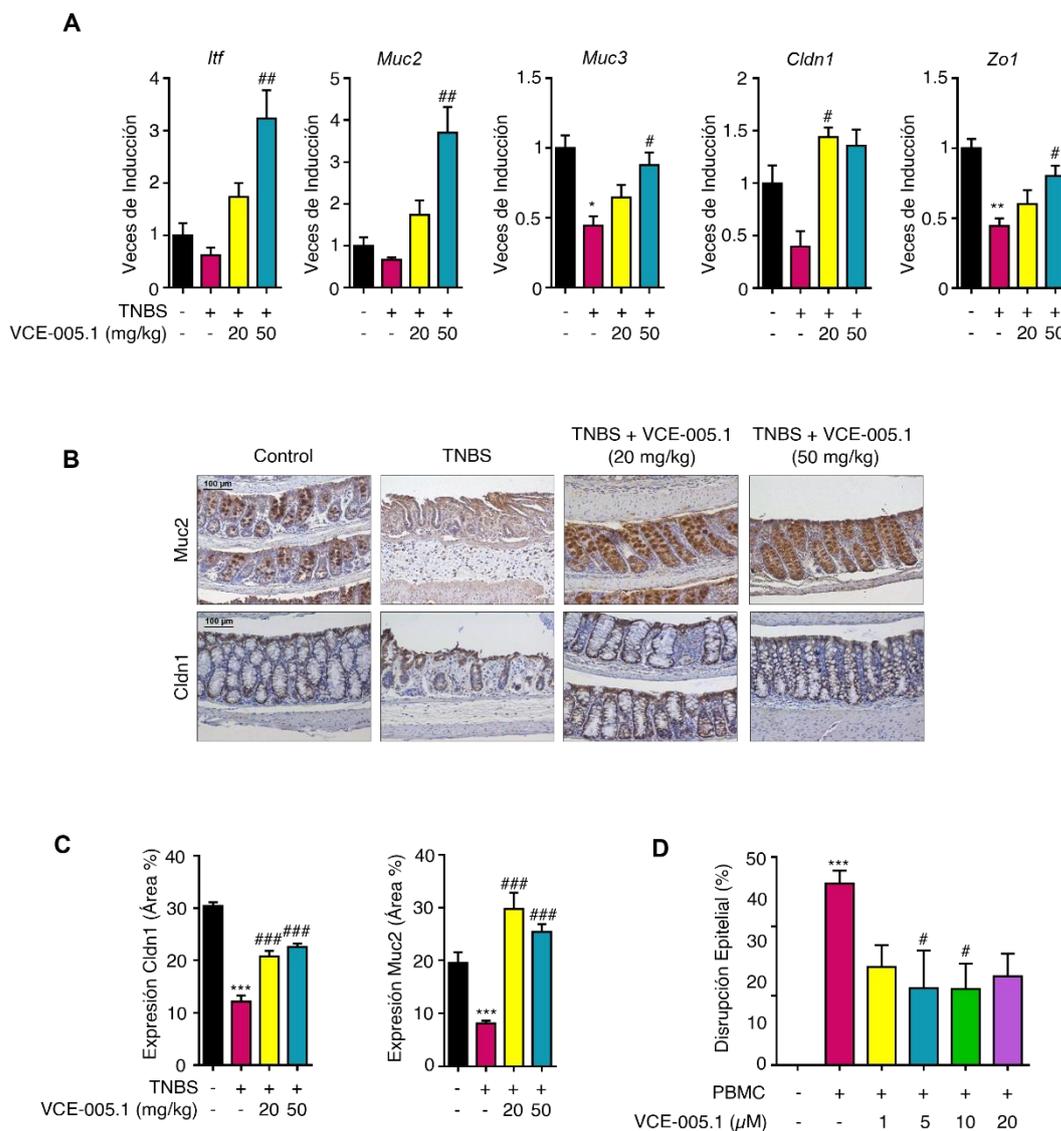


Figura 22. El compuesto VCE-005.1 mejora la integridad de la barrera epitelial intestinal. **A.** La expresión de un panel de genes relacionados con la integridad de la barrera epitelial aumentó significativamente en ratones tratados con el compuesto VCE-005.1. Las cuantificaciones se muestran como media \pm SEM (n = 3 a 8 animales por grupo), y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba

post-hoc Dunnett. **B.** Las imágenes muestran la IHC de secciones de colon para el marcador de mucina Muc-2 y la proteína de unión estrecha Claudin-1 con un aumento original de 20x, sus cuantificaciones (**C**) se muestran como media \pm SEM (n = 4 animales por grupo), y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 TNBS + Vehículo vs Control + Vehículo; # p <0,05, ## p <0,01, ### p <0,001 TNBS + VCE-005.1 frente a TNBS + Vehículo. **D.** El tratamiento con VCE-005.1 protege de la alteración epitelial provocada por PBMCs en la línea celular Caco-2. Los datos representan la media \pm SD (n = 5). *** p <0,001. Células tratadas con PBMC vs Control; # p <0,05 células tratadas con VCE-005.1 vs células tratadas con PBMC (one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey).

4.3.4 VCE-005.1 previene la inflamación del colon y la fibrosis inducida por DSS

Para estudiar la colitis ulcerosa existen diferentes modelos animales que se asemejan a las características clínicas e histológicas de los diferentes tipos de EII. Así, los modelos de colitis inducida por TNBS son "similares a EC" (asociados con inflamación y edema transmural), mientras que los de colitis por DSS son "similares a CU" (asociados con rotura epitelial, lesiones focales e inflamación superficial)²⁰⁷. Estudios previos han demostrado que el daño en el colon inducido por DSS está directamente relacionado con la infiltración celular en la mucosa intestinal²⁰⁸. Por esta razón, se investigó adicionalmente el efecto protector de VCE-005.1 en la colitis mediada por DSS tratando a los animales durante 2 semanas después de recibir DSS durante 5 días. Los cólores se procesaron para el análisis histológico mediante tinción con H&E y se estudió la infiltración con los marcadores F4/80 y CD3 (Figura 23A-B). El colon de los ratones tratados con DSS mostró destrucción de tejido con cambios histopatológicos en la mucosa, submucosa, capa muscular y pared del colon. Además, se observó un aumento en el número de células inflamatorias en el tejido visualizado por la IHC de células F4/80⁺ y CD3⁺. En este modelo, el compuesto DMOG se utilizó como control positivo debido a sus efectos protectores sobre la EII inducida por DSS¹³¹. Los compuestos VCE-005.1 a una concentración de 50 mg/kg y DMOG a 8 mg/ratón mejoraron el score histológico y disminuyeron el número de células inflamatorias inducidas por el daño por DSS.

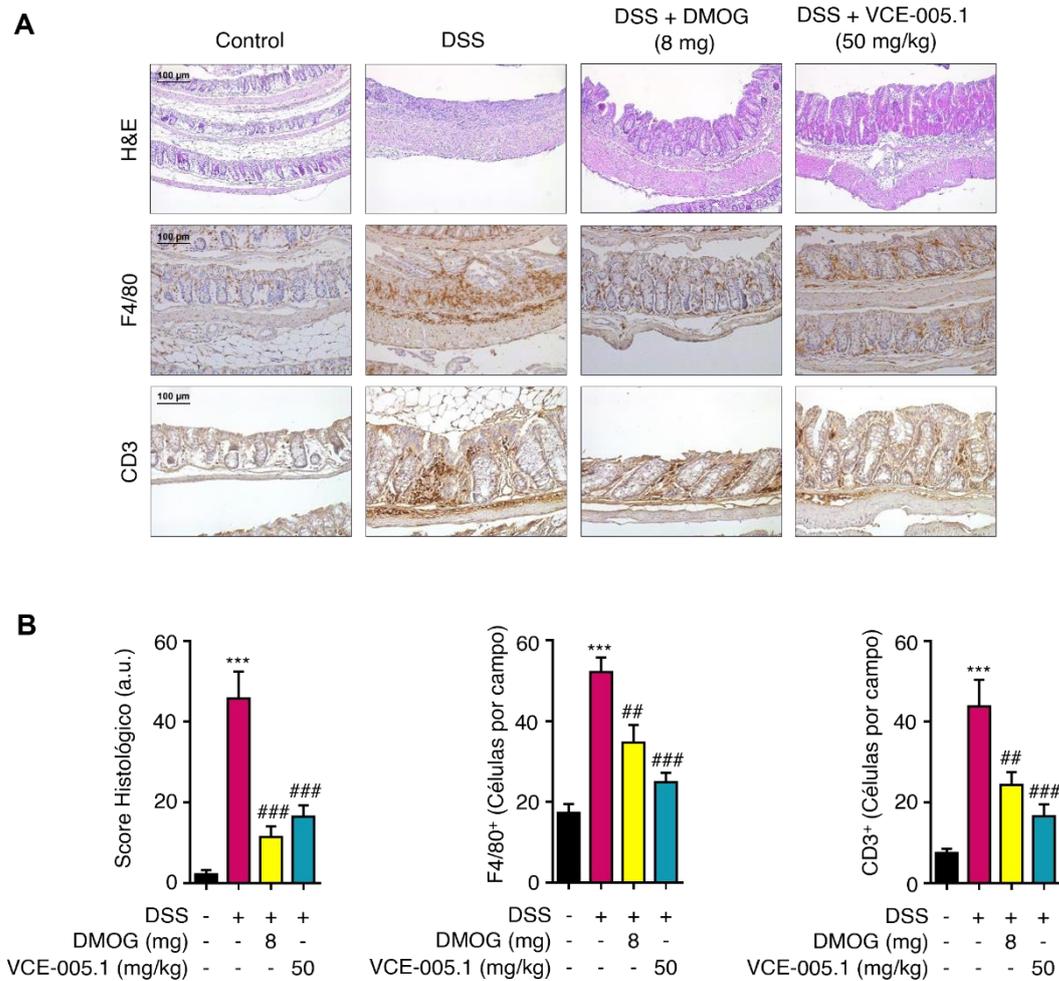


Figura 23. El compuesto VCE-005.1 reduce significativamente la inflamación y preserva la estructura epitelial en el colon de los animales tratados con DSS. **A.** Imágenes representativas de la tinción H&E e infiltración de macrófagos (F4/80) y linfocitos (CD3) en secciones de colon (aumento original 20x). **B.** Los tratamientos con VCE-005.1 y DMOG mejoraron la puntuación histológica y el número de células inflamatorias presentes en el colon. Las cuantificaciones se muestran como media \pm SEM ($n = 4$ a 7 animales por grupo), y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0.001$ DSS + Vehículo vs Control + Vehículo; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ DSS + VCE-005.1 o DSS + DMOG vs DSS + Vehículo.

La fibrosis desarrollada en el colon en este modelo con DSS también se alivió con el tratamiento del DMOG y del VCE-005.1. Esto fue observado a nivel transcriptómico, según lo investigado por RT-PCR array (Figura 24A), y confirmado por qPCRs midiendo la expresión de los genes *Colla2*, *Col3a1*, *Tnc* y *Timp1* (Figura 24B).

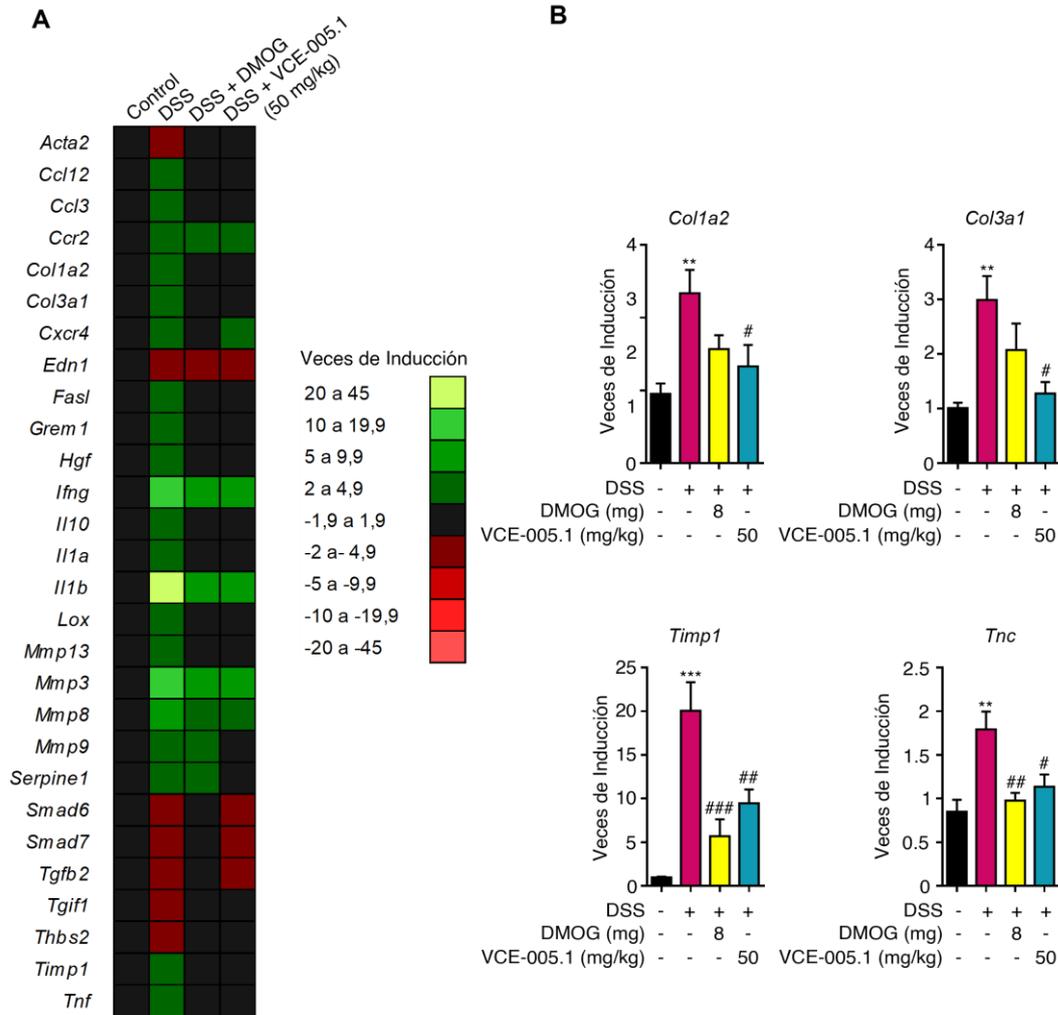


Figura 24. El tratamiento con VCE-005.1 normalizó la expresión de genes asociados con la fibrosis en el modelo de DSS. **A.** Se utilizó ARN de colon para determinar la expresión de genes implicados en la fibrosis mediante un array de PCR. Los heat-maps mostraron los genes incrementados (verde) o disminuidos (rojo) en DSS + Vehículo, DSS + VCE-005.1 o DSS + DMOG en comparación con Control + Vehículo. **B.** La expresión de ARNm de genes relacionados con la fibrosis (*Col1a2*, *Col3a1*, *Timp1* y *Tnc*) se cuantificó mediante qPCR y se normalizó frente a *Gapdh*. Los datos representan la media \pm SEM y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ DSS + Vehículo vs Control + Vehículo; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ DSS + VCE-005.1 o DSS + DMOG vs DSS + Vehículo.

Además, en el colon también se analizó la expresión de marcadores fibróticos como α -SMA y Tnc, mostrando que el aumento de su expresión en el grupo DSS se vio reducida significativamente tras el tratamiento con VCE-005.1 y DMOG (Figura 25A-B). Para cuantificar el contenido de colágeno, se realizó la tinción de Picosirius Red/Fast green, encontrando que el compuesto VCE-005.1 prevenía significativamente su acumulación (Figura 25C).

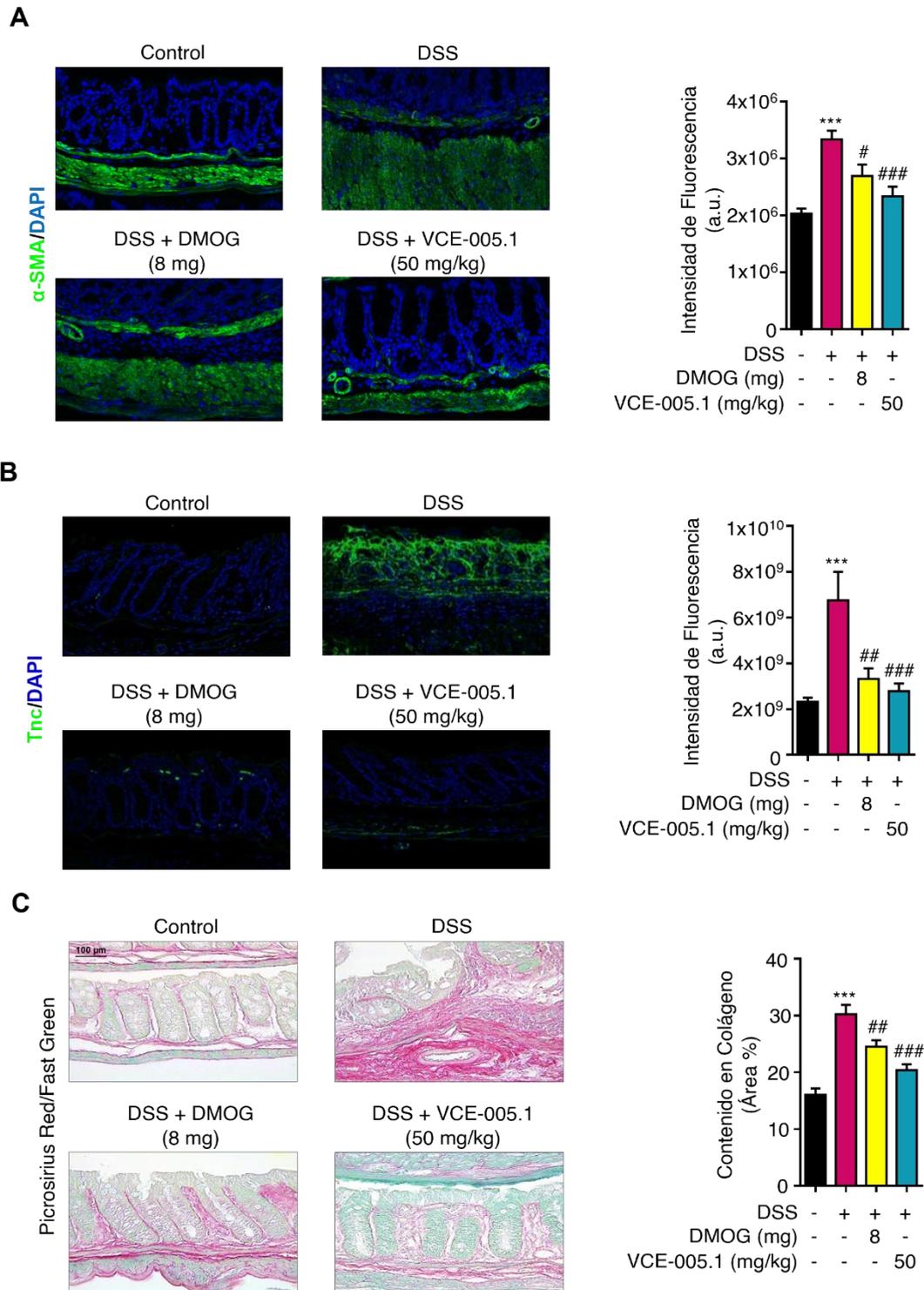


Figura 25. El compuesto VCE-005.1 previene la fibrosis del colon en el modelo de DSS.

