

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 078**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012 PCT/EP2012/002333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12163542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012 E 12729349 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2714063**

54 Título: **Agente activador de VEGFR2/3 para uso en el tratamiento de disfunciones cognitivas**

30 Prioridad:

01.06.2011 EP 11004490
01.06.2011 US 201113150846

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)
Seminarstrasse 2
69117 Heidelberg, DE

72 Inventor/es:

BADING, HILMAR;
MAUCERI, DANIELA y
KLEIN, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 078 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente activador de VEGFR2/3 para uso en el tratamiento de disfunciones cognitivas

La presente invención se refiere a agentes activadores del receptor 2 y/o 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2/3) para uso en métodos para tratar disfunciones cognitivas relacionadas con la edad y/o la enfermedad, en donde el agente activador es un péptido que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9 a 14.

Muchas funciones cerebrales, incluidas la formación de la memoria y la neuroprotección adquirida, están controladas por aumentos transitorios en la concentración de calcio intracelular inducida por la actividad sináptica. El calcio puede actuar localmente cerca del sitio de entrada para activar los mecanismos de señalización que modulan diversos procesos bioquímicos que, a su vez, conducen a cambios en la excitabilidad neuronal y/o la eficacia de la transmisión sináptica. El mantenimiento a largo plazo de tales adaptaciones funcionales inducidas por actividad requiere que los transitorios de calcio invadan el núcleo de la célula y activen o repriman la expresión génica. El calcio nuclear es una de las señales más potentes en la expresión génica neuronal y representa un actor clave en el diálogo entre la sinapsis y el núcleo. Controla la unión de elementos de respuesta de cAMP (CREB) y la transcripción mediada por la proteína de unión a CREB (CBP) y es fundamental para la adquisición de recuerdos y la acumulación de la actividad neuroprotectora en neuronas activadas de forma sináptica. Una imagen de cómo los eventos genómicos inducidos por la señalización nuclear de calcio regulan la neuroprotección persistente está emergiendo. En contraste, los procesos nucleares regulados por el calcio requeridos para la formación de la memoria son desconocidos. Aquí, se consideró la posibilidad de que la señalización nuclear del calcio module las características estructurales de las neuronas, en particular la complejidad del árbol dendrítico que determina su capacidad para recibir y procesar las entradas. La proteína quinasa IV dependiente de calcio/calmodulina (CaMKIV), una diana del calcio en el núcleo, ha sido implicada en la regulación del crecimiento dendrítico y la remodelación de las espinas, lo que sugiere que el calcio nuclear puede representar una señal importante en estos procesos.

El papel de las dendritas neuronales es recibir y procesar las entradas sinápticas. La geometría del árbol dendrítico puede sufrir cambios dependientes de la actividad neuronal, que pueden afectar las capacidades cognitivas del organismo. La geometría de las dendritas específica la conectividad de las neuronas y ejerce una gran influencia sobre cómo las señales se integran y se transmiten al soma de la célula y, por lo tanto, también qué salida se produce. Sería esperable que los cambios en las longitudes y los patrones de ramificación de las dendritas alteren no solo el rendimiento de una neurona sino también el poder computacional de la red de la que forma parte la neurona, lo que finalmente provocaría cambios en el comportamiento del organismo.

Se ha observado acortamiento y simplificación de dendritas en una variedad de trastornos asociados con el retraso mental o los déficits cognitivos, que incluyen isquemia, en particular isquemia cerebral, anomalías genéticas, tales como el síndrome de Down o el síndrome de Rett, afecciones neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento, disfunciones metabólicas e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En este contexto, el documento US 2007/0082848 A1 describe materiales y métodos de VEGF-C o VEGF-D para promover el crecimiento y la diferenciación de células madre neurales, así como materiales y métodos para administrar dichas células para inhibir la neuropatología. Además, el documento WO 03/024478 A1 describe métodos para influir en las células del sistema nervioso central para producir una progenie útil en el tratamiento de trastornos del SNC usando el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una combinación de ambos, un agonista de PDGF o un agonista de VEGF. Además, el documento US 2009/0324611 A1 describe materiales y métodos para modular la expresión y/o actividad de FATP in vivo, que tienen aplicaciones diagnósticas, profilácticas y terapéuticas para diversas enfermedades y afecciones que están influenciadas por FATP, o caracterizadas por la expresión o actividad de FATP excesiva o inadecuada. Además, el documento WO 2009/036149 A2 describe un método para tratar una enfermedad degenerativa o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero, que comprende administrar un polipéptido de VEGF-B o una variante funcional o mimético del mismo. Finalmente, el documento US2009/0305994 A1 describe el uso de compuestos que se unen a VEGFR y modulan la respuesta angiogénica, imitando dichos compuestos la región de aminoácidos VEGF 17-25 implicada en el reconocimiento del receptor inhibiendo o estimulando así el proceso angiogénico, que puede usarse en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una angiogénesis dependiente de VEGF excesiva o defectuosa.

Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de proporcionar medios para modificar la longitud y/o la complejidad de las dendritas de una célula neuronal, lo que podría resultar útil en el tratamiento de condiciones que se beneficiarían de dicha modificación.

Esta necesidad se satisface proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, la presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. El agente activador del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 y/o 3 (VEGFR2/3) para su uso en el tratamiento de una disfunción cognitiva relacionada con la edad y/o la enfermedad, en la que el agente activador

es un péptido que comprende al menos uno de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9 a 14.

2. El agente activador de VEGFR2/3 para su uso de acuerdo con el punto 1, en donde la disfunción cognitiva está causada por una condición, seleccionada del grupo que consiste en isquemia cerebral, síndrome de Down, síndrome de Rett, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, envejecimiento, disfunción metabólica e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

3. El agente activador de VEGFR2/3 para uso según el punto 1 o el punto 2, en donde el sujeto es un ser humano.

4. El agente activador de VEGFR2/3 para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que el péptido consiste en al menos una de las secuencias secuenciadas de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9 a 14.

En la presente descripción, el factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGFD), un mitógeno para las células endoteliales y el regulador de la angiogénesis y la vasculatura linfática, se identifica como una diana de la señalización de calcio-CaMKIV nuclear en las neuronas del hipocampo. Además, se demuestra que se requiere VEGFD para el mantenimiento de un árbol dendrítico complejo y proporciona el enlace molecular entre la actividad neuronal, la regulación de la geometría dendrítica y el funcionamiento cognitivo.

Por consiguiente, se describe en este documento un método para aumentar al menos una de la longitud y la complejidad de las dendritas de una célula neuronal, que comprende administrar VEGFD recombinante (rVEGFD) a la célula neuronal y/o aumentar la expresión de VEGFD en la neurona célula y/o activar el receptor 2 de VEGFD y/o el receptor 3 de VEGFD (VEGFR2/3) en la célula neuronal.

Además, se describe en este documento un método para disminuir al menos una de la longitud y la complejidad de las dendritas de una célula neuronal, que comprende disminuir la expresión de VEGFD y/o VEGFR2/3 en la célula neuronal y/o bloquear VEGFD y/o VEGFR2/3 en la célula neuronal.

Además, se describe en este documento un método para tratar una disfunción cognitiva relacionada con la edad y/o la enfermedad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar rVEGFD al sujeto y/o aumentar la expresión de VEGFD en las células neuronales del sujeto y/o activar VEGFR2/3 en las células neuronales del sujeto.

Además, se describe en este documento un método para alterar la memoria de un sujeto, que comprende disminuir la expresión de VEGFD y/o VEGFR2/3 en las células neuronales del sujeto y/o bloquear VEGFD y/o VEGFR2/3 en las células neuronales del sujeto.

Finalmente, se describe en este documento un rVEGFD para uso en el tratamiento de una disfunción cognitiva relacionada con la edad y/o la enfermedad en un sujeto que lo necesite.

En un aspecto, se describe en este documento un método para aumentar al menos una de la longitud y la complejidad de las dendritas de una célula neuronal, que comprende al menos uno de los pasos seleccionados del grupo que consiste en

(i) administrar el factor de crecimiento endotelial vascular recombinante D (rVEGFD) a la célula neuronal;

(ii) aumentar la expresión de VEGFD en la célula neuronal mediante la transfección de la célula neuronal con un vector que codifica rVEGFD; y

(iii) activar al menos uno del receptor 2 de VEGFD y el receptor 3 de VEGFD (VEGFR2/3) en la célula neuronal administrando un agente activador de VEGFR2/3 a la célula neuronal.

En este contexto, la longitud de las dendritas de una célula neuronal se define como la suma de las longitudes de cada dendrita individual de la célula neuronal, es decir, la suma de las longitudes desde el punto donde una dendrita individual se bifurca desde el soma celular o de otra dendrita a la punta más lejana de esa dendrita individual.

Además, la complejidad de las dendritas de una célula neuronal se define como el grado de arborización de la dendrita. La complejidad de una dendrita puede cuantificarse como el número de puntos de ramificación, es decir, el número de puntos en los que una dendrita se divide en otros. Además, la complejidad de una dendrita puede cuantificarse usando el análisis Sholl, es decir, calculando el número de intersecciones entre dendritas y círculos de diámetro creciente centrados en el soma, en donde un mayor número de intersecciones corresponde a una mayor complejidad.

Las expresiones "factor de crecimiento endotelial vascular D" y "VEGFD", como se usan en la presente memoria, se refieren a VEGFD en su forma nativa, de tipo natural, así como a las formas mutantes de VEGFD que tienen la misma o mayor eficacia que el VEGFD de tipo natural, y formas marcadas de VEGFD, por ejemplo VEGFD conjugado a proteína verde fluorescente (gfp-VEGFD), hemaglutinina (HA-VEGFD) o C-myc (myc-VEGFD).

Además, VEGFD puede activar los subtipos 2 y 3 del receptor VEGFD (VEGFR). Por consiguiente, el término "VEGFR2/3", como se usa en el presente documento, se refiere a ambos subtipos, es decir, el receptor 2 de VEGFD

y/o el receptor 3 de VEGFD.

Los métodos para la producción de rVEGFD no están particularmente limitados e incluyen, por ejemplo, la expresión heteróloga de rVEGFD en microorganismos tales como *Escherichia coli*, células de insecto tales como células Sf21 o células de mamífero tales como células HEK293. Los métodos respectivos para la expresión de proteínas heterólogas en una amplia gama de organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica.

Además, los medios para administrar rVEGFD a células neuronales no están particularmente limitados e incluyen, por ejemplo, la suplementación del medio de cultivo de un cultivo celular in vitro. Las rutas de administración in vivo incluyen inyecciones intravenosas (i.v.), intraperitoneales (i.p.), intracerebroventriculares (i.c.v.), intracerebrales (i.c.) e intraespinales, administración intranasal, difusión mejorada por convección transnasal (CED) y catéteres intracerebroventriculares (ICV) implantados. Además, las estrategias para el suministro in vivo de péptidos a través de la barrera hematoencefálica son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la unión de rVEGFD a vehículos tales como anticuerpos, productos químicos o liposomas. En este contexto, la barrera hematoencefálica está fuertemente comprometida durante los eventos isquémicos cerebrales, lo que facilita la administración de rVEGFD en esta forma particular de disfunción cognitiva.

Los métodos para aumentar la expresión de VEGFD en células neuronales mediante la transfección de las células neuronales con un vector que codifica rVEGFD son conocidos en la técnica y no están particularmente limitados en el contexto de la presente invención. Incluyen, por ejemplo, la transfección de las células con vectores virales que codifican rVEGFD. Los vectores respectivos, los métodos de transfección y los métodos para la sobreexpresión de VEGFD son bien conocidos en la técnica.

Finalmente, los métodos para activar VEGFR2/3 en células neuronales mediante la administración de un agente activador de VEGFR2/3 a las células neuronales no están particularmente limitados e incluyen, por ejemplo, la administración de anticuerpos activadores a las células. Los respectivos agentes de activación incluyen los ligandos naturales de VEGFR2/3 tales como VEGF, VEGFD, VEGFC y VEGFB. En una realización preferida, el agente activador de VEGFR2/3 es un péptido. Preferiblemente, el péptido comprende al menos de 10 a 25 aminoácidos consecutivos de la secuencia peptídica mostrada en la SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos SMDRSASHRSTRFAATFYDTETLKVIDEEWQRTQCSPRETCVEVASELGKTTNT). Este tramo de aminoácidos consecutivos se puede modificar con respecto a la secuencia peptídica que se muestra en la SEQ ID NO: 8 mediante deleciones, inserciones o mutaciones puntuales. El péptido tiene preferiblemente una longitud de 10 a 25 aminoácidos. En realizaciones particularmente preferidas, el péptido comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 9 a 14, o consiste en dichas secuencias de aminoácidos. Los medios para la administración de agentes activadores y/o anticuerpos y/o péptidos son conocidos en la técnica e incluyen los medios anteriores como se definen para rVEGFD.