A. Imágenes representativas de microscopía confocal de α -SMA (fluorescencia verde) en secciones de colon y su cuantificación. **B.** Se muestra el marcaje de inmunofluorescencia de TNC (fluorescencia verde) en el control, DSS + Vehículo, DSS + DMOG y DSS + VCE-005.1. **C.** Imágenes representativas de la tinción Picrosirius Red/Fast Green (panel izquierdo). Comparación del contenido de colágeno entre los grupos experimentales (panel derecho). El aumento original de todas las imágenes es 20x. Las cuantificaciones se muestran como media \pm SEM ($n = 6$ a 8 animales por grupo), y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0.001$ DSS + Vehículo vs Control + Vehículo; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ DSS + VCE-005.1 o DSS + DMOG vs DSS + Vehículo.

4.3.5 El compuesto VCE-005.1 administrado por vía rectal no previene la inflamación del colon.

Dado que las preparaciones de sulfasalazina y mesalazina se han utilizado durante muchos años por vía oral o rectal para el tratamiento de la EII, evaluamos si el VCE-005.1 también podría ejercer una actividad anti-ulcerativa por vía rectal. Como se muestra en la Figura 26 y en comparación con el DMOG y el VCE-005.1 oral, la administración rectal del compuesto no mejoró el score histológico o el contenido de colágeno, observándose las mismas características que en los ratones DSS. Estos resultados sugieren con firmeza que el compuesto VCE-005.1 actúa de manera sistémica.

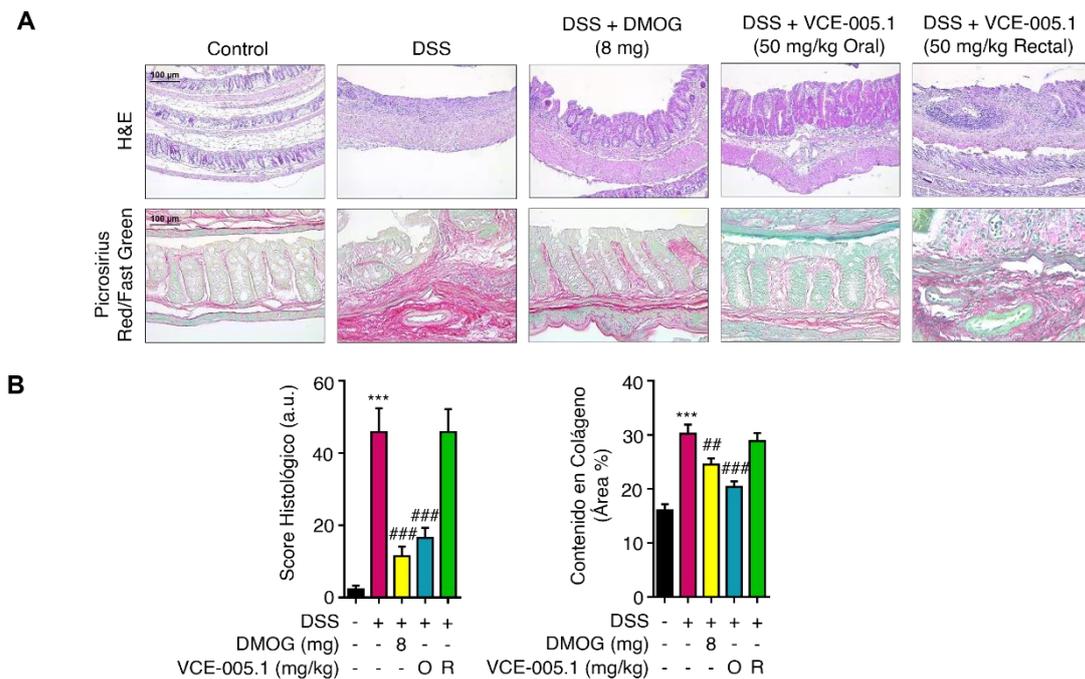


Figura 26. El compuesto VCE-005.1 ejerce sus funciones sistémicamente pero no tópicamente en el recto. **A.** El VCE-005.1 mejoró el score histológico y el contenido de colágeno cuando se administró por sonda oral pero no cuando es administrado por vía rectal (aumento original 20x). **B.** Las cuantificaciones se muestran como media \pm SEM ($n = 6$ a 8 animales por grupo), y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0,001$ DSS + Vehículo vs Control + Vehículo; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ DSS + VCE-005.1 o DSS + DMOG vs DSS + Vehículo.

4.4 Estudio del potencial terapéutico del VCE-005.1 en Enfermedad de Huntington (EH)

4.4.1 Efectos del compuesto VCE-005.1 en neuronas estriatales que expresan huntingtina normal y mutada.

Para estudiar el efecto del VCE-005.1 en la vía de HIF, se estimularon neuronas estriatales inmortalizadas que expresan la proteína huntingtina normal (STHdh^{Q7/Q7}) o una versión mutante asociada con la aparición juvenil de la EH (STHdh^{Q111/Q111})²⁰⁹ con las dosis indicadas y se analizó la expresión de las proteínas HIF-1 α y PHDs. Como se muestra en la Figura 27A, el compuesto VCE-005.1 estabilizó la proteína HIF-1 α de una manera dosis-dependiente tanto en neuronas que expresan la huntingtina normal como la mutada. Aunque la expresión basal de las proteínas PHDs es mayor en la línea celular STHdh^{Q111/Q111} en comparación con la STHdh^{Q7/Q7}, no se encontraron cambios significativos tras el tratamiento con VCE-005.1.

Para investigar más en profundidad la activación de la vía HIF, se decidió determinar la expresión de los genes *Vegf* y *Bnip3* en ambas líneas celulares (Figura 27B-C). En ambos casos, el compuesto VCE-005.1 pudo inducir la expresión de *Vegf* y *Bnip3* de una manera dosis-dependiente.

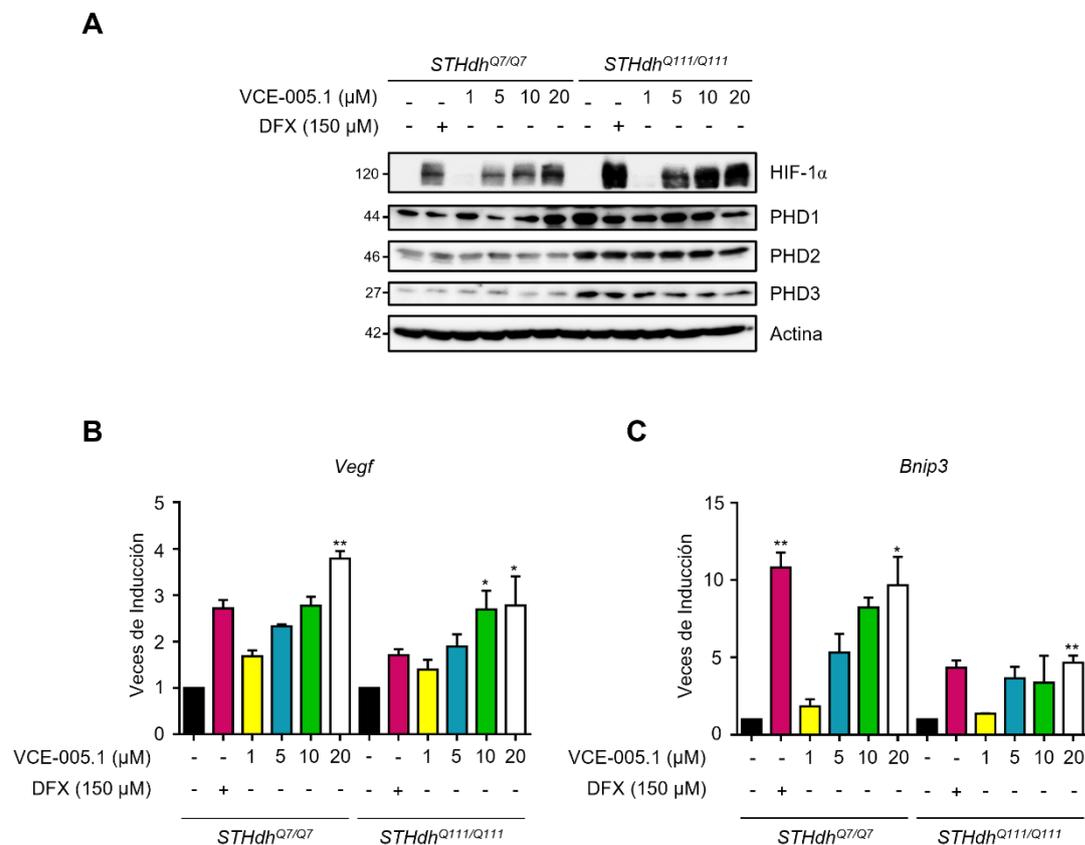


Figura 27. Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre las células estriatales con huntingtina normal y mutada. **A.** Las células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} se trataron con VCE-005.1 durante 6 h y se analizaron para determinar la expresión de HIF-1 α , PHD1, PHD2 y

PHD3 mediante western blot. Los niveles de expresión del ARNm de los genes *Vegfa* (B) y *Bnip3* (C) se cuantificaron mediante qPCR en células *STHdh*^{Q7/Q7} y *STHdh*^{Q111/Q111} después de 6 h de tratamiento con el compuesto. Los datos representan la media \pm SD (n = 3) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. * p <0,05, ** p <0,01, células tratadas con VCE-005.1 vs células no tratadas.

Finalmente, se evaluó el efecto neuroprotector del VCE-005.1 en respuesta a la disfunción mitocondrial en neuronas inducida por el inhibidor selectivo del complejo II, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP). Como se esperaba, el 3-NP fue fuertemente citotóxico en las células *STHdh*^{Q111/Q111} en comparación con las células *STHdh*^{Q7/Q7}, y el tratamiento con VCE-005.1 protegió a ambas líneas de la muerte celular inducida por 3-NP (Figura 28).

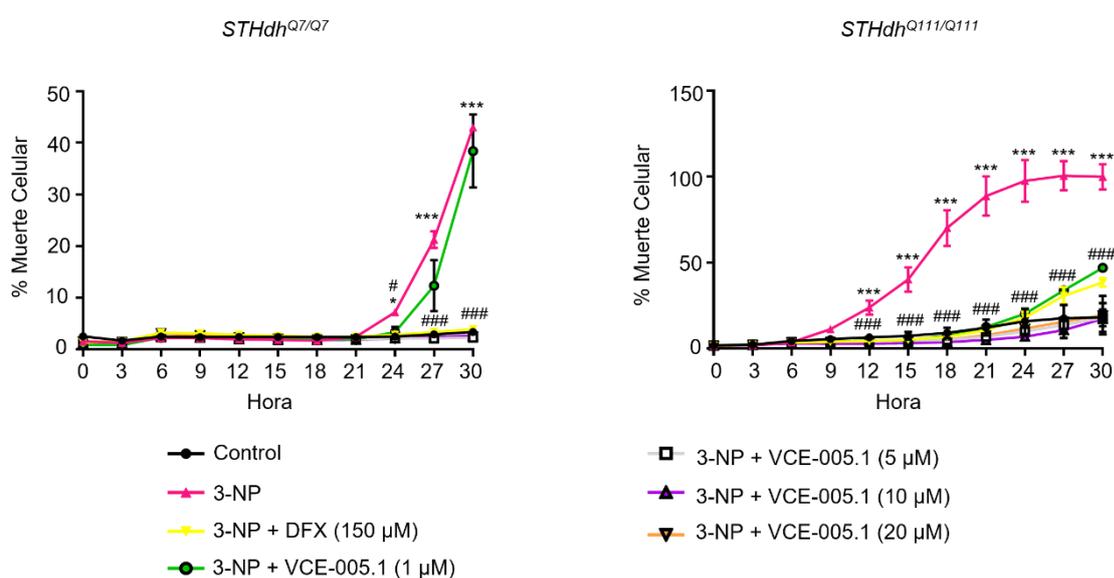


Figura 28. Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre las células estriatales con huntingtina normal y mutada. Se preincubaron células *STHdh*^{Q7/Q7} y *STHdh*^{Q111/Q111} con las concentraciones indicadas de VCE-005.1 durante 6 horas y se estimularon con 3NP durante 30 h. El porcentaje de muerte neuronal fue determinado por Yoyo-1 y se normalizó con las neuronas tratadas con vehículo. Los datos representan la media \pm SD (n = 3) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. * p <0,05, *** p <0,001 células tratadas con 3NP vs células no tratadas; # p <0,05, ### p <0,001 células tratadas con 3NP + VCE-005.1 vs células tratadas con 3-NP.

4.4.2 Efecto neuroprotector del compuesto VCE-005.1 en un modelo murino de degeneración neuronal del estriado

Para confirmar la acción neuroprotectora del VCE-005.1 *in vivo*, se utilizó un modelo de enfermedad de Huntington basado en la administración de 3-NP. El tratamiento con 3-NP produce diversas alteraciones, entre las que se encuentran cambios neurológicos e histológicos característicos de algunos aspectos de la patología de la EH. En comparación con los animales control tratados con vehículo, los ratones tratados con 3-NP exhibieron puntuaciones altas en el score clínico que incluía los parámetros: capacidad de agarre de las extremidades traseras, actividad locomotora, distonía de las extremidades traseras y cifosis (Figura 29). Esta sintomatología se vio significativamente mejorada en el grupo de ratones a los cuales se les había administrado el compuesto VCE-005.1.

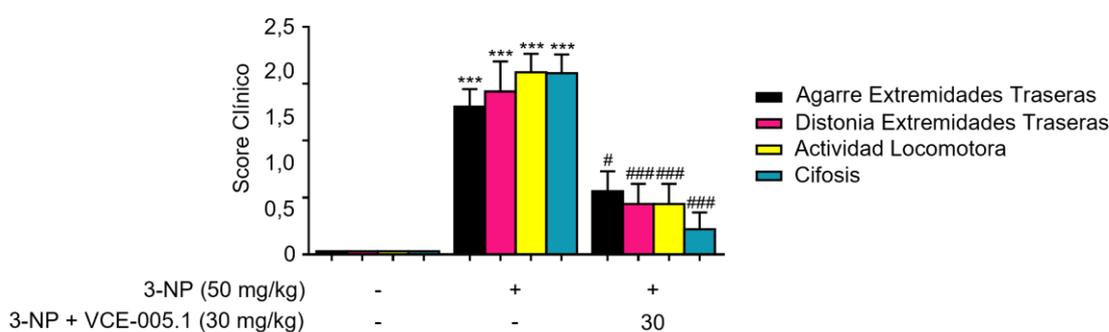


Figura 29. El compuesto VCE-005.1 es neuroprotector en ratones tratados con 3NP. El score clínico se determinó 12 horas después de la última administración de 3NP. Los ratones se trataron con VCE-005.1 a una dosis de 30 mg/kg. El agarre de las extremidades posteriores, la actividad locomotora general, la distonía de las extremidades traseras y la cifosis se calificaron de 0 a 2 según la gravedad, con una puntuación de 0 que indica una función normal y 2 que indica la función afectada más grave. Los valores se expresan como medias \pm SEM ($n = 6$) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0,001$ 3NP vs vehículo; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ 3NP + VCE-005.1 vs 3NP.

A continuación, investigamos el efecto del VCE-005.1 en la degeneración y atrofia estriatal. Como pudimos determinar mediante la tinción de Nissl y la inmunohistoquímica de NeuN, la administración de 3-NP produjo una reducción en el número de neuronas presentes en el estriado mientras que el tratamiento con el compuesto protegió frente a ella. Además, la neuroprotección mediada por VCE-005.1 se asoció con una reducción en la astrogliosis inducida por 3-NP tal y como podemos ver en la inmunofluorescencia de GFAP, y una disminución en la activación de la microglía. Los ratones tratados con 3-NP mostraron el cambio de morfología típico asociado a la activación microglial que consiste en ramificaciones citoplasmáticas retraídas y una apariencia ameboide²¹⁰. Sin embargo, las células positivas para Iba1 presentes en los ratones control y en los tratados con VCE-005.1 exhibieron una morfología típica de microglía en estado de reposo con ramificaciones finas y extendidas (Figura 30A-B).

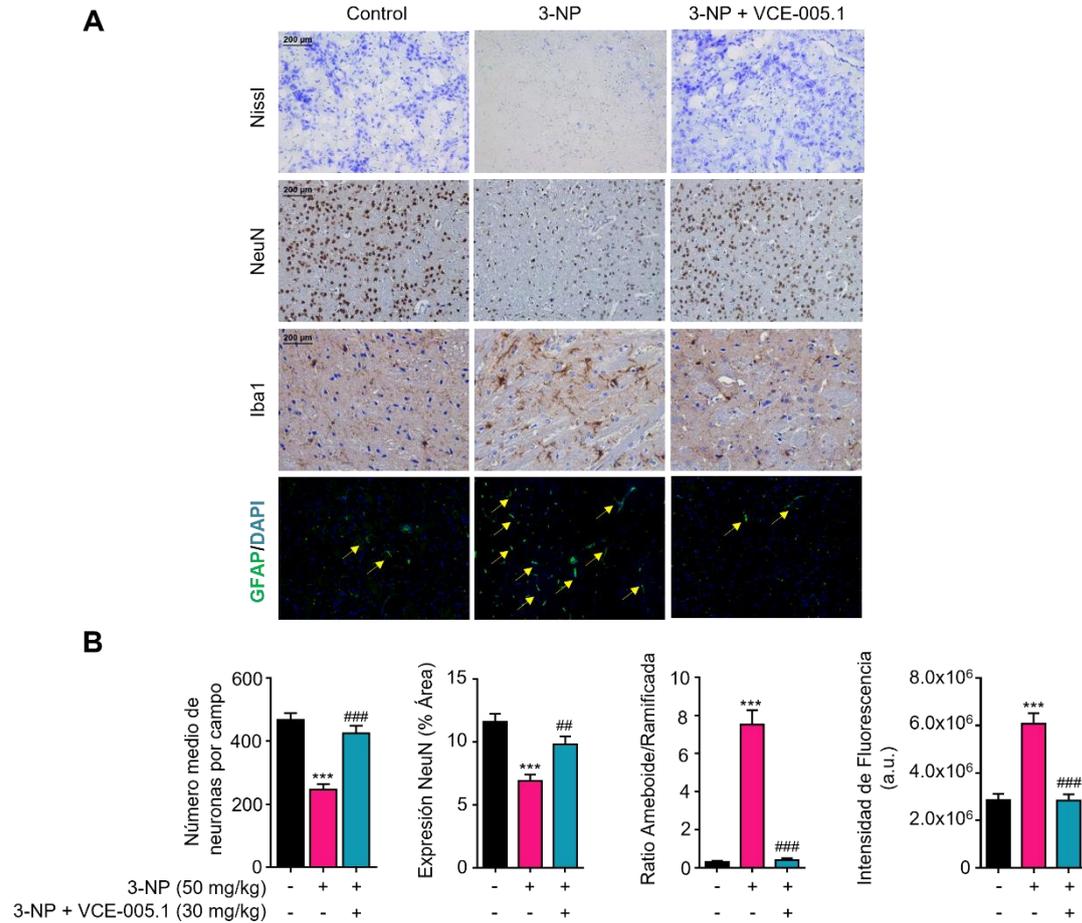


Figura 30. El compuesto VCE-005.1 es neuroprotector en ratones tratados con 3NP. **A.** Tinción de Nissl, inmunohistoquímica de NeuN e Iba-1 y marcaje por inmunofluorescencia de GFAP (fluorescencia verde) en secciones de estriado de los diferentes grupos de ratones (aumento original 20x). **B.** Las cuantificaciones de la expresión de Nissl, NeuN, Iba1 y GFAP (flechas amarillas) se realizaron con el software Image J. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n = 6$) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0,001$ 3NP frente a vehículo; ### $p < 0,001$ 3NP + VCE-005.1 vs 3NP.