En una realización preferida de este aspecto, el método respectivo se realiza in vitro, es decir, no se practica en el cuerpo humano o animal.

En otro aspecto, se describe en este documento un método para disminuir al menos una de la longitud y la complejidad de las dendritas de una célula neuronal, que comprende al menos uno de los pasos seleccionados del grupo que consiste en

(i) disminuir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGFD) en la célula neuronal administrando al menos uno de un ARNhc adecuado y un vector que codifica un ARNhc adecuado para la célula neuronal;

(ii) disminuir la expresión de al menos uno del receptor 2 de VEGFD y el receptor 3 de VEGFD (VEGFR2/3) en la célula neuronal administrando al menos uno de un ARNhc adecuado y un vector que codifica un ARNhc adecuado a la célula neuronal;

(iii) bloquear VEGFD en la célula neuronal administrando un agente bloqueante de VEGFD a la célula neuronal; y

(iv) bloquear VEGFR2/3 en la célula neuronal administrando un agente bloqueante VEGFR2/3 a la célula neuronal.

Los métodos para disminuir la expresión de VEGFD y/o VEGFR2/3 en células neuronales administrando al menos uno de un ARNhc adecuado y un vector que codifica un ARNhc adecuado para la célula neuronal son conocidos en la técnica y no están particularmente limitados. Se basan en la eliminación de los respectivos genes utilizando la interferencia de ARN (ARNi). Las técnicas de ARNi son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la transfección de las células con respectivos ARNhc o vectores que codifican tales ARNhc. En la presente solicitud, se encontró que una secuencia de ADN que codifica un ARNhc para la eliminación eficaz de VEGFD murino es la secuencia GGGCTTCAGGAGCGAACAT (SEQ ID NO: 1). Los métodos para identificar secuencias adicionales para la eliminación de VEGFD o VEGFR2/3 en diversas especies son conocidos en la técnica.

Además, los métodos para bloquear VEGFD y/o VEGFR2/3 en células neuronales mediante la administración de un agente bloqueante VEGFD o VEGFR2/3 a las células neuronales no están particularmente limitados e incluyen, por ejemplo, la administración de respectivos anticuerpos de bloqueo a las células. Los medios para la administración de

agentes bloqueadores y/o anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen los medios anteriores como se define para rVEGFD.

En una realización preferida de este aspecto, el método respectivo se realiza in vitro, es decir, no se practica en el cuerpo humano o animal.

- 5 En cualquier situación patológica en la que los árboles dendríticos y la cognición se vean afectados, la regulación positiva de la señalización de VEGFD puede utilizarse para restablecer el funcionamiento normal. Las estrategias destinadas a mantener o restablecer las longitudes de dendritas apropiadas y los patrones de ramificación, que implican la modulación de los niveles neuronales de VEGFD, representan formas novedosas en el desarrollo de terapias efectivas para las disfunciones cognitivas relacionadas con la edad y/o la enfermedad. Además, los fármacos destinados a activar VEGFR2/3 también pueden encontrar un uso terapéutico.

10 Por consiguiente, en otro aspecto, se describe en este documento un método para tratar una disfunción cognitiva relacionada con la edad y/o la enfermedad en un sujeto que lo necesita, que comprende al menos uno de los pasos seleccionados del grupo que consiste en:

(i) administrar el factor de crecimiento endotelial vascular recombinante D (rVEGFD) al sujeto;

- 15 (ii) aumentar la expresión de VEGFD en las células neuronales del sujeto administrando un vector que codifica rVEGFD al sujeto; y

(iii) activar al menos uno del receptor 2 de VEGFD y el receptor 3 de VEGFD (VEGFR2/3) en las células neuronales del sujeto mediante la administración de un agente activador de VEGFR2/3 al sujeto.

- 20 En este contexto, las disfunciones cognitivas son disfunciones, trastornos o trastornos funcionales de los sistemas cognitivos del sujeto. Las disfunciones cognitivas relacionadas con la edad y/o la enfermedad son preferiblemente disfunciones cognitivas causadas por un trastorno, seleccionado del grupo que consiste en isquemia, en particular isquemia cerebral, síndrome de Down, síndrome de Rett, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, envejecimiento, disfunción metabólica e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

- 25 Los métodos para administrar rVEGFD a un sujeto son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los medios de administración in vivo como se define anteriormente para rVEGFD.

- 30 Además, los métodos para aumentar la expresión de VEGFD en las células neuronales de un sujeto mediante la administración de un vector que codifica rVEGFD al sujeto son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la transfección o infección con vectores virales que codifican rVEGFD. Los vectores respectivos, los métodos de transfección, los métodos de infección y los métodos para la sobreexpresión de VEGFD son bien conocidos en la técnica.

- 35 Finalmente, los métodos para activar VEGFR2/3 en las células neuronales de un sujeto mediante la administración de un agente activador de VEGFR2/3 al sujeto son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la administración de un anticuerpo activador de VEGFR2/3 al sujeto. Los respectivos agentes de activación incluyen los ligandos naturales de VEGFR2/3 tales como VEGF, VEGFD, VEGFC y VEGFB. En una realización preferida, el agente activador de VEGFR2/3 es un péptido. Preferiblemente, el péptido comprende al menos de 10 a 25 aminoácidos consecutivos de la secuencia peptídica mostrada en la SEQ ID NO: 8. Este tramo de aminoácidos consecutivos se puede modificar con respecto a la secuencia peptídica que se muestra en la SEQ ID NO: 8 mediante deleciones, inserciones o mutaciones puntuales. El péptido tiene preferiblemente una longitud de 10 a 25 aminoácidos. Los medios para administrar agentes activadores y/o anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen los medios in vivo anteriores como se define para rVEGFD.

- 40 En una realización preferida de este aspecto, el sujeto es un vertebrado no humano. En otra realización preferida, el sujeto es un mamífero no humano. En otra realización preferida, el sujeto es humano.

- 45 Los medios para acortar y simplificar específicamente las dendritas proporcionan nuevas herramientas para desarrollar modelos animales de discapacidades cognitivas. En este contexto, silenciar la expresión de VEGFD o VEGFR2/3 o bloquear VEGFD o VEGFR2/3 también resulta útil. Un método respectivo puede usarse además para el tratamiento del síndrome de estrés postraumático al afectar a la memoria del paciente.

Por consiguiente, en otro aspecto, se describe en este documento un método para alterar la memoria de un sujeto, que comprende al menos uno de los pasos seleccionados del grupo que consiste en:

- 50 (i) disminuir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGFD) en las células neuronales del sujeto mediante la administración de al menos uno de un ARNhc adecuado y un vector que codifica un ARNhc adecuado para el sujeto;

(ii) disminuir la expresión de al menos uno del receptor 2 de VEGFD y el receptor 3 de VEGFD (VEGFR2/3) en las células neuronales del sujeto mediante la administración de al menos uno de un ARNhc adecuado y un vector que codifica un ARNhc adecuado;

(iii) bloquear VEGFD en las células neuronales del sujeto administrando un agente bloqueador de VEGFD al sujeto; y

(iv) bloquear VEGFR2/3 en la célula neuronal del sujeto administrando un agente bloqueador VEGFR2/3 al sujeto.

5 Los métodos para disminuir la expresión de VEGFD y/o VEGFR2/3 en las células neuronales de un sujeto administrando al menos uno de un ARNhc adecuado y un vector que codifica un ARNhc adecuado para el sujeto son conocidos en la técnica y se basan en la eliminación de los genes respectivos usando interferencia de ARN (ARNi). Las técnicas de ARNi son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la transfección o infección con respectivos ARNhc o vectores que codifican tales ARNhc. Los métodos para identificar secuencias para la destrucción de VEGFD o VEGFR2/3 en diversas especies son conocidos en la técnica.

10 Además, los métodos para bloquear VEGFD y/o VEGFR2/3 en las células neuronales de un sujeto mediante la administración de un agente bloqueante VEGFD o VEGFR2/3 al sujeto son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la administración de anticuerpos de bloqueo respectivos al sujeto. Los medios para la administración de agentes bloqueadores y/o anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen los medios anteriores como se define para rVEGFD.