Por último, también analizamos la expresión de marcadores proinflamatorios mediante qPCR en la zona del estriado. En los ratones tratados con 3-NP se observó un aumento de los niveles de ARNm de los marcadores inflamatorios *Cox2*, *iNos*, *Il1 β* e *Il6*, los cuales fueron completamente inhibidos por el tratamiento con VCE-005.1. Además, se estudiaron otros genes relacionados con el estrés oxidativo y la neuroprotección como son *Bdnf* y *Sod1*²¹¹. Ambos marcadores mejoraron en los ratones que habían sido tratados con VCE-005.1, mientras que otros como *Nqo1*, *Ucp2* y *p21* aumentaron su expresión en los ratones 3-NP y casi recuperaron sus niveles basales después del tratamiento con el VCE-005.1 (Figura 31).

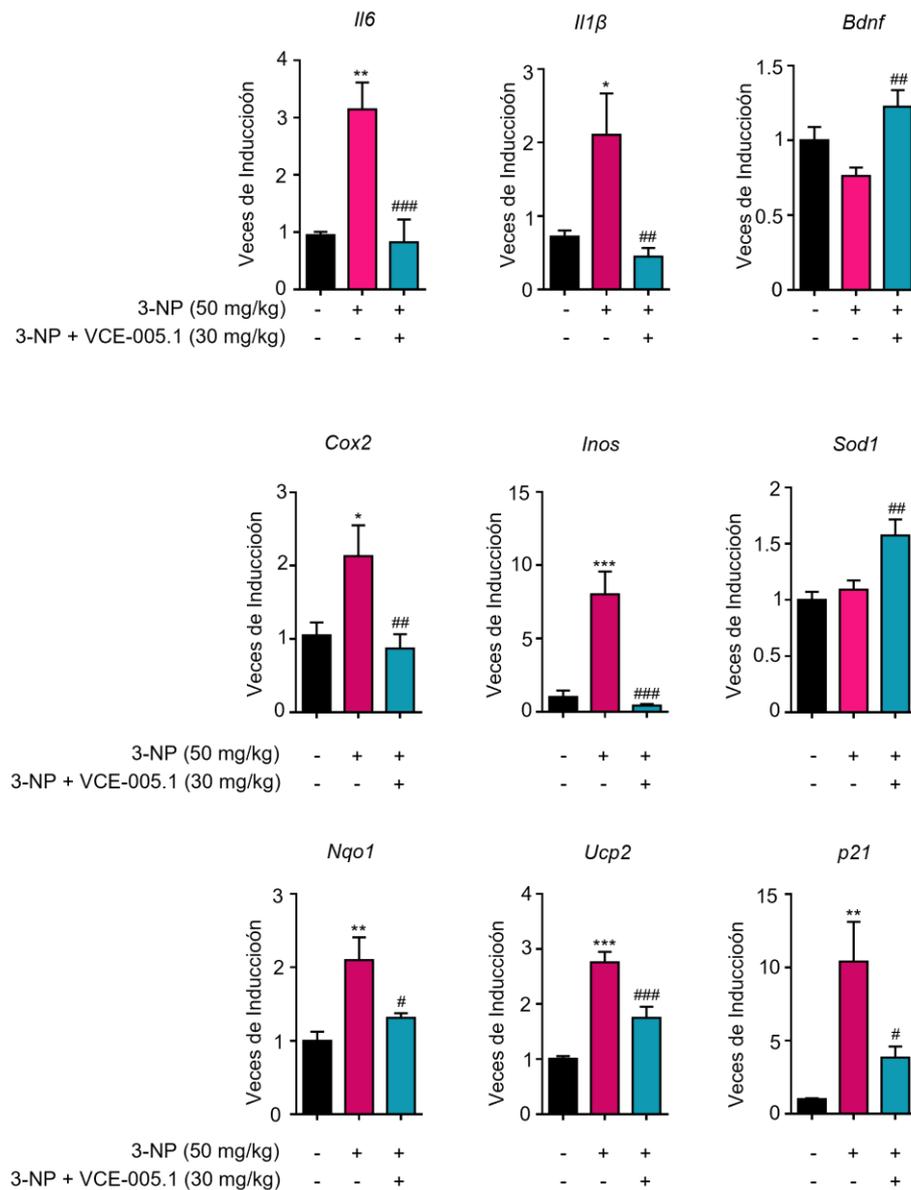


Figura 31. El tratamiento con VCE-005.1 indujo cambios en la expresión génica. La expresión génica de marcadores inflamatorios, incluidos *Il6*, *iNos*, *Cox2* e *Il1β*, se redujo significativamente en los ratones tratados con 3NP + VCE-005.1 en comparación con los ratones 3NP, mientras que la expresión de *Bdnf* y *Sod1* se vio aumentada. Marcadores de neuroprotección como *Nqo1*, *Ucp2* y *p21* también alteraron su expresión tras la administración de 3NP. Los valores se expresan como medias \pm SEM ($n = 6$) animales por grupo y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 3NP vs Vehículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ 3NP + VCE-005.1 vs 3NP.

4.5 Estudio del potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en la angiogénesis y en un modelo de Traumatismo craneal inducido (TCI) por impacto cortical controlado (ICC)

4.5.1 Efectos del compuesto VCE-005.1 en la expresión génica dependiente de HIF y en la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*

Se ha descrito que el complejo PP2A/B55 α desempeña un papel importante durante la formación de vasos sanguíneos y la restauración del oxígeno. Esto lo lleva a cabo reduciendo la actividad de la enzima PHD2 y promoviendo la supervivencia de las células endoteliales de una manera dependiente de HIF, al protegerlas contra el estrés celular y disminuyendo su apoptosis²⁰³. Estos resultados, junto con las evidencias de que HIF-1 α regula la expresión de una gran cantidad de productos génicos con actividad neuroprotectora a través de genes proangiogénicos, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2, ambos principalmente producidos por células endoteliales vasculares, nos llevó a estudiar el posible papel del compuesto VCE-005.1 en la angiogénesis.

Para ello, comenzamos investigando el efecto del compuesto sobre la expresión de genes dependientes de HIF. Con este fin, células HBMEC se trataron con VCE-005.1 durante 12 horas, y luego se analizó la expresión de 83 genes implicados en la vía de la hipoxia mediante un array de qPCR (Figura 32A). Se identificaron varios genes cuya expresión estaba aumentada más de 10 veces tras el tratamiento con el compuesto. Entre ellos encontramos a la angiopoyetina tipo 4 (*ANGPTL4*), el gen *NRDG1*, la eritropoyetina (*EPO*) y el *SLC2A1*, todos ellos involucrados en la neuroprotección. Más concretamente, la *Angptl4* modula la disfunción de la barrera hematoencefálica en el ictus isquémico²¹², *EPO* también es neuroprotector en diferentes modelos de enfermedades del SNC^{213, 214}, *NRDG1* juega un papel importante en la supervivencia de los oligodendrocitos²¹⁵ y *SLC2A1* codifica la proteína transportadora de glucosa 1 (Glut1) que juega un papel clave en la neuroprotección y la homeostasis de la microvasculatura cerebral²¹⁶. Además, el compuesto VCE-005.1 indujo claramente la expresión de *VEFG* (Figura 32B) y *EPO* (Figura 32C) de una manera dosis dependiente.

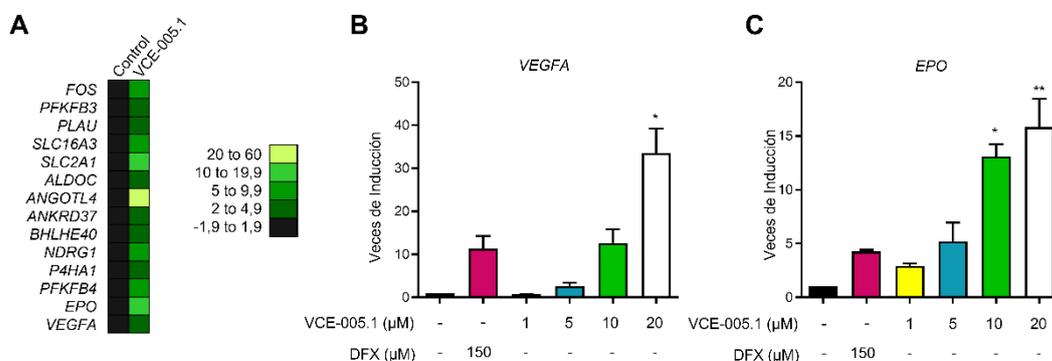


Figura 32. El compuesto VCE-005.1 induce la expresión de genes dependientes de HIF. **A.** Se estimularon células endoteliales microvasculares del cerebro humano con VCE-005.1 (10 μ M) durante 12 h y se determinó la expresión de genes implicados en la vía de

señalización de hipoxia humana mediante un array de PCR. Los heat-map muestran los genes significativamente incrementados (verdes) en las células tratadas con VCE-005.1 en comparación con el control. **B-C.** Los niveles de expresión de ARNm de los genes *VEGFA* y *EPO* respectivamente, se cuantificaron mediante qPCR en células HBMEC. Los datos representan la media \pm SD ($n = 3$) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ células tratadas con VCE-005.1 vs células no tratadas.

En cuanto a la angiogénesis, nos interesó comparar el efecto del VCE-005.1 con los inducidos por los factores de crecimiento proangiogénicos VEGF y FGF *in vitro* y también en un modelo *in vivo*. Para la aproximación *in vitro* usamos células HUVEC co-cultivadas en una monocapa de fibroblastos primarios. Los resultados obtenidos muestran que tanto el tratamiento con ambos factores de crecimiento como con el compuesto VCE-005.1 indujeron un aumento en la red de vasos endoteliales (Figura 33).

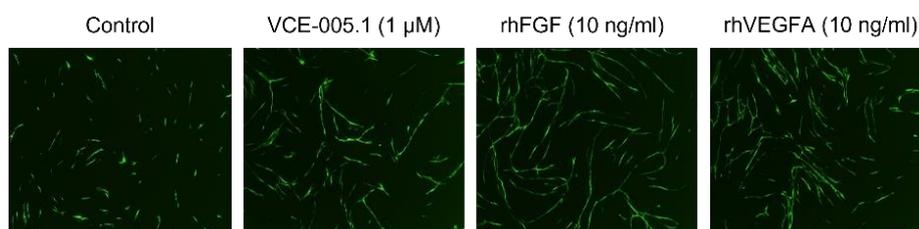


Figura 33. El compuesto VCE-005.1 induce la angiogénesis *in vitro*. Se utilizó el kit PrimeKit y se determinó la formación de vasos tras el tratamiento con rhVEGFA, rhFGF o VCE-005.1 durante 10 días. Se muestran imágenes representativas del experimento. Ampliación 4x.

Para verificar estos resultados, se realizó un modelo *in vivo* de angiogénesis basado en matrigel (Figura 34). Para ello, se inyectó matrigel el cual contenía heparina (control negativo), heparina + VEGFA + FGF (control positivo) o heparina + VCE-005.1 a 10 μ M. Esto se realizó por vía subcutánea en el costado de los ratones para luego analizar los resultados tras 10 días. Como se muestra en la Figura 34 mediante la tinción de H&E de los matrigeles así como la inmunofluorescencia de los marcadores endoteliales CD31 y α SMA, el tratamiento con el compuesto logró inducir la formación de vasos, confirmando así su efecto angiogénico *in vivo*.

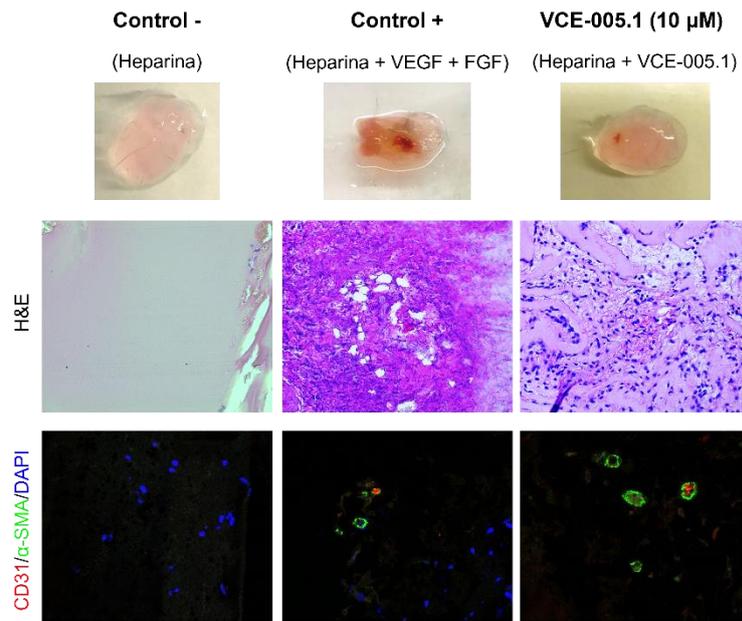


Figura 34. El compuesto VCE-005.1 induce la angiogénesis *in vivo*. Los ratones fueron inoculados con el matrigel conteniendo los distintos tratamientos y se determinó la capacidad angiogénica tras 10 días. Se muestran fotos de los matrigeles al ser extraídos, así como como cortes tras la tinción de H&E e imágenes representativas de microscopía confocal de α -SMA (verde) y CD31 (rojo). El aumento original de todas las imágenes es 20x.

En resumen, el tratamiento con el compuesto VCE-005.1 aumentó la expresión de genes neuroprotectores dependientes de HIF e indujo angiogénesis en células endoteliales vasculares y en un modelo de ratón basado en matrigel.

4.5.2 Efectos del compuesto VCE-005.1 en la sintomatología neuroconductual de un modelo de Traumatismo craneal inducido (TCI) por impacto cortical controlado (ICC)

Para confirmar la acción neuroprotectora del VCE-005.1 *in vivo*, se utilizó un modelo de traumatismo craneal inducido basado en un impacto cortical controlado. De manera resumida, el procedimiento de este modelo consiste en realizar una craneotomía entre las suturas lambda y bregma. Posteriormente se ejecuta un impacto con parámetros controlados en esta zona y luego se sutura y monitoriza a los ratones hasta su recuperación.

De esta manera se realizó un estudio a corto plazo de TCI moderado que se centró en los resultados inflamatorios, así como en la BHE. Los animales se repartieron en los siguientes grupos: grupo Sham + vehículo; grupo ICC + vehículo y grupo ICC + VCE-005.1. Los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con una dosis diaria de 30 mg/kg durante 1, 3 y 7 días consecutivos de VCE-005.1 a 30 mg/kg comenzando la administración 1 hora después del ICC.

Primero, para determinar una mejoría en el estado clínico, se realizó la prueba locomotora Rotarod. Como podemos ver en el gráfico, en comparación con los animales Sham, los ratones ICC exhibieron el peor rendimiento, mientras que los ratones tratados con VCE-005.1 mostraron una mejora significativa en la coordinación motora en los días 1 y 3 (Figura 35).

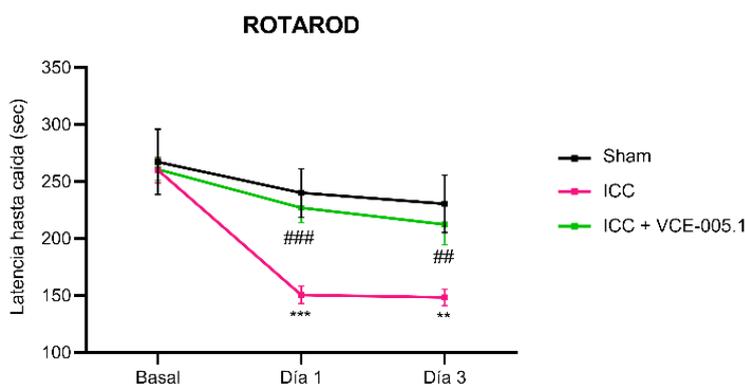


Figura 35. El compuesto VCE-005.1 mejora el rendimiento en el test Rotarod. El gráfico muestra el tiempo que permanecen los animales en el Rotarod un día antes del ICC y 1 y 3 días post daño. El tratamiento con el compuesto mejora significativamente la capacidad motora de los ratones a todos los tiempos ensayados. Los datos se muestran como media \pm SEM (n = 6 a 20 animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis two-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** p < 0,001 ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; ## p < 0,01, ### p < 0,001 ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

4.5.3 Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre la BHE

Como comentamos en la introducción, la BHE es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis cerebral, siendo en gran medida debido a las propiedades únicas de las células endoteliales cerebrales. Estas células se distinguen de las células endoteliales periféricas por la presencia de uniones intercelulares particularmente estrechas que impiden el transporte paracelular. Además, interactúan con tipos de células específicas del SNC, como astrocitos, microglía y neuronas, que juntas forman la unidad neurovascular funcional (UNF)²¹⁷.

Dado que la BHE restringe el acceso de moléculas grandes como puede ser la IgG al parénquima cerebral, esta inmunoglobulina es usada como marcador de su disrupción. Es por ello por lo que el estado de la BHE se estudió inicialmente de una manera general mediante el estudio de la extravasación de la inmunoglobulina IgG por IHC. Los resultados mostraron una clara alteración de la BHE en los animales ICC, mientras que los tratados con VCE-005.1 demostraron que el tratamiento con el compuesto fue capaz de reducir la presencia de la IgG a los 3 y 7 días (Figura 36).

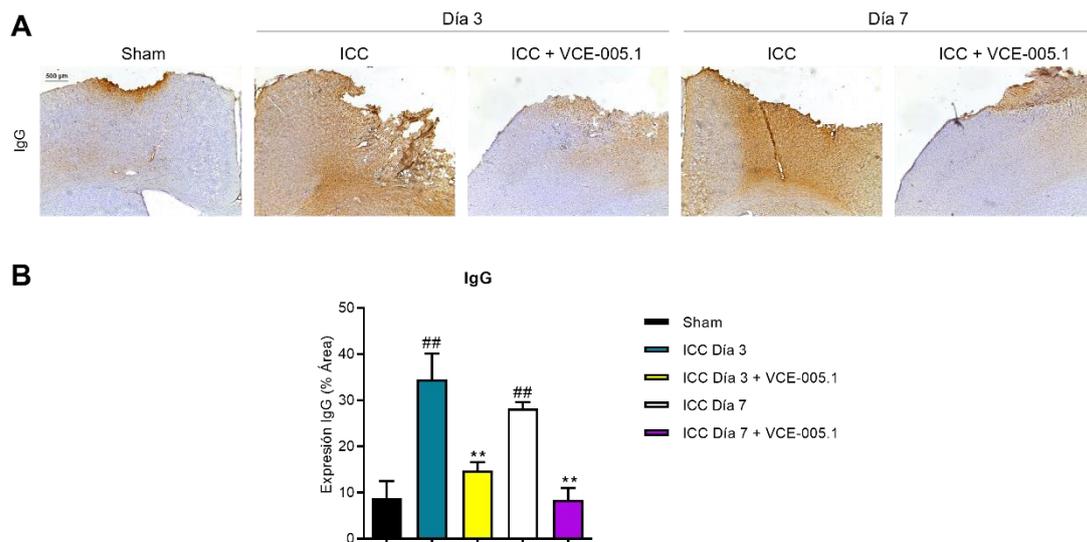


Figura 36. El compuesto VCE-005.1 previene el aumento de la permeabilidad de la BHE a IgG. **A.** Imágenes representativas de la distribución de la inmunoglobulina IgG en la zona impactada de los cerebros (aumento original 4x). **B.** Cuantificación de la expresión de IgG en el córtex. A los 3 y 7 días tras el TCI, la integridad de la BHE fue significativamente peor, sin embargo, el tratamiento con VCE-005.1 fue capaz de disminuir la permeabilidad y reducir la extravasación de la IgG al parénquima cerebral. Los datos se muestran como media \pm SEM (n = 4-7 animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. ** p < 0,01 ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; ## p < 0.01 ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

Tras ver estos resultados, decidimos estudiar en más detalle las proteínas que forman las uniones estrechas de la BHE en las células endoteliales. La Claudina 5 es la proteína de

unión estrecha transmembrana más expresada por las células endoteliales vasculares cerebrales. La organización espacial de sus hebras está determinada por la proteína scaffold zonula occludens (ZO-1), a la que está unida por un extremo y que la ancla al citoesqueleto de actina. Los modelos animales de TCI se caracterizan por la apertura de la BHE debido a una disminución en la expresión de las proteínas de unión estrecha, incluidas Claudina 5, Ocludina y ZO-1, con la posterior extravasación de proteínas séricas como la IgG²¹⁸.

Nuestros resultados muestran la reducción de los niveles de Claudina 5 en todos los tiempos estudiados en los animales ICC así como de la Zo1 a los 7 días tras el golpe. Mientras tanto, en los animales tratados con el compuesto VCE-005.1, no llegaron a disminuir los niveles de Claudina 5 y los de Zo1 incluso aumentaron con respecto al control (Sham) (Figura 37). Sin embargo, el co-marcaje con el marcador vascular CD31, nos muestra que no hay una continuidad completa en las células endoteliales, por lo menos a los tiempos estudiados.

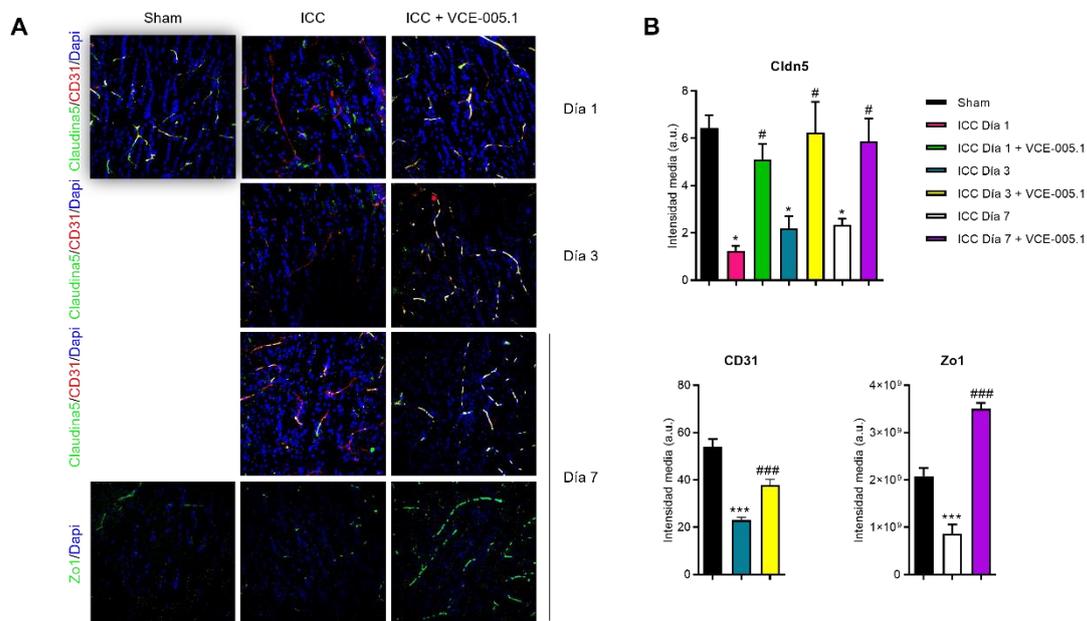


Figura 37. El compuesto VCE-005.1 aumenta la expresión de las proteínas de unión estrecha de la BHE. **A.** Imágenes de microscopía confocal representativas de la expresión de Claudina 5, CD31 y Zo1 en los distintos grupos de estudio a una magnificación de 40x. **B.** Cuantificación de la expresión de los distintos marcadores. Los datos se muestran como media \pm SEM (n = 3 animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. * p < 0,05, *** p < 0,001 ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; # p < 0,05, ### p < 0,001 ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

4.5.4 Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre la vasculogénesis.

La importancia de la recuperación del daño vascular en el tratamiento de esta patología²¹⁹ junto con los resultados positivos obtenidos en la barrera hematoencefálica y la angiogénesis *in vitro*, nos llevaron a estudiar si el compuesto podría llevar a cabo sus efectos a través de la proliferación de las células endoteliales cerebrales.

Para ello, se estudió la expresión conjunta del marcador endotelial vascular CD31 con el marcador de proliferación Ki67 en la zona pericontusional. Los resultados obtenidos indican que, tras un TCI, el número de células positivas para ambos marcadores descienden levemente, siendo solo significativa esta bajada a los 3 días. Sin embargo, tras el tratamiento con el compuesto VCE-005.1, el co-marcaje aumenta en todos los tiempos estudiados, denotando el efecto vasculogénico del compuesto también en el modelo de TCI (Figura 38).

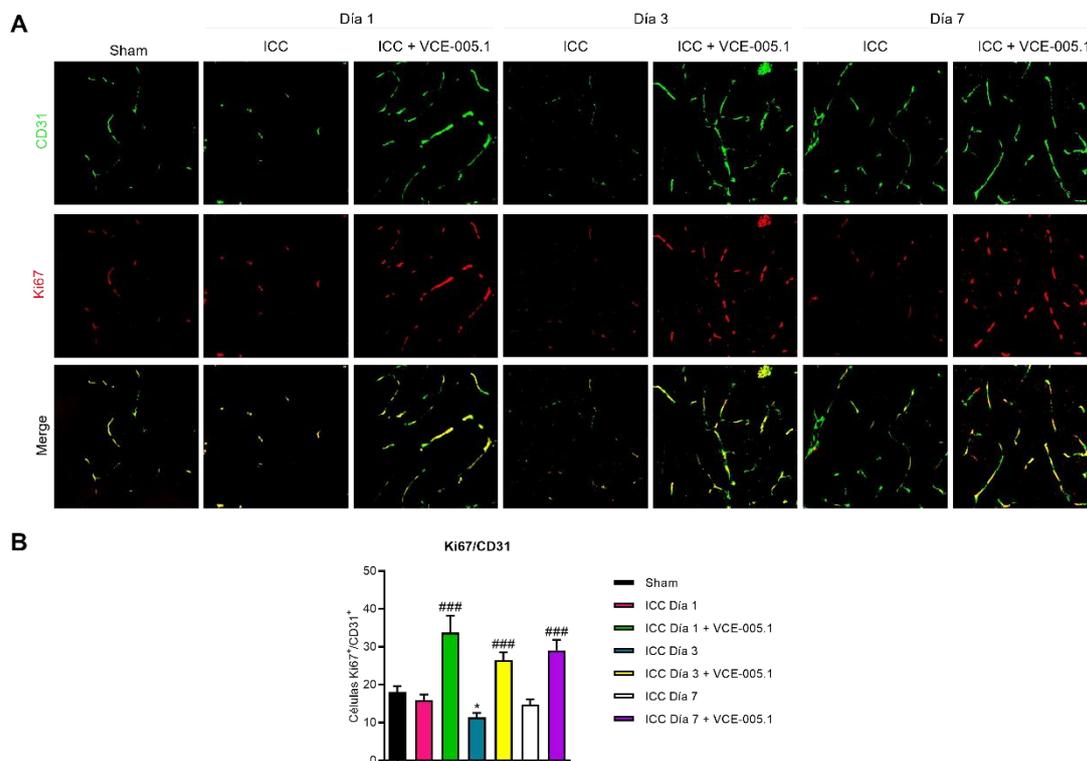


Figura 38. El compuesto VCE-005.1 aumenta la vasculogénesis tras un TCI. **A.** Imágenes de microscopía confocal representativas de la expresión individual y conjunta de CD31 (verde) y Ki67 (rojo) en los distintos grupos de estudio a una magnificación de 63x. **B.** Cuantificación del número de células Ki67+/CD31+ en el área pericontusional. Los datos se muestran como media \pm SEM (n = 3 animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. * p < 0,05 ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; ### p < 0.001 ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

4.5.5 Efectos del compuesto VCE-005.1 sobre la neuroinflamación.

El cerebro es un órgano inmunológicamente privilegiado en condiciones normales debido entre otras razones a la existencia de la BHE. Sin embargo, tras un trauma se causaría un daño directo sobre ella, dando como resultado la llegada de un gran número de células periféricas presentadoras de antígenos, así como la activación instantánea de la glía residente 220, 221.

De esta manera se iniciaría la neuroinflamación, que se define como el proceso en el cual participan conjuntamente las células inmunes residentes y periféricas del cerebro para dar lugar a la respuesta inflamatoria del SNC. Aunque la respuesta se inicia con el objetivo de

proteger al SNC de infecciones y daños, también es un mecanismo importante que induce la lesión secundaria tras el TCI. La neuroinflamación relacionada con TCI se caracteriza por la activación de la glía, el reclutamiento de neutrófilos, leucocitos y macrófagos, y el aumento de expresión de citocinas proinflamatorias en el cerebro²²².

La glía en el SNC la constituyen la microglía, los oligodendrocitos y los astrocitos, siendo todos indispensables para asegurar un estado constante de homeostasis que permita una señalización neuronal eficiente²²³.

La microglía la podemos encontrar en dos estados: en reposo y activada. La microglía activada es la responsable del reclutamiento de leucocitos periféricos en el SNC y de iniciar la activación de las células endoteliales, facilitando la extravasación de otras células inmunes a través de la BHE.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC, siendo imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis del SNC y contribuyendo a la integridad de la BHE por medio de su interacción con las células perivasculares. Los astrocitos suelen presentar un proceso patológico denominado astrogliosis reactiva en respuesta a las lesiones del SNC, lo que contribuye a la neuroinflamación.

Debido a la importancia de estos tipos celulares, decidimos estudiar su presencia en nuestro modelo de TCI. En los ratones pertenecientes a los grupos ICC pudimos distinguir el cambio de forma asociado a la microglía activada, mientras que en los tratados con el compuesto VCE-005.1 el porcentaje de estas células era inferior a todos los tiempos estudiados tras el impacto. Además, en lo que respecta a los astrocitos, pudimos observar la astrogliosis reactiva en los ratones golpeados mientras que una menor expresión del marcador GFAP es observado en aquellos animales tratados con el compuesto (Figura 39), confirmando de esta manera la mejora del estado inflamatorio del tejido.

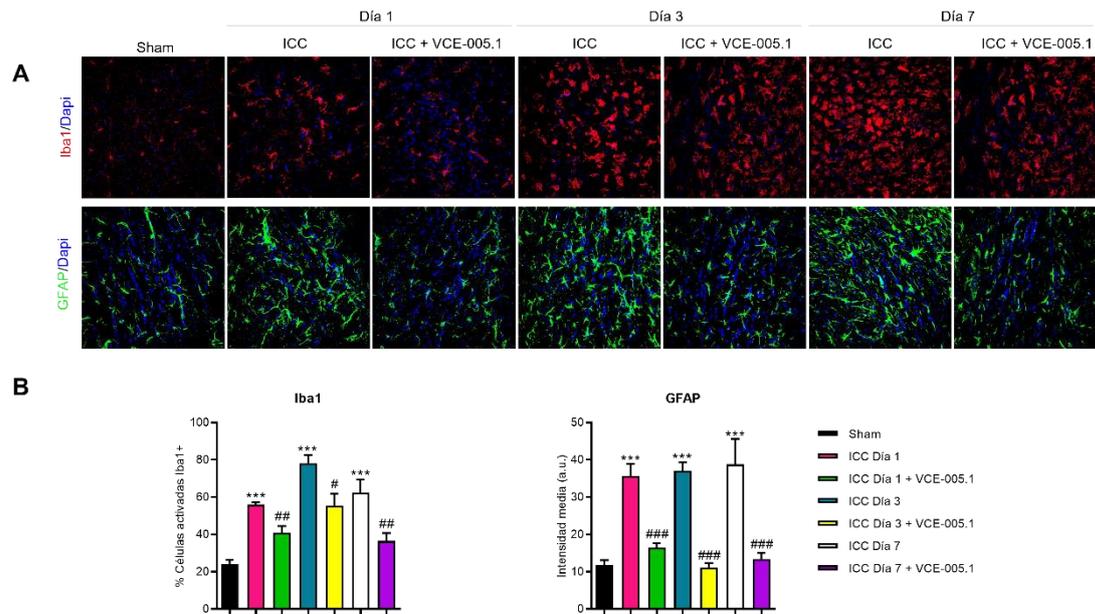


Figura 39. El compuesto VCE-005.1 disminuye la activación de la microglía y de la astrogliá en el modelo de TCI. **A.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la morfología de la microglía y de la presencia de GFAP en los distintos grupos de estudio (aumento original 40x). **B.** Cuantificación del porcentaje de activación de la microglía y la expresión de GFAP. Los datos se muestran como media \pm SEM ($n = 3-5$ animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0,001$ ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

Por otro lado, como consecuencia del daño en la BHE y de la activación de la microglía se produce una disfunción endotelial. Esto consiste en una activación de las células endoteliales que da lugar a un aumento de la permeabilidad vascular y de las interacciones endotelio-leucocitos que resultan en una inflamación sistémica. En este proceso están involucradas distintas moléculas de adhesión celular, incluida la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1) y la E-selectina²²⁴. Para evaluar este parámetro decidimos estudiar la expresión de la molécula VCAM1. Como podemos observar en la Figura 40, se produce un aumento en la expresión de esta molécula a los 3 y 7 días tras el impacto en los animales CCI, mientras que el tratamiento con el compuesto VCE-005.1 disminuye significativamente los niveles de esta proteína de adhesión celular.

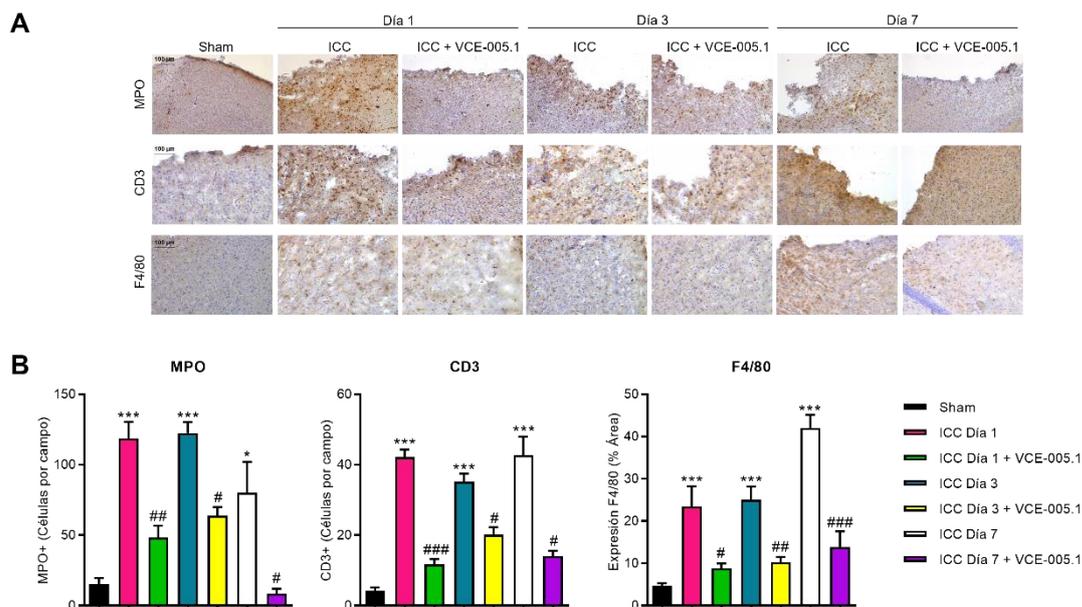


Figura 41. Efecto del VCE-005.1 sobre la infiltración de neutrófilos, linfocitos y macrófagos después de un TCI. **A.** Imágenes representativas de los distintos grupos ICC tras 1, 3 y 7 días así como los tratados con el compuesto. El aumento original de las fotos es 20x. **B.** Cuantificación de los distintos marcadores estudiados. Los datos se muestran como media \pm SEM ($n = 3$ a 7 animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc Dunnet. *** $p < 0,001$ ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

4.5.6 Efectos del VCE-005.1 sobre la apoptosis producida por TCI

La neuroinflamación se caracteriza por la activación de cascadas inflamatorias, la acumulación excesiva de células inflamatorias y el aumento de los niveles de citocinas, lo que está asociado a un aumento de la apoptosis. Estudios previos han descrito cómo la estabilización de HIF-1 α reduce la apoptosis en distintos modelos neurodegenerativos como el TCI²²⁵. Es por ello por lo que decidimos estudiar si el VCE-005.1 podría atenuar la muerte celular en nuestro modelo. Para ello, llevamos a cabo un ensayo TUNEL y nos centramos en la zona del córtex anexa al impacto. Lo que pudimos observar fue que 1 y 3 días tras el TCI hubo un aumento significativo del número de células en apoptosis en el tejido. Sin embargo, el tratamiento con el compuesto VCE-005.1 fue capaz de disminuir drásticamente este aumento (Figura 42).