15 En una realización preferida de este aspecto, el método se usa para la generación de un animal que proporciona un sistema modelo para disfunciones cognitivas. Por consiguiente, el sujeto es preferiblemente un animal, preferiblemente un vertebrado no humano o un mamífero no humano, preferiblemente un ratón.

En otra realización preferida de este aspecto, el sujeto es humano. En caso de que el sujeto sea un ser humano, el método se usa preferiblemente para el tratamiento del síndrome de estrés postraumático.

20 En aspectos adicionales, se describe en este documento un miembro, seleccionado del grupo que consiste en rVEGFD, un vector que codifica rVEGFD y un agente activador de VEGFR2/3, para usar al aumentar al menos uno de la longitud y la complejidad de las dendritas de las células neuronales de un sujeto.

25 En realizaciones preferidas, aumentar al menos una de la longitud y la complejidad de las dendritas de las células neuronales de un sujeto es para el tratamiento de una disfunción cognitiva relacionada con la edad y/o la enfermedad en un sujeto. En estas realizaciones, la disfunción cognitiva relacionada con la edad y/o enfermedad así como el método para el tratamiento de la misma es como se definió anteriormente. Además, el sujeto es preferiblemente humano. Además, rVEGFD, los vectores que codifican rVEGFD y los agentes activadores de VEGFR2/3 son como se definieron anteriormente.

30 En aspectos adicionales, se describe en este documento un miembro, seleccionado del grupo que consiste en ARN pequeños en horquilla (ARNhc) capaces de disminuir la expresión de VEGFD en un sujeto, los ARNhc capaces de disminuir la expresión de VEGFR2/3 en un sujeto, agentes bloqueantes de VEGFD y agentes bloqueantes de VEGFR2/3, para uso en la disminución de al menos uno de la longitud y la complejidad de las dendritas de las células neuronales de un sujeto.

35 En realizaciones preferidas, disminuir al menos una de la longitud y la complejidad de las dendritas de las células neuronales de un sujeto es para deteriorar la memoria de un sujeto y/o para el tratamiento del síndrome de estrés postraumático. Además, el sujeto es preferiblemente humano. Además, los ARNhc capaces de disminuir la expresión de VEGFD en un sujeto, los ARNhc capaces de disminuir la expresión de VEGFR2/3 en un sujeto, los agentes bloqueantes de VEGFD y los agentes bloqueantes de VEGFR2/3 son como se definieron anteriormente.

40 En la presente invención, VEGFD se identifica como un regulador de la geometría de la dendrita neuronal. VEGFD media los efectos de la actividad sináptica y la señalización nuclear de calcio CaMKIV en el mantenimiento de la arborización dendrítica compleja, que es necesaria para la formación de memoria.

45 Las neuronas, incluso una vez completamente desarrolladas, permanecen plásticas y sufren alteraciones funcionales o estructurales dependientes de la actividad. Los cambios en la expresión génica, inducidos por la actividad sináptica y los transitorios de calcio que se propagan hacia y dentro del núcleo, a menudo son esenciales para el mantenimiento a largo plazo de las respuestas de adaptación. Los árboles dendríticos, las proyecciones ramificadas de los extremos receptores de entrada de las neuronas, son objetivos principales para las alteraciones estructurales reguladas por la actividad.

50 Se ha demostrado que los programas genéticos intrínsecos predeterminados y los mecanismos autónomos celulares determinan la morfogénesis de la dendrita en las neuronas en desarrollo. Sin embargo, hay una apreciación creciente de la influencia de la actividad eléctrica de las neuronas en la arborización de la dendrita. La presente invención muestra que VEGFD juega un papel central en este proceso; como objetivo de la señalización de CaMKIV de calcio nuclear, vincula la actividad neuronal basal con el control de la longitud de dendrita total y los patrones de ramificación, proporcionando así a las neuronas del sistema nervioso adulto las características estructurales necesarias para el correcto funcionamiento cognitivo del organismo. Estos nuevos hallazgos explican por qué la interferencia con la señalización de calcio nuclear o con la actividad de CaMKIV compromete la capacidad de los ratones para formar recuerdos a largo plazo. También sugieren un concepto generalmente aplicable, en el que las

alteraciones de la transmisión sináptica, por ejemplo debido a la pérdida de sinapsis en el envejecimiento o la enfermedad de Alzheimer, y/o el mal funcionamiento de la señalización del calcio inducida por la actividad hacia y dentro del núcleo celular, puede conducir a una disminución de la expresión de VEGFD, seguida de una reducción en la complejidad de la dendrita y, finalmente, a una emergencia de déficits cognitivos. Las estrategias destinadas a mantener o restablecer las longitudes de las dendritas y los patrones de ramificación apropiados, ya sea mediante la suplementación de VEGFD o la mejora de la señalización nuclear de calcio, representan, por lo tanto, nuevos caminos en el desarrollo de terapias efectivas para la disfunción cognitiva relacionada con la edad y la enfermedad.