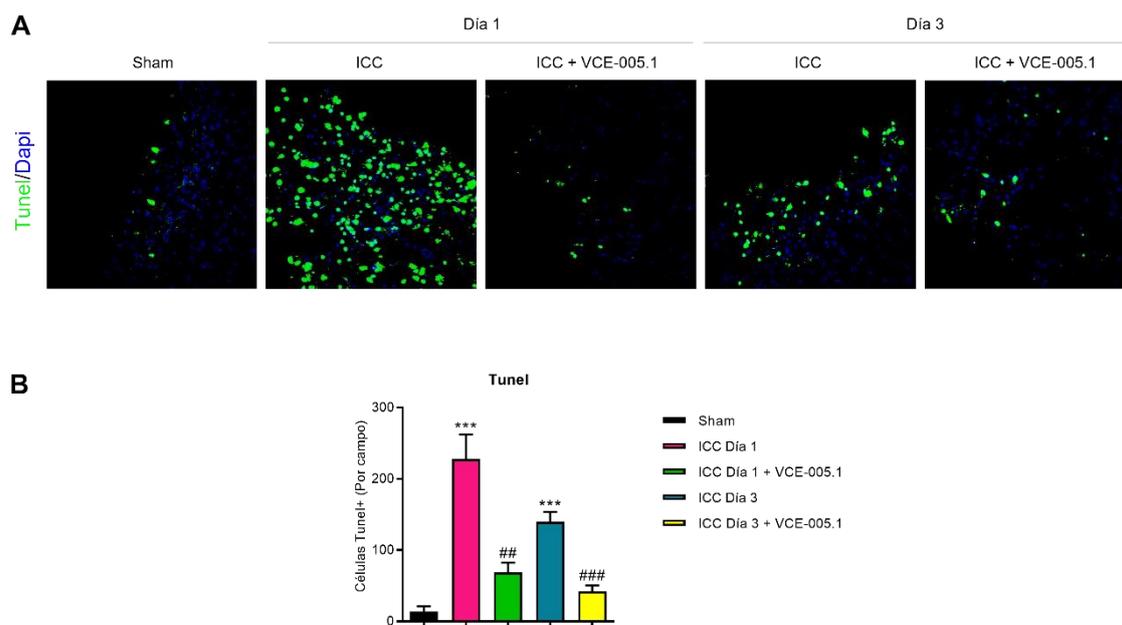


Figura 42. Efecto del tratamiento con VCE-005.1 sobre la muerte celular. **A.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas del ensayo de TUNEL (verde) tomadas con un aumento original de 40x. **B.** Cuantificación del número de células positivas para TUNEL por campo. Los datos se muestran como media \pm SEM ($n = 4-6$ animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. *** $p < 0.001$ ICC + Vehículo vs Sham + Vehículo; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ ICC + VCE-005.1 vs ICC + Vehículo.

4.5.7 Efectos del compuesto VCE-005.1 en la expresión génica de marcadores inflamatorios

Por último, analizamos la expresión de diferentes biomarcadores inflamatorios en el área pericontusional del cerebro producidos por las células inmunes.

El primer día tras el ICC, se observó un aumento en los niveles del ARNm de marcadores inflamatorios como *Il6*, *Il1 β* y *Ccl2* y de marcadores relacionados con daño en la BHE como *Mmp9* y *Timp1*, que se inhibió completamente por el tratamiento con VCE-005.1. Estos resultados también se observaron a los 3 días tras el impacto, restaurándose significativamente los niveles de estos marcadores inflamatorios y de daño con el tratamiento del compuesto. En el caso de *Mmp9*, aunque se observa una tendencia, no llega a ser significativo (Figura 43).

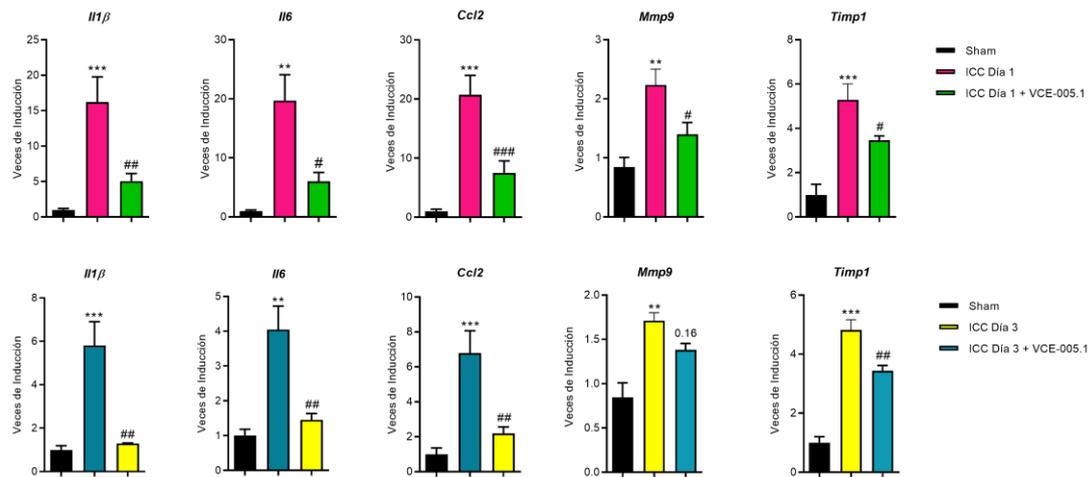


Figura 43. El tratamiento con el compuesto VCE-005.1 produjo cambios génicos en la zona pericontusional del golpe. La expresión de marcadores inflamatorios como *Il1β*, *Il6* y *Ccl2* se vio reducida significativamente 1 y 3 días después del impacto en los ratones tratados con ICC + VCE-005.1 en comparación con los ratones ICC. De igual manera, la expresión de *Mmp9* y *Timp1*, ambos marcadores de daño en la BHE, se vio aumentada y restablecida tras el tratamiento con el compuesto. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n = 5-8$ animales por grupo) y la significancia se determinó mediante un análisis one-way ANOVA seguido de la prueba post-hoc Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ICC vs Sham; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ ICC + VCE-005.1 vs ICC.

En resumen, el compuesto VCE-005.1 mejora la clínica del modelo de TCI, es capaz de proteger la BHE, previniendo la infiltración de células inmunes y, por tanto, disminuyendo las citoquinas liberadas por ellas en el tejido.

5. DISCUSIÓN

5 Discusión

5.1 Mecanismo de acción del compuesto VCE-005.1

Nuestros resultados sugieren que el VCE-005.1 no es un quelante de Fe^{2+} y que tiene la capacidad de modificar indirectamente la actividad de PHD2 sin afectar a su unión con HIF-1 α . La clara reducción de la fosforilación de la enzima PHD2 en la Ser125 obtenida en los experimentos de MS/MS, sumada a su validación utilizando un anticuerpo fosfoespecífico para la Ser125 de PHD2 indica que el VCE-005.1 reduce la defosforilación de este residuo, el cual parece estar constitutivamente fosforilado en condiciones de normoxia. Así, se ha descrito previamente que la fosforilación de la Ser125 aumenta la actividad de la PHD2 conduciendo a una mayor degradación de HIF-1 α . Además, este estado fosforilado está controlado con precisión por la quinasa P70S6K y la fosfatasa PP2A⁷⁰.

Aunque se deben realizar más estudios para aclarar cómo el VCE-005.1 es capaz de modificar la fosforilación de PHD2, encontramos que los inhibidores de la fosfatasa PP2A, LB-100 y AO así como el uso de un siRNA específico para su subunidad reguladora B55 α impedían la estabilización de HIF-1 α inducida por VCE-005.1. Este resultado es muy interesante ya que los fármacos activadores de la PP2A están siendo investigados activamente no sólo como posibles tratamientos contra el cáncer, sino también contra enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas²²⁶. Ya que la PP2A es una enzima heterotrimérica muy compleja que cataliza la eliminación selectiva de grupos fosfato de los residuos serina y treonina de las proteínas, sería importante realizar más experimentos para identificar con más precisión el mecanismo de acción del VCE-005.1. Especialmente será interesante investigar si el efecto del VCE-005.1 es específico de PP2A/B55 α o si por el contrario es capaz de interactuar con otros heterotrímeros de PP2A.

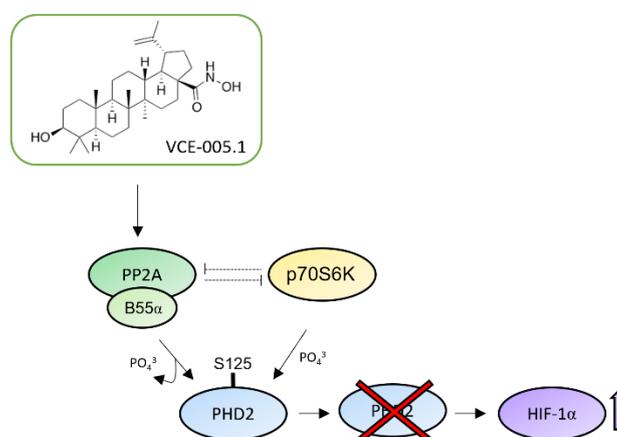


Figura 44. Esquema del mecanismo de acción del VCE-005.1.

5.2 Potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en EII

A lo largo de esta tesis se ha descrito el uso beneficioso de la ruta de HIF en distintas patologías y cómo su modulación por medio de distintas moléculas confiere un efecto protector.

El potencial de los inhibidores de las PHDs para el tratamiento de la EII se ha documentado en varios modelos *in vivo*^{131, 132, 227}, asociando sus efectos beneficiosos a una combinación de la restauración de la función de la barrera intestinal, la inhibición de la apoptosis de las células epiteliales¹³⁸, el aumento de la expresión de una batería de genes protectores de barrera específicos del epitelio a través de la vía HIF, y la estimulación de la apoptosis de neutrófilos por PHD3¹⁴⁷.

Para validar la actividad del compuesto VCE-005.1 en modelos preclínicos de EII, se utilizaron modelos murinos de inflamación y fibrosis de colon, que ejemplifican, respectivamente, la CU humana (modelo DSS) y la EC (modelo TNBS). En el modelo de TNBS, el tóxico se administró semanalmente a ratones Balb/C, induciendo una colitis crónica que cursa con inflamación y fibrosis²²⁸. Mientras que en el modelo de DSS, se utilizaron ratones C57BL/6 para estudiar la colitis, ya que en esta cepa la enfermedad aguda no tiene una recuperación espontánea, sino que progresa a fibrosis grave y crónica¹⁹⁸. Nuestros resultados mostraron que, en ambos modelos, el tratamiento oral con VCE-005.1 mejoró no solo la inflamación del colon sino también la fibrosis.

Es bien sabido que HIF puede modular las respuestas inmunes innata y adquirida y, por lo tanto, se esperaba una actividad antiinflamatoria del compuesto en ambos modelos de EII²²⁹. En ambos modelos, se observó una mejora general de los infiltrados inmunitarios, incluida una reducción del número de macrófagos (F4/80⁺) y linfocitos (CD3⁺). Además, la expresión de genes proinflamatorios inducidos en el modelo TNBS como *Ccl3* e *Il1 β* disminuyó después del tratamiento con VCE-005.1. Por el contrario, la *Il13* y su gen diana *Mrc1* aumentaron su expresión en ratones tratados con el compuesto, mientras que sus niveles permanecieron inalterados en el grupo del TNBS y en los ratones control.

Se han descrito roles contradictorios para la *Il13* y la colitis, con estudios que muestran generalmente un vínculo entre esta citocina y la fibrosis. Sin embargo, en algunos casos también describen efectos antiinflamatorios²³⁰. Por lo tanto, según describen en un trabajo con un modelo de TNBS, la *Il13* podría inducir fibrosis de una manera dependiente de TGF β ²²⁸, pero otros estudios basados en el mismo modelo de colitis sugirieron que la *Il13* podría ser beneficiosa para la colitis crónica²³¹. En este último estudio, se demostró que la mejora espontánea de la inflamación crónica es críticamente dependiente de la activación de STAT6 por *Il13*, seguida de la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa-3 β , con un cambio final

de la producción de IL17 e IL10 por las células inmunes. Nuestros resultados indican que esta recuperación espontánea se acelera mediante el tratamiento oral del compuesto VCE-005.1 en el modelo de TNBS. Alternativamente, también sería posible que el VCE-005.1 altere la señalización “downstream” de la *Il13*, lo que explicaría por qué, a pesar de los niveles elevados de esta citocina, la fibrosis se veía prevenida en el modelo de TNBS. Por ejemplo, encontramos un aumento de la expresión del gen *Mrc1*, que está asociado con el fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos M2. Sin embargo, sería necesaria investigación adicional para dilucidar el papel de los macrófagos M2 en el efecto terapéutico del compuesto VCE-005.1.

Las superficies de las mucosas intestinales están revestidas por células epiteliales que proporcionan una barrera selectiva entre las superficies biológicas, evitando la mezcla libre de material antigénico luminal con los tejidos subyacentes y el desencadenamiento de una respuesta inmunológica. En consonancia con esto, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* demostraron el efecto protector del VCE-005.1 en la integridad de la barrera intestinal mediante la medición del ensayo TEER y la inducción de genes y proteínas como *Muc2*, *Muc3*, *Itf*, *Zo-1* y *Cldn1*. Es probable que la protección mediada por VCE-005.1 en el epitelio pueda provocar una disminución de la entrada de material luminal al organismo, con menor activación del sistema inmunológico, menos inflamación y finalmente un menor desarrollo de fibrosis. Esta protección de la mucosa podría ser el resultado de mecanismos complementarios llevados a cabo por el compuesto VCE-005.1 que protejan la barrera a nivel epitelial y promuevan la cicatrización de heridas asociadas con la colitis.

A lo largo de su vida, un gran número de pacientes con enfermedad de Crohn sufre de obstrucción intestinal debida a fibrostenosis²³², siendo la cirugía el único tratamiento disponible. Nuestro estudio demuestra que el tratamiento oral con VCE-005.1 mejora en gran medida, tanto en ratones tratados con TNBS como DSS, el aumento de marcadores relacionados con la fibrosis a nivel de ARN, disminuyendo la expresión de genes como *Colla2*, *Col3a1*, *Tnc*, *Timp1*, *Mmp3* y *Mmp8*, disminuyendo también a nivel proteico la expresión de colágeno, TNC y α -SMA. Estos efectos podrían ser el resultado de un estado inflamatorio reducido asociado a una mejora en la integridad de la barrera epitelial y al efecto producido por la *Il13*. El compuesto VCE-005.1 podría disminuir la fibrosis en el tejido del colon actuando a través de diferentes vías que eventualmente induzcan una mejora general de los diferentes parámetros de la enfermedad. Es importante mencionar que, en ambos modelos de colitis, el tratamiento con VCE-005.1 disminuyó significativamente los niveles de *Tnc*, una proteína no solo relacionada con la fibrosis sino también con el cáncer y la metástasis^{233, 234}. En particular, se ha establecido que los pacientes con EII tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal o cáncer colorrectal asociado a colitis^{123, 235}. Además, varios estudios también han informado que un incremento en la expresión de *Tnc* está presente en pacientes

con EII y cáncer de colon²³⁶, lo que sugiere que la reducción de sus niveles mediada por VCE-005.1 podría ser potencialmente beneficiosa también en otros aspectos de la enfermedad no abordados en este estudio.

La baja biodisponibilidad oral del VCE-005.1 formulado sugiere una importante excreción y acumulación fecal en el colon. Sin embargo, la falta de efecto de VCE-005.1 administrado por vía intrarrectal indica que el compuesto o bien es degradado por el microbiota, o está actuando a nivel sistémico. Curiosamente, actualmente se están desarrollando varias moléculas pequeñas que actúan a nivel sistémico para el tratamiento oral de la EII²³⁷, como el AJM300, un antagonista oral de la integrina $\alpha 4$, que reduce la inflamación al bloquear el tráfico de leucocitos²³⁸. Aún no conocemos los tejidos diana exactos involucrados en la actividad sistémica del VCE-005.1, siendo los efectos “off-target” los principales inconvenientes que enfrentan los candidatos a fármacos con actividad sistémica^{196, 239}. Por ello, se testó el VCE-005.1 en un panel de 68 posibles dianas farmacológicas, ninguna de las cuales se vio afectada a concentraciones terapéuticas. Esto, junto con la falta de actividad mutagénica, sugiere que el VCE-005.1 puede tener un perfil seguro para el desarrollo farmacológico.

En resumen, el derivado hipoximimético triterpenoide VCE-005.1 podría brindar protección en las fases crónicas de la inflamación y fibrosis de la mucosa en dos modelos murinos diferentes de EII, mejorando la fibrosis y la inflamación por medio de la reducción del número de macrófagos y linfocitos, y también induciendo o reprimiendo selectivamente la expresión de varios genes implicados en el mantenimiento y la inflamación de los tejidos. Estas observaciones asociadas con un perfil farmacocinético y toxicológico prometedor podrían indicar que el VCE-005.1 sería un buen candidato para su desarrollo adicional en el tratamiento de la fibrosis del colon asociada a la EII.

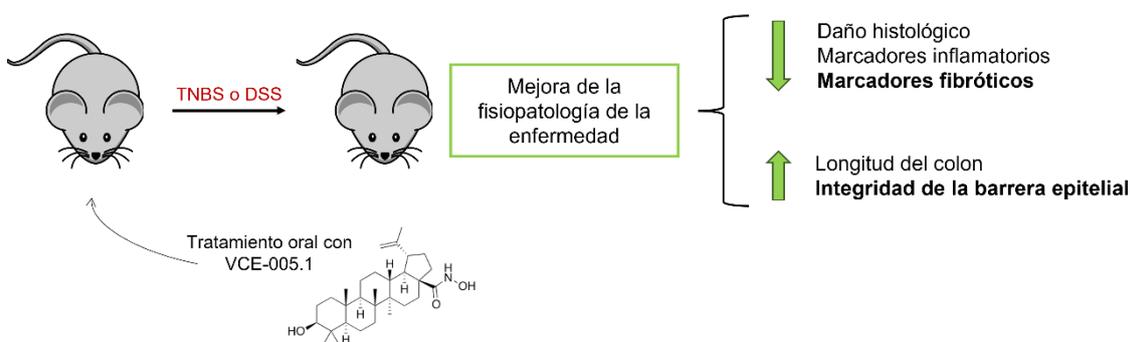


Figura 45. Esquema de la acción del VCE-005.1 sobre los modelos de EII.

5.3 Potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en EH

Las enfermedades neurodegenerativas como la EH se caracterizan por un deterioro progresivo de la estructura y función del cerebro. Su incidencia ha aumentado dando lugar a un importante problema de salud pública que necesita de nuevos tratamientos. Diversos estudios indican que la activación leve de HIF-1 α (pre-acondicionamiento hipóxico) protege al cerebro¹⁵³ contra varios tipos de lesiones como las ROS²⁴⁰ y la inflamación²⁴¹ a través de la inducción de mecanismos adaptativos que implican la modulación de transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas y factores angiogénicos. Además, se ha demostrado que el aumento de Bnip3 mediado por HIF-1 α favorece la neuroprotección activando la vía de la autofagia²⁴².

HIF-1 α también regula al alza una plétora de genes que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la eritropoyetina, ambos con actividad neuroprotectora en diferentes modelos animales de enfermedades neurológicas. Aunque los niveles altos de VEGF se encuentran significativamente aumentados en pacientes con HD en comparación con los controles²⁴³, y hay evidencia de que VEGF causa disrupción de la BHE, otros trabajos indican que tiene efectos neurotróficos, ya que estimula el crecimiento axonal y aumenta la supervivencia de las neuronas en diferentes regiones del cerebro, y también protege a las células del hipocampo de la muerte inducida por la escasez de suero²⁴⁴. Además, la inhibición de las PHDs protege a las neuronas corticales de la citotoxicidad inducida por 3-NP, lo que se correlaciona con una mayor expresión de VEGF²⁴⁵. Además, las dosis bajas de VEGF165 son neuroprotectores en modelos *in vitro* e *in vivo* de EH causada por la sobreexpresión de huntingtina mutada²⁴⁶.

El ácido betulínico es un compuesto bioactivo pleiotrópico que se ha descrito que actúa sobre diferentes dianas moleculares que median la neuroprotección y la actividad antiinflamatoria. Es probable que distintos farmacóforos en la molécula de AB sean responsables de la actividad sobre diferentes dianas y, por lo tanto, el VCE-005.1 retendría algunas de las actividades atribuidas al AB. Así, uno de los posibles mecanismos a partir de los cuales el VCE-005.1 podría realizar sus acciones sería la disminución de la respuesta inflamatoria.

Varios estudios indican que la activación del sistema inmunológico y una respuesta inmunitaria alterada son evidentes incluso en la etapa pre-sintomatológica de la enfermedad de Huntington²⁴⁷. De hecho, la microglía activada y los astrocitos reactivos contribuyen a la muerte neural en la patología de la EH²⁴⁸. El análisis inmunohistoquímico del cuerpo estriado de ratones tratados con 3-NP mostró que el tratamiento con VCE-005.1 redujo la expresión de GFAP, el principal biomarcador de astrogliosis reactiva²⁴⁹. Además, la microglía activada, que está claramente presente en los ratones tratados con 3-NP, pasó a un estado de reposo cuando

se trató con el compuesto VCE-005.1. Estos resultados concuerdan con la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias (*Il1β*, *Il6*, *iNos* y *Cox2*) observada por RT-PCR, lo que sugiere que el VCE-005.1 podría reducir la cascada de citocinas proinflamatorias inducida por la microglía activada y la astrogliosis²⁵⁰. Además, también investigamos los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (*Bdnf*), un factor crítico de supervivencia para las neuronas estriatales que mueren en la EH²⁵¹. Los resultados mostraron una ligera disminución en su nivel después de la administración de 3-NP tal y como había sido descrito previamente, pero hubo un aumento significativo en los ratones tratados con el compuesto VCE-005.1, lo que sugiere otro mecanismo por el cual VCE-005.1 podría inducir neuroprotección.

Por último, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial se han relacionado con trastornos neurodegenerativos, incluida la EH²⁵². En estudios previos se indica que los inhibidores de las PHDs protegen contra la citotoxicidad inducida por la toxina mitocondrial 3-NP a las células del estriado que portan una forma mutada de la proteína huntingtina. Nuestros resultados corroboran estas publicaciones, mostrando una protección notable frente al 3-NP en las células STHdh^{Q111/Q111} tratadas con VCE-005.1 desde la concentración más baja (1 μM). En el modelo animal, se estudiaron genes dependientes de HIF-1α implicados en respuestas al estrés con efectos neuroprotectores. Las expresiones de los genes *Nqo1*, *p21* y *Ucp2* aumentaron en los ratones tratados con 3-NP, lo que indica una situación de estrés. Sin embargo, una disminución en el nivel de estos genes después del tratamiento con VCE-005.1 valida el hecho de que nuestro compuesto producía acciones neuroprotectoras.

En resumen, el compuesto VCE-005.1 proporcionó neuroprotección en un modelo de ratón de degeneración estriatal inducida por 3-NP, mejorando los síntomas clínicos y las defensas antioxidantes en el cerebro, previniendo la pérdida neuronal, disminuyendo la astrogliosis reactiva y la activación microglial y disminuyendo la expresión de marcadores proinflamatorios. Estos resultados indicaron que el VCE-005.1 tiene el potencial para un mayor desarrollo farmacológico como fármaco candidato para el tratamiento de la EH.

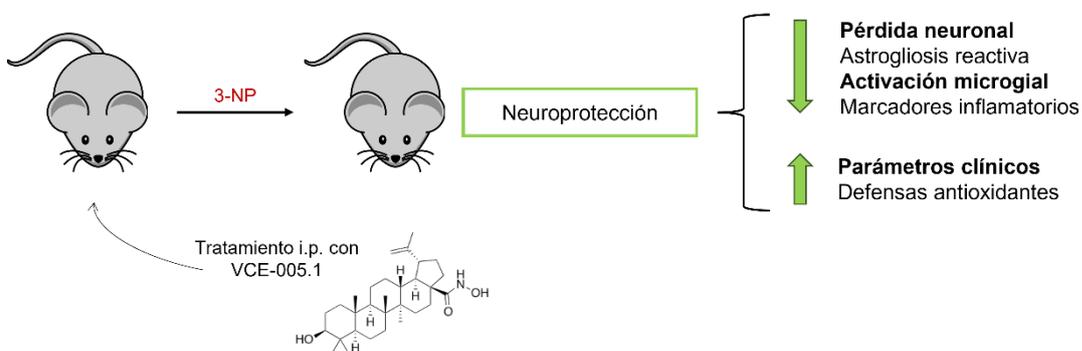


Figura 46. Esquema de la acción del VCE-005.1 sobre un modelo de EH.

5.4 Potencial terapéutico del compuesto VCE-005.1 en TCI

Los traumatismos cerebrales son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Lamentablemente, los ensayos clínicos llevados a cabo para esta patología con moléculas neuroprotectoras no han demostrado tener efectos beneficiosos, por lo que actualmente se está abordando el problema con tratamientos que no solo promuevan la reparación y regeneración del tejido cerebral lesionado, sino también su recuperación funcional a través de estrategias que prevengan el daño de la barrera hematoencefálica (BHE) y favorezcan la angiogénesis²⁵³. Dado que la ruta de HIF regula positivamente este proceso, decidimos estudiar si nuestro compuesto VCE-005.1 era capaz de inducirlo. Los resultados obtenidos *in vitro* muestran cómo el tratamiento con el compuesto es capaz de inducir la expresión de genes de la ruta de la hipoxia en células endoteliales microvasculares de cerebro con carácter neuroprotector como *ANGPTL4*, *NRDG1*, *EPO* y *VEGFA*. Además, en el ensayo de formación de túbulos en las células HUVEC, vimos cómo nuestro compuesto era capaz de igualar la capacidad angiogénica del VEGF y del FGF, resultados que se confirmaron al hacer el modelo animal de angiogénesis basado en implantes de matrigel. En este experimento también observamos cómo la adición del VCE-005.1 al matrigel fue suficiente para producir la generación de vasos sanguíneos.

Para estudiar el efecto terapéutico del compuesto VCE-005.1 se llevó a cabo un modelo animal de traumatismo cerebral inducido por medio de un impacto cortical controlado. Este tipo de modelo animal es ampliamente usado en la literatura debido a su elevada reproducibilidad y caracterización²⁵⁴. Tras ser realizado el impacto, a los animales se les administró el compuesto diariamente de manera i.p. a una concentración de 30 mg/kg y se evaluaron distintos parámetros que informan de la progresión de la enfermedad. Después de un traumatismo cerebral, alrededor del 30 % de los pacientes sufren déficits motores que limitan las actividades que llevan a cabo durante su vida diaria²⁵⁵. Por ello, como evaluación clínica, se estudió la disfunción motora realizando la prueba Rota-rod, ya que es la más sensible y eficiente para evaluar el deterioro motor producido por una lesión cerebral²⁵⁶. De esta manera, pudimos ver que tanto a las 24 h como a las 72 h después del daño, los ratones tratados con VCE-005.1 realizaban significativamente mejor la prueba que los dañados sin tratamiento.

A la vista de estos resultados positivos, pasamos a estudiar el efecto del compuesto VCE-005.1 sobre la BHE. Aunque trabajos previos han descrito el efecto beneficioso de PHDi como el DMOG¹⁸⁶ y el DFX²²⁵ como moduladores de HIF-1 α en modelos de TCI a través de la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis, ninguno estudia los efectos sobre la integridad de la barrera hematoencefálica, la cual, como ya hemos mencionado con anterioridad, es de crucial importancia. Su disrupción es un punto clave en la patofisiología del TCI e involucra

directamente a las proteínas de unión estrecha²⁵⁷. En nuestro estudio hemos demostrado cómo la administración del compuesto VCE-005.1 mejora la integridad de la BHE por medio de una disminución en la infiltración de IgG y una recuperación de la expresión primero de la Claudina 5 y posteriormente de la proteína Zo1, ambas en las células endoteliales cerebrales. Asimismo, el tratamiento con el compuesto indujo un aumento en la proliferación de las células endoteliales vasculares. Un estudio reciente relaciona la estabilización de HIF-1 α por medio de la inhibición de la PHD2 por la PP2A/B55 α con una disminución en la apoptosis de las células endoteliales²⁰³, lo que podría explicar por qué nuestro compuesto actúa favorablemente sobre estas células, mejorando la integridad de la BHE e induciendo la vasculogénesis. De hecho, también hemos visto que el compuesto reduce la apoptosis en comparación con el grupo de animales ICC.

La mejora en la integridad de la barrera hematoencefálica se vio reflejada en una reducción de la inflamación observada en el área pericontusional al golpe. Está descrito que la activación temprana de la microglía y astrogliosis después de un traumatismo cerebral puede contribuir a la restauración de la homeostasis en el cerebro^{258, 259}. Sin embargo, si esta activación se convierte en crónica, las células liberarían moléculas proinflamatorias que contribuirían a un mayor daño tisular y, finalmente, neurodegeneración^{260, 261}. En nuestros resultados podemos ver cómo el tratamiento con el compuesto VCE-005.1 disminuye el porcentaje de microglía activada en todos los tiempos estudiados, así como una disminución de la astrogliosis reactiva, demostrando una menor neuroinflamación.

Las citocinas proinflamatorias producidas por las células gliales tienen la capacidad de activar las células endoteliales e inducir la expresión de moléculas de adhesión como VCAM1, la cual media la interacción leucocitos-endotelio para su posterior trans migración a través de la BHE hacia el parénquima cerebral²⁶⁶. El estudio de este marcador y de las células inmunes periféricas reclutadas (linfocitos, macrófagos y neutrófilos) confirmó el efecto antiinflamatorio del compuesto VCE-005.1 en comparación con los animales ICC, los cuales tenían una mayor infiltración en la zona de la lesión. Finalmente, estudiamos por qPCR distintos marcadores asociados a inflamación (*Il6*, *Il1 β* y *Ccl2*) y a daño en la BHE (*Mmp9* y *Timp1*). Los resultados obtenidos concuerdan con los observados por microscopía, un marcado carácter inflamado en los animales ICC y una clara disminución tras el tratamiento con el compuesto VCE-005.1.

Finalmente, creemos que la actividad neuroprotectora observada no depende exclusivamente de la activación de HIF. Esto se debe a que el complejo PP2A/B55 α se expresa en gran medida en el cerebro, donde se han descrito otros sustratos para esta fosfatasa. Por ejemplo, se ha demostrado que B55 α interactúa con la proteína Tau induciendo su desfosforilación y previniendo las agregaciones aberrantes, estando descrito que la pérdida de

la expresión y función de B55 α es un mecanismo patogénico importante en las tauopatías²⁶². Además, la fosforilación de tau también ocurre en condiciones de hipoxia cerebral y tras un TCI²⁶³⁻²⁶⁵. Por lo tanto, es posible que el compuesto VCE-005.1 ejerza sus efectos beneficiosos en nuestro modelo actuando sobre diferentes vías de señalización. Además, no podemos dejar de lado que el compuesto pueda conservar otras actividades biológicas importantes atribuidas al ácido betulínico como la actividad antiinflamatoria, por lo que se necesitan más investigaciones para comprender con más detalle las distintas rutas implicadas en el mecanismo de acción del VCE-005.1.

Como conclusión, podemos decir que el compuesto VCE-005.1 es capaz de inducir la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* y mejora la coordinación motora en un modelo de TCI, así como la integridad de la BHE. Esta neuroprotección a nivel de BHE podría ser la responsable de una disminución en la activación de la glía residente, así como del reclutamiento de células inmunes periféricas y sus citoquinas asociadas. Todo ello conllevaría una menor inflamación y apoptosis del tejido cerebral, mejorando así el desarrollo de la enfermedad. Estos resultados junto con los EH ponen de manifiesto el efecto neuroprotector del compuesto VCE-005.1 y sus posibles efectos beneficiosos para estas y otras enfermedades neurodegenerativas.

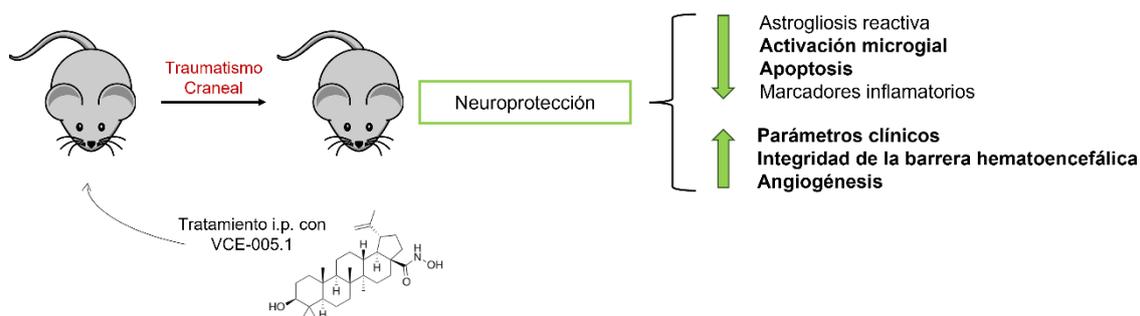


Figura 47. Esquema de la acción del VCE-005.1 en un modelo de TCI.

6. CONCLUSIONES

6 Conclusiones

1. El derivado hidroxamato del ácido betulínico denominado VCE-005.1 posee un perfil metabólico y toxicológico favorable para su desarrollo farmacológico.
2. El VCE-005.1 se absorbe rápidamente por vía oral y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.
3. El VCE-005.1 estabiliza al factor de transcripción HIF-1 α a través de la desfosforilación de la S125 de la PHD2 por medio de la modulación del complejo PP2A/B55 α .
4. El VCE-005.1 disminuye la inflamación y la fibrosis del colon en modelos de EII a través de la protección de la barrera intestinal.
5. El VCE-005.1 induce angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*.
6. El VCE-005.1 tiene efecto neuroprotector en un modelo de enfermedad de Huntington inducida por 3-NP.
7. El VCE-005.1 previene la disrupción de la barrera hematoencefálica tras el traumatismo craneal.
8. El VCE-005.1 mejora la inflamación y tiene efecto neuroprotector en un modelo de Traumatismo craneal inducido por impacto cortical controlado.

7. BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. NA JCF, Pirson L, Edelberg H, L MM, Loira-Pastoriza C, Preat V, et al. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules*. 2017;22(3). Epub 2017/03/10.
2. Sheng H, Sun H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Natural product reports*. 2011;28(3):543-93. Epub 2011/02/04.
3. Jager S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*. 2009;14(6):2016-31. Epub 2009/06/11.
4. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Natural product reports*. 2012;29(7):780-818. Epub 2012/05/18.
5. Siddique HR, Saleem M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life sciences*. 2011;88(7-8):285-93. Epub 2010/12/02.
6. Szakiel A, Paczkowski C, Pensec F, Bertsch C. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. 2012;11(2-3):263-84. Epub 2013/03/23.
7. Zhang W, Men X, Lei P. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2014;10 Suppl 1:14-9. Epub 2014/09/11.
8. Laszczyk MN. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta medica*. 2009;75(15):1549-60. Epub 2009/09/11.
9. Xu GB, Xiao YH, Zhang QY, Zhou M, Liao SG. Hepatoprotective natural triterpenoids. *European journal of medicinal chemistry*. 2018;145:691-716. Epub 2018/01/23.
10. Hussain Shaik A, Rasool SN, Abdul Kareem M, Krushna GS, Akhtar PM, Devi KL. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *Journal of medicinal food*. 2012;15(8):741-6. Epub 2012/08/01.
11. Wu HF, Morris-Natschke SL, Xu XD, Yang MH, Cheng YY, Yu SS, et al. Recent advances in natural anti-HIV triterpenoids and analogs. *Medicinal research reviews*. 2020;40(6):2339-85. Epub 2020/07/16.
12. Nzogong RT, Ndjateu FST, Ekom SE, Fosso JM, Awouafack MD, Tene M, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of triterpenoid and phenolic derivatives from two Cameroonian Melastomataceae plants: *Dissotis senegambiensis* and *Amphiblemma monticola*. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):159. Epub 2018/05/18.
13. Isah MB, Ibrahim MA, Mohammed A, Aliyu AB, Masola B, Coetzer TH. A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases. *Parasitology*. 2016;143(10):1219-31. Epub 2016/06/01.
14. Yang N, Tang Q, Qin W, Li Z, Wang D, Zhang W, et al. Treatment of obesity-related inflammation with a novel synthetic pentacyclic oleanane triterpenoids via modulation of macrophage polarization. *EBioMedicine*. 2019;45:473-86. Epub 2019/07/10.
15. Mabhida SE, Dlodla PV, Johnson R, Ndlovu M, Louw J, Opoku AR, et al. Protective effect of triterpenes against diabetes-induced beta-cell damage: An overview of in vitro and in vivo studies. *Pharmacological research*. 2018;137:179-92. Epub 2018/10/14.
16. Piotr R, Teresa B-K. Natural Triterpenoids and their Derivatives with Pharmacological Activity Against Neurodegenerative Disorders. *Mini-reviews in organic chemistry*. 2014;11(3):307-15.
17. Csuk R. Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008-2013). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2014;24(8):913-23. Epub 2014/06/10.
18. Mlala S, Oyedeji AO, Gondwe M, Oyedeji OO. Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. *Molecules*. 2019;24(15). Epub 2019/08/01.
19. Castro MJ, Careaga VP, Sacca PA, Faraoni MB, Murray AP, Calvo JC. Lupane Triterpenoids and New Derivatives as Antiproliferative Agents Against Prostate Cancer Cells. *Anticancer research*. 2019;39(7):3835-45. Epub 2019/07/03.