Las figuras muestran:

Fig. 1: La señalización del calcio nuclear regula la morfología neuronal.

10 A: Micrografías representativas de neuronas del hipocampo transfectadas con un vector de expresión para hrGFP o cotransfectadas con vectores de expresión para hrGFP y CaMBP4 o para hrGFP y CaMKIVK75E. La barra de escala es 20 μ m.

B-C: Cuantificación de la longitud dendrítica total y análisis de Sholl en neuronas del hipocampo transfectadas con las construcciones indicadas.

15 D: Micrografías representativas de espinas dendríticas de neuronas del hipocampo transfectadas como se indica. La barra de escala es de 5 μ m.

E: Cuantificación de la densidad de espinas de las neuronas transfectadas como en D.

20 F-G: Diagramas de frecuencia acumulativa de la longitud de la espina y el ancho de la espina en las neuronas transfectadas, como se indica. Se examinaron más de 1000 espinas y 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (** p <0,005, *** p <0,0005).

Fig. 2: La expresión de VEGFD es señalización nuclear de calcio/dependiente de CBP.

A: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD en cultivos de hipocampo en los días indicados in vitro (DIV) (n = 5).

25 B: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD en neuronas del hipocampo no infectadas y en neuronas del hipocampo infectadas con rAAV que dan lugar a las proteínas indicadas (n = 5).

C: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD, VEGFC, cFos, gapdh, beta tubulina y beta-microglobulina en neuronas de hipocampo cultivadas en DIV10 con o sin tratamiento de DIV5 a DIV10 con TTX 1 μ M (n = 3).

30 D: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD, VEGFC y cFos en neuronas de hipocampo cultivadas con o sin tratamiento durante 2 horas con bicuculina 50 μ M. La escala del eje VEGFD y VEGFC (Y) se muestra a la izquierda; escala del eje cFos (Y) a la derecha (n = 3).

E: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD, VEGFC y cFos en neuronas de hipocampo cultivadas con o sin tratamiento de DIV5 a DIV10 con MK801 10 μ M, nifedipina 10 μ M o ambas (n = 3).

35 F: Análisis de qRT-PCR de la expresión de cFos y VEGFD en neuronas del hipocampo no infectadas y en neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-CaMBP4 con o sin tratamiento con actinomicina D (10 μ g/ml) durante 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 24 horas (n = 3).

G: Análisis de qRT-PCR de la expresión de cFos y VEGFD en neuronas del hipocampo no infectadas y en neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-E1A o rAAV-E1A Δ CR1 con o sin tratamiento durante 2 horas con bicuculina 50 μ M (bic). La escala del eje VEGFD (Y) se muestra a la derecha; escala del eje cFos (Y) a la izquierda (n = 3).

40 H: Análisis de qRT-PCR de la expresión de gapdh, CBP y VEGFD en neuronas del hipocampo con o sin tratamiento de DIV8-DIV13 con los siRNA indicados (n = 3).

45 I-J: Análisis de la longitud dendrítica total y análisis de Sholl de neuronas infectadas con rAAVE1A o rAAV-E1A Δ CR1. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005). Véase también la FIG. 3.

Fig. 3: Expresión de VEGFD en el sistema nervioso y caracterización de VEGFD-HA.

50 A: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD en cultivos de hipocampo no infectados e infectados con rAAV que dan lugar a las proteínas indicadas y analizados en los días indicados in vitro (DIV) (n = 4). Los datos se normalizan a DIV10, que son los mismos datos que se muestran en la FIG. 2B. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, ** p <0,005).

B: Análisis de qRT-PCR de la expresión de Arc, bdnf, cFos, zif268, VEGFC, VEGF y VEGFR3 en cultivos de hipocampo no infectados o infectados con rAAV que dan lugar a las proteínas indicadas y analizados a DIV10 (n = 4).