20. Salvador JA, Moreira VM, Goncalves BM, Leal AS, Jing Y. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Natural product reports*. 2012;29(12):1463-79. Epub 2012/10/11.
21. Sporn MB, Liby KT, Yore MM, Fu L, Lopchuk JM, Gribble GW. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *Journal of natural products*. 2011;74(3):537-45. Epub 2011/02/12.
22. Peron G, Marzaro G, Dall'Acqua S. Known Triterpenes and their Derivatives as Scaffolds for the Development of New Therapeutic Agents for Cancer. *Current medicinal chemistry*. 2018;25(10):1259-69. Epub 2017/08/19.
23. Borella R, Forti L, Gibellini L, De Gaetano A, De Biasi S, Nasi M, et al. Synthesis and Anticancer Activity of CDDO and CDDO-Me, Two Derivatives of Natural Triterpenoids. *Molecules*. 2019;24(22). Epub 2019/11/27.
24. Chin MP, Wrolstad D, Bakris GL, Chertow GM, de Zeeuw D, Goldsberry A, et al. Risk factors for heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *Journal of cardiac failure*. 2014;20(12):953-8. Epub 2014/10/14.
25. Chin MP, Bakris GL, Block GA, Chertow GM, Goldsberry A, Inker LA, et al. Bardoxolone Methyl Improves Kidney Function in Patients with Chronic Kidney Disease Stage 4 and Type 2 Diabetes: Post-Hoc Analyses from Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes Study. *American journal of nephrology*. 2018;47(1):40-7. Epub 2018/02/07.
26. Rios JL, Manes S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta medica*. 2018;84(1):8-19. Epub 2017/12/05.
27. Godugu C, Patel AR, Doddapaneni R, Somagoni J, Singh M. Approaches to improve the oral bioavailability and effects of novel anticancer drugs berberine and betulinic acid. *PloS one*. 2014;9(3):e89919. Epub 2014/03/13.
28. Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature medicine*. 1995;1(10):1046-51. Epub 1995/10/01.
29. Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression (Review). *Molecular medicine reports*. 2016;14(5):4489-95. Epub 2016/10/26.
30. Zhang DM, Xu HG, Wang L, Li YJ, Sun PH, Wu XM, et al. Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Medicinal research reviews*. 2015;35(6):1127-55. Epub 2015/06/03.
31. Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2000;114(5):935-40. Epub 2000/04/20.
32. Selzer E, Thallinger C, Hoeller C, Oberkleiner P, Wacheck V, Pehamberger H, et al. Betulinic acid-induced Mcl-1 expression in human melanoma--mode of action and functional significance. *Mol Med*. 2002;8(12):877-84. Epub 2003/02/28.
33. Kim KD, Jung HY, Ryu HG, Kim B, Jeon J, Yoo HY, et al. Betulinic acid inhibits high-fat diet-induced obesity and improves energy balance by activating AMPK. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2019;29(4):409-20. Epub 2019/02/26.
34. Jiao S, Zhu H, He P, Teng J. Betulinic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2016;84:1533-7. Epub 2016/11/24.
35. Wang D, Chen P, Chen L, Zeng F, Zang R, Liu H, et al. Betulinic acid protects the neuronal damage in newborn rats from isoflurane-induced apoptosis in the developing brain by blocking FASL-FAS signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;95:1631-5. Epub 2017/09/28.
36. Kaundal M, Zameer S, Najmi AK, Parvez S, Akhtar M. Betulinic acid, a natural PDE inhibitor restores hippocampal cAMP/cGMP and BDNF, improve cerebral blood flow and recover memory deficits in permanent BCCAO induced vascular dementia in rats. *European journal of pharmacology*. 2018;832:56-66. Epub 2018/05/21.

37. Li C, Zhang C, Zhou H, Feng Y, Tang F, Hoi MPM, et al. Inhibitory Effects of Betulinic Acid on LPS-Induced Neuroinflammation Involve M2 Microglial Polarization via CaMKK β -Dependent AMPK Activation. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2018;11:98. Epub 2018/04/19.
38. Aiken C, Chen CH. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends in molecular medicine*. 2005;11(1):31-6. Epub 2005/01/15.
39. Heidary Navid M, Laszczyk-Lauer MN, Reichling J, Schnitzler P. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2014;21(11):1273-80. Epub 2014/08/31.
40. Yao D, Li H, Gou Y, Zhang H, Vlessidis AG, Zhou H, et al. Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. *The FEBS journal*. 2009;276(9):2599-614. Epub 2009/04/08.
41. Li J, Goto M, Yang X, Morris-Natschke SL, Huang L, Chen CH, et al. Fluorinated betulinic acid derivatives and evaluation of their anti-HIV activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016;26(1):68-71. Epub 2015/11/26.
42. Smith PF, Ogundele A, Forrest A, Wilton J, Salzwedel K, Doto J, et al. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-o-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(10):3574-81. Epub 2007/07/20.
43. Margot NA, Gibbs CS, Miller MD. Phenotypic susceptibility to bevirimat in isolates from HIV-1-infected patients without prior exposure to bevirimat. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(6):2345-53. Epub 2010/03/24.
44. Zhuo ZJ, Xiao MJ, Lin HR, Luo J, Wang T. Novel betulin derivative induces anti-proliferative activity by G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in Huh7 cells. *Oncology letters*. 2018;15(2):2097-104. Epub 2018/02/13.
45. Laavola M, Haavikko R, Hamalainen M, Leppanen T, Nieminen R, Alakurtti S, et al. Betulin Derivatives Effectively Suppress Inflammation in Vitro and in Vivo. *Journal of natural products*. 2016;79(2):274-80. Epub 2016/02/27.
46. Sousa MC, Varandas R, Santos RC, Santos-Rosa M, Alves V, Salvador JA. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine. *PloS one*. 2014;9(3):e89939. Epub 2014/03/20.
47. Huang QX, Chen HF, Luo XR, Zhang YX, Yao X, Zheng X. Structure and Anti-HIV Activity of Betulinic Acid Analogues. *Current medical science*. 2018;38(3):387-97. Epub 2018/08/04.
48. Minassi A, Rogati F, Cruz C, Prados ME, Galera N, Jinenez C, et al. Triterpenoid Hydroxamates as HIF Prolyl Hydrolase Inhibitors. *Journal of natural products*. 2018;81(10):2235-43. Epub 2018/10/24.
49. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2010;2(3):336-61. Epub 2010/09/14.
50. Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(6):1-13. Epub 2019/06/22.
51. Bartels K, Grenz A, Eltzschig HK. Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(46):18351-2. Epub 2013/11/05.
52. Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, Jedlicka P, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(41):E2784-93. Epub 2012/09/19.
53. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(13):5680-4. Epub 1991/07/01.

54. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5510-4. Epub 1995/06/06.
55. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):17771-8. Epub 1996/07/26.
56. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(14):7987-92. Epub 1998/07/08.
57. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15:551-78. Epub 1999/12/28.
58. Carroll VA, Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer research*. 2006;66(12):6264-70. Epub 2006/06/17.
59. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(24):9361-74. Epub 2003/12/04.
60. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11032-40. Epub 2003/01/23.
61. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001;414(6863):550-4. Epub 2001/12/06.
62. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, et al. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(19):14073-82. Epub 2007/03/16.
63. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*. 2002;16(12):1466-71. Epub 2002/06/25.
64. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72. Epub 2001/04/09.
65. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *The EMBO journal*. 1998;17(22):6573-86. Epub 1998/11/21.
66. Liao C, Zhang Q. Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases. *The American journal of pathology*. 2020;190(8):1584-95. Epub 2020/04/28.
67. Kaelin WG, Jr. Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011;76:335-45. Epub 2011/11/18.
68. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294(5545):1337-40. Epub 2001/10/13.
69. Rabinowitz MH. Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;56(23):9369-402. Epub 2013/08/28.
70. Di Conza G, Trusso Cafarello S, Lorocho S, Mennerich D, Deschoemaeker S, Di Matteo M, et al. The mTOR and PP2A Pathways Regulate PHD2 Phosphorylation to Fine-Tune HIF1alpha Levels and Colorectal Cancer Cell Survival under Hypoxia. *Cell reports*. 2017;18(7):1699-712. Epub 2017/02/16.

71. Xie F, Bao X, Yu J, Chen W, Wang L, Zhang Z, et al. Disruption and inactivation of the PP2A complex promotes the proliferation and angiogenesis of hemangioma endothelial cells through activating AKT and ERK. *Oncotarget*. 2015;6(28):25660-76. Epub 2015/08/27.
72. Lee KE, Simon MC. From stem cells to cancer stem cells: HIF takes the stage. *Current opinion in cell biology*. 2012;24(2):232-5. Epub 2012/02/03.
73. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(7):1263-8. Epub 2010/08/25.
74. Hubbi ME, Semenza GL. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *American journal of physiology Cell physiology*. 2015;309(12):C775-82. Epub 2015/10/23.
75. Harris AJ, Thompson AR, Whyte MK, Walmsley SR. HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. *Hypoxia (Auckl)*. 2014;2:47-58. Epub 2014/05/24.
76. Lin N, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(10):3661-71. Epub 2016/09/07.
77. Wobben R, Husecken Y, Lodewick C, Gibbert K, Fandrey J, Winning S. Role of hypoxia inducible factor-1alpha for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biological chemistry*. 2013;394(4):495-505. Epub 2013/01/31.
78. Tyrakis PA, Palazon A, Macias D, Lee KL, Phan AT, Velica P, et al. S-2-hydroxyglutarate regulates CD8(+) T-lymphocyte fate. *Nature*. 2016;540(7632):236-41. Epub 2016/11/01.
79. Cho SH, Raybuck AL, Stengel K, Wei M, Beck TC, Volanakis E, et al. Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. *Nature*. 2016;537(7619):234-8. Epub 2016/08/09.
80. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer cell*. 2007;11(5):407-20. Epub 2007/05/08.
81. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988;242(4884):1412-5. Epub 1988/12/09.
82. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5. Epub 1992/10/29.
83. Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *International journal of cancer*. 1999;80(4):617-23. Epub 1999/02/06.
84. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014;41(4):518-28. Epub 2014/11/05.
85. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(49):19426-31. Epub 2008/12/06.
86. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):343-54. Epub 2004/05/04.
87. Wilkins SE, Abboud MI, Hancock RL, Schofield CJ. Targeting Protein-Protein Interactions in the HIF System. *ChemMedChem*. 2016;11(8):773-86. Epub 2016/03/22.
88. Joharapurkar AA, Pandya VB, Patel VJ, Desai RC, Jain MR. Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Breakthrough in the Therapy of Anemia Associated with Chronic Diseases. *Journal of medicinal chemistry*. 2018;61(16):6964-82. Epub 2018/05/02.
89. Yeh TL, Leissing TM, Abboud MI, Thinnes CC, Atasoylu O, Holt-Martyn JP, et al. Molecular and cellular mechanisms of HIF prolyl hydroxylase inhibitors in clinical trials. *Chemical science*. 2017;8(11):7651-68. Epub 2018/02/13.
90. Hirota K. HIF-alpha Prolyl Hydroxylase Inhibitors and Their Implications for Biomedicine: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2021;9(5). Epub 2021/05/01.

91. Yap DYH, McMahon LP, Hao CM, Hu N, Okada H, Suzuki Y, et al. Recommendations by the Asian Pacific society of nephrology (APSN) on the appropriate use of HIF-PH inhibitors. *Nephrology (Carlton)*. 2021;26(2):105-18. Epub 2020/11/23.
92. Gupta N, Wish JB. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2017;69(6):815-26. Epub 2017/03/01.
93. Souza E, Cho KH, Harris ST, Flindt NR, Watt RK, Pai AB. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors: a paradigm shift for treatment of anemia in chronic kidney disease? Expert opinion on investigational drugs. 2020;29(8):831-44. Epub 2020/06/02.
94. Souma T, Suzuki N, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Frontiers in physiology*. 2015;6:167. Epub 2015/06/20.
95. Suzuki N. Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2015;235(3):233-40. Epub 2015/03/20.
96. Suzuki N, Yamamoto M. Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2016;468(1):3-12. Epub 2015/10/11.
97. Chen N, Hao C, Peng X, Lin H, Yin A, Hao L, et al. Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis. *The New England journal of medicine*. 2019;381(11):1001-10. Epub 2019/07/25.
98. Chen N, Hao C, Liu BC, Lin H, Wang C, Xing C, et al. Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis. *The New England journal of medicine*. 2019;381(11):1011-22. Epub 2019/07/25.
99. Haase VH. HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis*. 2017;21 Suppl 1:S110-S24. Epub 2017/04/28.
100. Del Vecchio L, Locatelli F. Hypoxia response and acute lung and kidney injury: possible implications for therapy of COVID-19. *Clinical kidney journal*. 2020;13(4):494-9. Epub 2020/09/10.
101. Spath MR, Koehler FC, Hoyer-Allo KJR, Grundmann F, Burst V, Muller RU. Preconditioning strategies to prevent acute kidney injury. *F1000Research*. 2020;9. Epub 2020/04/10.
102. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(1):17-25. Epub 2005/11/18.
103. Bullen A, Liu ZZ, Hepokoski M, Li Y, Singh P. Renal Oxygenation and Hemodynamics in Kidney Injury. *Nephron*. 2017;137(4):260-3. Epub 2017/06/15.
104. Evans RG, Smith JA, Wright C, Gardiner BS, Smith DW, Cochrane AD. Urinary oxygen tension: a clinical window on the health of the renal medulla? *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2014;306(1):R45-50. Epub 2013/11/15.
105. Lankadeva YR, Okazaki N, Evans RG, Bellomo R, May CN. Renal Medullary Hypoxia: A New Therapeutic Target for Septic Acute Kidney Injury? *Seminars in nephrology*. 2019;39(6):543-53. Epub 2019/12/15.
106. Heyman SN, Gorelik Y, Zorbavel D, Rosenberger C, Abassi Z, Rosen S, et al. Near-drowning: new perspectives for human hypoxic acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2020;35(2):206-12. Epub 2019/02/16.
107. Ito M, Tanaka T, Ishii T, Wakashima T, Fukui K, Nangaku M. Prolyl hydroxylase inhibition protects the kidneys from ischemia via upregulation of glycogen storage. *Kidney international*. 2020;97(4):687-701. Epub 2020/02/09.
108. Kapitsinou PP, Jaffe J, Michael M, Swan CE, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, et al. Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;302(9):F1172-9. Epub 2012/01/21.

109. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(6):2396-409. Epub 2014/05/03.
110. Yang Y, Yu X, Zhang Y, Ding G, Zhu C, Huang S, et al. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(7):825-38. Epub 2018/03/28.
111. Szigethy E, McLafferty L, Goyal A. Inflammatory bowel disease. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America*. 2010;19(2):301-18, ix. Epub 2010/05/19.
112. Liverani E, Scaiola E, Digby RJ, Bellanova M, Belluzzi A. How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(3):1017-33. Epub 2016/01/27.
113. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of immunology research*. 2019;2019:7247238. Epub 2019/12/31.
114. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57. Epub 2007/05/15.
115. Rigoli L, Caruso RA. Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients: a biomolecular and histopathological review. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(30):10262-78. Epub 2014/08/19.
116. Yang C, Singh P, Singh H, Le ML, El-Matary W. Systematic review: thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;41(11):1079-93. Epub 2015/04/11.
117. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17. Epub 2004/05/29.
118. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54 e42; quiz e30. Epub 2011/10/18.
119. Shivashankar R, Lewis JD. The Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Current gastroenterology reports*. 2017;19(5):22. Epub 2017/04/12.
120. Cummins EP, Doherty GA, Taylor CT. Hydroxylases as therapeutic targets in inflammatory bowel disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2013;93(4):378-83. Epub 2013/02/20.
121. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2002;347(6):417-29. Epub 2002/08/09.
122. Glover LE, Colgan SP. Hypoxia and metabolic factors that influence inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1748-55. Epub 2011/05/03.
123. Stidham RW, Higgins PDR. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2018;31(3):168-78. Epub 2018/05/04.
124. Klenske E, Bojarski C, Waldner M, Rath T, Neurath MF, Atreya R. Targeting mucosal healing in Crohn's disease: what the clinician needs to know. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2019;12:1756284819856865. Epub 2019/06/27.
125. Billiet T, Rutgeerts P, Ferrante M, Van Assche G, Vermeire S. Targeting TNF-alpha for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert opinion on biological therapy*. 2014;14(1):75-101. Epub 2013/11/12.
126. Rieder F, Fiocchi C, Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017;152(2):340-50 e6. Epub 2016/10/11.
127. Rieder F, Zimmermann EM, Remzi FH, Sandborn WJ. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut*. 2013;62(7):1072-84. Epub 2013/04/30.
128. Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, et al. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut*. 2009;58(6):777-89. Epub 2009/02/10.
129. Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes and infection*. 2017;19(3):210-21. Epub 2016/09/25.

130. Taylor CT, Doherty G, Fallon PG, Cummins EP. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(10):3716-24. Epub 2016/07/28.
131. Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, et al. The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology*. 2008;134(1):156-65. Epub 2008/01/02.
132. Robinson A, Keely S, Karhausen J, Gerich ME, Furuta GT, Colgan SP. Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. *Gastroenterology*. 2008;134(1):145-55. Epub 2008/01/02.
133. Hirota SA, Fines K, Ng J, Traboulsi D, Lee J, Ihara E, et al. Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in *Clostridium difficile*-induced intestinal injury. *Gastroenterology*. 2010;139(1):259-69 e3. Epub 2010/03/30.
134. Hart ML, Grenz A, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Dalton JH, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2B adenosine receptor. *J Immunol*. 2011;186(7):4367-74. Epub 2011/03/02.
135. Hindryckx P, De Vos M, Jacques P, Ferdinande L, Peeters H, Olievier K, et al. Hydroxylase inhibition abrogates TNF- α -induced intestinal epithelial damage by hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of FADD. *J Immunol*. 2010;185(10):6306-16. Epub 2010/10/15.
136. Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(5):413-24. Epub 2006/05/04.
137. Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(1):362-81. Epub 2010/08/21.
138. Tambuwala MM, Cummins EP, Lenihan CR, Kiss J, Stauch M, Scholz CC, et al. Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. *Gastroenterology*. 2010;139(6):2093-101. Epub 2010/07/06.
139. Louis NA, Hamilton KE, Kong T, Colgan SP. HIF-dependent induction of apical CD55 coordinates epithelial clearance of neutrophils. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(8):950-9. Epub 2005/06/01.
140. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(7):993-1002. Epub 2002/10/09.
141. Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(13):2242-50. Epub 2006/11/02.
142. Louis NA, Hamilton KE, Canny G, Shekels LL, Ho SB, Colgan SP. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;99(6):1616-27. Epub 2006/07/11.
143. Furuta GT, Turner JR, Taylor CT, Hershberg RM, Comerford K, Narravula S, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *The Journal of experimental medicine*. 2001;193(9):1027-34. Epub 2001/05/09.
144. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer research*. 2002;62(12):3387-94. Epub 2002/06/18.
145. Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010;7(5):281-7. Epub 2010/04/07.
146. Taylor CT, Colgan SP. Hypoxia and gastrointestinal disease. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(12):1295-300. Epub 2007/11/21.
147. Walmsley SR, Chilvers ER, Thompson AA, Vaughan K, Marriott HM, Parker LC, et al. Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic

- inflammation in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(3):1053-63. Epub 2011/02/15.
148. Migliore L, Coppede F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation research*. 2009;674(1-2):73-84. Epub 2008/10/28.
149. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochemical pharmacology*. 2002;64(5-6):889-92. Epub 2002/09/06.
150. Merelli A, Rodriguez JCG, Folch J, Regueiro MR, Camins A, Lazarowski A. Understanding the Role of Hypoxia Inducible Factor During Neurodegeneration for New Therapeutics Opportunities. *Current neuropharmacology*. 2018;16(10):1484-98. Epub 2018/01/11.
151. Chen S, Sang N. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(2):267-78. Epub 2015/07/25.
152. Zhu T, Zhan L, Liang D, Hu J, Lu Z, Zhu X, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates neuroprotection of hypoxic postconditioning against global cerebral ischemia. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2014;73(10):975-86. Epub 2014/09/06.
153. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
154. Yao SY, Soutto M, Sriram S. Preconditioning with cobalt chloride or desferrioxamine protects oligodendrocyte cell line (MO3.13) from tumor necrosis factor-alpha-mediated cell death. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(11):2403-13. Epub 2008/04/29.
155. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*. 2013;36(10):587-97. Epub 2013/08/24.
156. Paul BD, Snyder SH. Impaired Redox Signaling in Huntington's Disease: Therapeutic Implications. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2019;12:68. Epub 2019/04/04.
157. Li HS, Zhou YN, Li L, Li SF, Long D, Chen XL, et al. HIF-1alpha protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox biology*. 2019;25:101109. Epub 2019/01/29.
158. Rebec GV. Corticostriatal network dysfunction in Huntington's disease: Deficits in neural processing, glutamate transport, and ascorbate release. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2018;24(4):281-91. Epub 2018/02/22.
159. Wu Y, Li X, Xie W, Jankovic J, Le W, Pan T. Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 alpha and induction of autophagy in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry international*. 2010;57(3):198-205. Epub 2010/06/16.
160. Youdim MB. Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and m30 derived from rasagiline. *Experimental neurobiology*. 2013;22(1):1-10. Epub 2013/04/16.
161. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*. 2011;10(1):83-98. Epub 2010/12/18.
162. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature genetics*. 1993;4(4):398-403. Epub 1993/08/01.
163. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2005;6(12):919-30. Epub 2005/11/17.
164. Tobin AJ, Signer ER. Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends in cell biology*. 2000;10(12):531-6. Epub 2000/12/21.
165. Crotti A, Glass CK. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends in immunology*. 2015;36(6):364-73. Epub 2015/05/24.
166. Yang YT, Ju TC, Yang DI. Induction of hypoxia inducible factor-1 attenuates metabolic insults induced by 3-nitropropionic acid in rat C6 glioma cells. *Journal of neurochemistry*. 2005;93(3):513-25. Epub 2005/04/20.
167. Nguyen T, Hamby A, Massa SM. Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(33):11840-5. Epub 2005/08/10.
168. Voormolen DC, Polinder S, von Steinbuechel N, Vos PE, Cnossen MC, Haagsma JA. The association between post-concussion symptoms and health-related quality of life in patients with mild traumatic brain injury. *Injury*. 2019;50(5):1068-74. Epub 2018/12/18.
169. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery*. 2018:1-18. Epub 2018/04/28.
170. de Freitas Cardoso MG, Faleiro RM, de Paula JJ, Kummer A, Caramelli P, Teixeira AL, et al. Cognitive Impairment Following Acute Mild Traumatic Brain Injury. *Frontiers in neurology*. 2019;10:198. Epub 2019/03/25.
171. Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao LR. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell transplantation*. 2017;26(7):1118-30. Epub 2017/09/22.
172. Jarrahi A, Braun M, Ahluwalia M, Gupta RV, Wilson M, Munie S, et al. Revisiting Traumatic Brain Injury: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Interventions. *Biomedicines*. 2020;8(10). Epub 2020/10/03.
173. Thapa K, Khan H, Singh TG, Kaur A. Traumatic Brain Injury: Mechanistic Insight on Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2021. Epub 2021/05/07.
174. Bourgeois-Tardif S, De Beaumont L, Rivera JC, Chemtob S, Weil AG. Role of innate inflammation in traumatic brain injury. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2021;42(4):1287-99. Epub 2021/01/20.
175. Hay JR, Johnson VE, Young AM, Smith DH, Stewart W. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2015;74(12):1147-57. Epub 2015/11/18.
176. Sharif Y, Jumah F, Coplan L, Krosser A, Sharif K, Tubbs RS. Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clin Anat*. 2018;31(6):812-23. Epub 2018/04/11.
177. Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Current neuropharmacology*. 2018;16(8):1224-38. Epub 2017/06/14.
178. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *The FEBS journal*. 2015;282(21):4067-79. Epub 2015/08/19.
179. Thal SC, Neuhaus W. The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment. *Archives of medical research*. 2014;45(8):698-710. Epub 2014/12/03.
180. Balabanov R, Goldman H, Murphy S, Pellizon G, Owen C, Rafols J, et al. Endothelial cell activation following moderate traumatic brain injury. *Neurological research*. 2001;23(2-3):175-82. Epub 2001/04/26.
181. Hooper C, Pinteaux-Jones F, Fry VA, Sevastou IG, Baker D, Heales SJ, et al. Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(3):694-705. Epub 2009/02/04.
182. Krizbai IA, Deli MA. Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003;49(1):23-31. Epub 2003/07/04.
183. Zhang QG, Laird MD, Han D, Nguyen K, Scott E, Dong Y, et al. Critical role of NADPH oxidase in neuronal oxidative damage and microglia activation following traumatic brain injury. *PloS one*. 2012;7(4):e34504. Epub 2012/04/10.
184. McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(38):9451-62. Epub 2008/09/19.

185. Khan M, Dhammu TS, Baarine M, Kim J, Paintlia MK, Singh I, et al. GSNO promotes functional recovery in experimental TBI by stabilizing HIF-1alpha. *Behavioural brain research*. 2018;340:63-70. Epub 2016/10/30.
186. Sen T, Sen N. Treatment with an activator of hypoxia-inducible factor 1, DMOG provides neuroprotection after traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. 2016;107:79-88. Epub 2016/03/13.
187. Wu X, Wang C, Wang J, Zhu M, Yao Y, Liu J. Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by HIF-1alpha/GLUTs signaling pathway in rat. *Neurosurgical review*. 2021;44(1):411-22. Epub 2020/01/04.
188. Zhou J, Burns MP, Huynh L, Villapol S, Taub DD, Saavedra JM, et al. Temporal Changes in Cortical and Hippocampal Expression of Genes Important for Brain Glucose Metabolism Following Controlled Cortical Impact Injury in Mice. *Frontiers in endocrinology*. 2017;8:231. Epub 2017/09/29.
189. Schaible EV, Windschugl J, Bobkiewicz W, Kaburov Y, Dangel L, Kramer T, et al. 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1alpha response after traumatic brain injury in mice. *Journal of neurochemistry*. 2014;129(6):940-54. Epub 2014/03/13.
190. Xiong A, Xiong R, Yu J, Liu Y, Liu K, Jin G, et al. Aquaporin-4 is a potential drug target for traumatic brain injury via aggravating the severity of brain edema. *Burns & trauma*. 2021;9:tkaa050. Epub 2021/03/23.
191. Calzado MA, de la Vega L, Moller A, Bowtell DD, Schmitz ML. An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response. *Nature cell biology*. 2009;11(1):85-91. Epub 2008/12/02.
192. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-67. Epub 1999/12/28.
193. Beer LA, Liu P, Ky B, Barnhart KT, Speicher DW. Efficient Quantitative Comparisons of Plasma Proteomes Using Label-Free Analysis with MaxQuant. *Methods Mol Biol*. 2017;1619:339-52. Epub 2017/07/05.
194. Teo G, Liu G, Zhang J, Nesvizhskii AI, Gingras AC, Choi H. SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INteractome software. *Journal of proteomics*. 2014;100:37-43. Epub 2014/02/12.
195. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature protocols*. 2017;12:1295.
196. Tambuwala MM, Manresa MC, Cummins EP, Aversa V, Coulter IS, Taylor CT. Targeted delivery of the hydroxylase inhibitor DMOG provides enhanced efficacy with reduced systemic exposure in a murine model of colitis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;217:221-7. Epub 2015/09/20.
197. Taniguchi CM, Miao YR, Diep AN, Wu C, Rankin EB, Atwood TF, et al. PHD inhibition mitigates and protects against radiation-induced gastrointestinal toxicity via HIF2. *Science translational medicine*. 2014;6(236):236ra64. Epub 2014/05/16.
198. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(6):G1328-38. Epub 2005/01/08.
199. Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Conde F, Palfi S, et al. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *Journal of neurochemistry*. 1998;70(2):794-805. Epub 1998/02/07.
200. Fernagut PO, Diguët E, Stefanova N, Biran M, Wenning GK, Canioni P, et al. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience*. 2002;114(4):1005-17. Epub 2002/10/16.
201. Viennois E, Tahsin A, Merlin D. Purification of Total RNA from DSS-treated Murine Tissue via Lithium Chloride Precipitation. *Bio-protocol*. 2018;8(9). Epub 2018/06/29.

202. Hastie CJ, McLauchlan HJ, Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nature protocols*. 2006;1(2):968-71. Epub 2007/04/05.
203. Ehling M, Celus W, Martin-Perez R, Alba-Rovira R, Willox S, Ponti D, et al. B55alpha/PP2A Limits Endothelial Cell Apoptosis During Vascular Remodeling: A Complementary Approach To Disrupt Pathological Vessels? *Circulation research*. 2020;127(6):707-23. Epub 2020/06/13.
204. Farmer RG. Lower gastrointestinal bleeding in inflammatory bowel disease. *Gastroenterologia Japonica*. 1991;26 Suppl 3:93-100. Epub 1991/07/01.
205. Glover LE, Colgan SP. Epithelial Barrier Regulation by Hypoxia-Inducible Factor. *Annals of the American Thoracic Society*. 2017;14(Supplement_3):S233-S6. Epub 2017/09/26.
206. Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2765-78. Epub 2009/03/11.
207. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature protocols*. 2017;12(7):1295-309. Epub 2017/06/02.
208. Oh SY, Cho KA, Kang JL, Kim KH, Woo SY. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. *International journal of molecular medicine*. 2014;33(2):333-40. Epub 2013/11/29.
209. Trettel F, Rigamonti D, Hilditch-Maguire P, Wheeler VC, Sharp AH, Persichetti F, et al. Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Human molecular genetics*. 2000;9(19):2799-809. Epub 2000/11/25.
210. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*. 2001;32(5):1208-15. Epub 2001/09/06.
211. Chen SD, Wu CL, Hwang WC, Yang DI. More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(3). Epub 2017/03/10.
212. Zhang B, Xu X, Chu X, Yu X, Zhao Y. Protective effects of angiotensin-like 4 on the blood-brain barrier in acute ischemic stroke treated with thrombolysis in mice. *Neuroscience letters*. 2017;645:113-20. Epub 2017/03/08.
213. Zhang SJ, Luo YM, Wang RL. The effects of erythropoietin on neurogenesis after ischemic stroke. *Journal of integrative neuroscience*. 2020;19(3):561-70. Epub 2020/10/20.
214. Thompson AM, Farmer K, Rowe EM, Hayley S. Erythropoietin modulates striatal antioxidant signalling to reduce neurodegeneration in a toxicant model of Parkinson's disease. *Molecular and cellular neurosciences*. 2020;109:103554. Epub 2020/09/25.
215. Schonkeren SL, Massen M, van der Horst R, Koch A, Vaes N, Melotte V. Nervous NDRGs: the N-myc downstream-regulated gene family in the central and peripheral nervous system. *Neurogenetics*. 2019;20(4):173-86. Epub 2019/09/06.
216. Patching SG. Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Molecular neurobiology*. 2017;54(2):1046-77. Epub 2016/01/24.
217. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13-25. Epub 2009/08/12.
218. Baskaya MK, Rao AM, Dogan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience letters*. 1997;226(1):33-6. Epub 1997/04/18.
219. Salehi A, Zhang JH, Obenaus A. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017;37(7):2320-39. Epub 2017/04/06.
220. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia*. 2007;99(1):4-9. Epub 2007/06/19.
221. Werner JK, Stevens RD. Traumatic brain injury: recent advances in plasticity and regeneration. *Current opinion in neurology*. 2015;28(6):565-73. Epub 2015/11/07.

222. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(8):1191-201. Epub 2012/06/26.
223. Lampron A, Elali A, Rivest S. Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron*. 2013;78(2):214-32. Epub 2013/04/30.
224. Videm V, Albrigtsen M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scandinavian journal of immunology*. 2008;67(5):523-31. Epub 2008/03/28.
225. Wang K, Jing Y, Xu C, Zhao J, Gong Q, Chen S. HIF-1alpha and VEGF Are Involved in Deferoxamine-Ameliorated Traumatic Brain Injury. *The Journal of surgical research*. 2020;246:419-26. Epub 2019/10/22.
226. Chang KH, Wu YR, Chen YC, Chen CM. Plasma inflammatory biomarkers for Huntington's disease patients and mouse model. *Brain, behavior, and immunity*. 2015;44:121-7. Epub 2014/10/01.
227. Marks E, Goggins BJ, Cardona J, Cole S, Minahan K, Mateer S, et al. Oral delivery of prolyl hydroxylase inhibitor: AKB-4924 promotes localized mucosal healing in a mouse model of colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(2):267-75. Epub 2014/12/30.
228. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J Immunol*. 2007;178(9):5859-70. Epub 2007/04/20.
229. Cummins EP, Keogh CE, Crean D, Taylor CT. The role of HIF in immunity and inflammation. *Molecular aspects of medicine*. 2016;47-48:24-34. Epub 2016/01/16.
230. Giuffrida P, Caprioli F, Facciotti F, Di Sabatino A. The role of interleukin-13 in chronic inflammatory intestinal disorders. *Autoimmunity reviews*. 2019;18(5):549-55. Epub 2019/03/08.
231. Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Martin M, Obermeier F, Ruemmele P, Kitani A, et al. IL-13 orchestrates resolution of chronic intestinal inflammation via phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta. *J Immunol*. 2014;192(8):3969-80. Epub 2014/03/19.
232. Rieder F. Managing Intestinal Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2018;14(2):120-2. Epub 2018/04/03.
233. Sun Z, Schwenzer A, Rupp T, Murdamoothoo D, Vegliante R, Lefebvre O, et al. Tenascin-C Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis through Integrin alpha9beta1-Mediated YAP Inhibition. *Cancer research*. 2018;78(4):950-61. Epub 2017/12/21.
234. Lowy CM, Oskarsson T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell adhesion & migration*. 2015;9(1-2):112-24. Epub 2015/03/05.
235. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Techniques in coloproctology*. 2019;23(1):3-13. Epub 2019/02/01.
236. Yang Z, Zhang C, Qi W, Cui C, Cui Y, Xuan Y. Tenascin-C as a prognostic determinant of colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation. *Experimental and molecular pathology*. 2018;105(2):216-22. Epub 2018/09/01.
237. White JR, Phillips F, Monaghan T, Fateen W, Samuel S, Ghosh S, et al. Review article: novel oral-targeted therapies in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2018;47(12):1610-22. Epub 2018/04/20.
238. Fukase H, Kajioka T, Oikawa I, Ikeda N, Furuie H. AJM300, a novel oral antagonist of alpha4-integrin, sustains an increase in circulating lymphocytes: A randomised controlled trial in healthy male subjects. *British journal of clinical pharmacology*. 2020;86(3):591-600. Epub 2019/10/29.
239. Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, et al. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. *Journal of drug targeting*. 2011;19(6):458-67. Epub 2010/09/02.
240. Deepak Bhatia MSA, Qiwen Shi and Shahrzad Movafagh. Hypoxia and its Emerging Therapeutics in Neurodegenerative, Inflammatory and Renal Diseases. In: Jing Zheng CZ, editor. *Hypoxia and Human Diseases*. Intechopen2017.

241. Awan MU, Hasan M, Iqbal J, Lei R, Lee WF, Hong M, et al. Neuroprotective role of BNIP3 under oxidative stress through autophagy in neuroblastoma cells. *Molecular biology reports*. 2014;41(9):5729-34. Epub 2014/06/15.
242. Clark AR, Ohlmeyer M. Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in inflammation and neurodegeneration. *Pharmacology & therapeutics*. 2019;201:181-201. Epub 2019/06/04.
243. Dobrogowska DH, Lossinsky AS, Tarnawski M, Vorbrodt AW. Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of neurocytology*. 1998;27(3):163-73. Epub 2000/01/20.
244. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor rescues HN33 neural cells from death induced by serum withdrawal. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2000;14(3):197-203. Epub 2000/09/13.
245. Niatsetskaya Z, Basso M, Speer RE, McConoughey SJ, Coppola G, Ma TC, et al. HIF prolyl hydroxylase inhibitors prevent neuronal death induced by mitochondrial toxins: therapeutic implications for Huntington's disease and Alzheimer's disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12(4):435-43. Epub 2009/08/08.
246. Bjorkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(8):1869-77. Epub 2008/07/16.
247. Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2019;12:258. Epub 2019/11/12.
248. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:278. Epub 2015/08/19.
249. Franco R, Fernandez-Suarez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in neurobiology*. 2015;131:65-86. Epub 2015/06/13.
250. Zuccato C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in neurobiology*. 2007;81(5-6):294-330. Epub 2007/03/24.
251. Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2007;144B(4):574-7. Epub 2007/04/12.
252. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological research*. 2017;39(1):73-82. Epub 2016/11/05.
253. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(3):298-308. Epub 2010/02/24.
254. Schwulst SJ, Islam M. Murine Model of Controlled Cortical Impact for the Induction of Traumatic Brain Injury. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2019(150). Epub 2019/09/03.
255. Kim WS, Lee K, Kim S, Cho S, Paik NJ. Transcranial direct current stimulation for the treatment of motor impairment following traumatic brain injury. *Journal of neuroengineering and rehabilitation*. 2019;16(1):14. Epub 2019/01/27.
256. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(2):187-96. Epub 1994/04/01.
257. Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9). Epub 2020/05/14.
258. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 10):2761-72. Epub 2006/07/11.
259. Chen Z, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *Journal of neurochemistry*. 2016;136 Suppl 1:10-7. Epub 2015/02/19.
260. Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Frontiers in aging neuroscience*. 2017;9:208. Epub 2017/07/14.

261. Zhou Y, Shao A, Yao Y, Tu S, Deng Y, Zhang J. Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. *Cell communication and signaling : CCS*. 2020;18(1):62. Epub 2020/04/16.
262. Taleski G, Sontag E. Protein phosphatase 2A and tau: an orchestrated 'Pas de Deux'. *FEBS letters*. 2018;592(7):1079-95. Epub 2017/11/10.
263. Takahashi K, Hasegawa S, Maeba S, Fukunaga S, Motoyama M, Hamano H, et al. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia. *Brain & development*. 2014;36(8):670-5. Epub 2013/11/26.
264. Lv H, Wang Q, Wu S, Yang L, Ren P, Yang Y, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;450:282-97. Epub 2015/09/01.
265. Salama M, Mohamed WM. Tau protein as a biomarker for asphyxia: A possible forensic tool? *Applied & translational genomics*. 2016;9:20-2. Epub 2016/06/30.
266. Wu F, Liu L, Zhou H. Endothelial cell activation in central nervous system inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2017;101(5):1119-32. Epub 2017/02/16.