5 C: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD en el hipocampo y la corteza del ratón a la edad indicada (n = 3). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05).

D: Análisis inmunocitoquímico de VEGFD en neuronas de hipocampo cultivadas usando anticuerpo anti-VEGFD o IgG de conejo normal como control, Hoechst para visualizar los núcleos, se usa NeuN como marcador neuronal. La barra de escala es 20 µm.

10 E: Inmunohistoquímica de VEGFD en la región CA1 del hipocampo de ratones adultos usando anticuerpo anti-VEGFD o IgG de conejo normal como control, Hoechst para visualizar los núcleos, se usa NeuN como marcador neuronal; los paneles superiores muestran fusión. La barra de escala es 50 µm.

F: La región en recuadro indicada en E con mayor aumento. La barra de escala es 20 µm.

15 G: Las neuronas del hipocampo se transfectaron con vectores de expresión para hGGFP y VEGFD marcado con HA; la inmunoreactividad de HA-marcador fue más alta en la región perinuclear. La señal hrGFP se usó para visualizar las neuronas. El panel de fusión se muestra a la derecha. La barra de escala es 20 µm.

H: Análisis de inmunotransferencia de neuronas del hipocampo no infectadas y de neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-VEGFD. La forma inmadura no procesada de VEGFD podría detectarse en el lisado y la forma parcialmente escindida de VEGFD en el medio obtenido de los mismos cultivos a través de su HA-marcador. La inmunotransferencia de tubulina se muestra como control de la carga de proteína.

20 Fig. 4: VEGFD regula la arquitectura dendrítica.

A: Micrografías representativas de neuronas transfectadas con vectores de expresión para las proteínas indicadas con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGFD (100 ng/ml). La barra de escala es 20 µm.

B-D: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total y la densidad de espinas de las neuronas transfectadas, como se indica, con vectores de expresión para hrGFP, CaMBP4, CaMKIVK75E, VEGFD-HA.

25 E-G: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total y la densidad de espinas de neuronas transfectadas con vectores de expresión para hrGFP, CaMBP4, CaMKIVK75E con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGFD. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005). Véase también la FIG. 5.

30 Fig. 5: VEGF y VEGFC no rescataron la morfología dendrítica alterada causada por el bloqueo de señalización del calcio nuclear.

A: Micrografías representativas de neuronas transfectadas con vectores de expresión para las proteínas indicadas con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGF o rVEGFC como se indica (100 ng/ml). La barra de escala es 20 µm.

35 B-C: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total de neuronas transfectadas, como se indicó, con vectores de expresión para hrGFP, CaMBP4, CaMKIVK75E, con o sin tratamiento con rVEGF durante 3 días.

D-E: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total de neuronas transfectadas con vectores de expresión para hrGFP, CaMBP4, CaMKIVK75E con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGFC.

40 Los datos relativos a hrGFP, CaMBP4, CaMKIVK75E sin ningún tratamiento son los mismos que se muestran en B a C y D a E; todas las condiciones se realizaron al mismo tiempo, para mayor claridad se trazan como dos conjuntos separados.

Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, ** p <0,005).

Fig. 6: La supresión mediada por ARNi de la expresión de VEGFD es suficiente para alterar la morfología dendrítica.

A: Representación esquemática del vector de rAAV utilizado para la expresión de ARNhC.

45 B: Análisis de qRT-PCR de la expresión de VEGFD y VEGFC en neuronas del hipocampo no infectadas y en neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-emptymC, rAAV-shVEGFD o con rAAV-shSCR (n = 5).

C: Micrografías representativas de neuronas del hipocampo transfectadas con pAAVemptymC o pAAV-shVEGFD, o con pAAV-shSCR con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGFD (100 ng/ml). La señal de mCherry se usó para visualizar las neuronas. La barra de escala es 20 µm.

D-E: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total de neuronas transfectadas como en C y, cuando se indica, tratadas con rVEGFD. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo.

5 F: Análisis de la longitud dendrítica total de las neuronas transfectadas como en G. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo.

G: Micrografías representativas de neuronas del hipocampo transfectadas con pAAV-hrGFP (vector) o pAAV-VEGFD-HA, o con pAAV-resiVEGFD-HA con o sin co-transfección con pAAV-shVEGFD. La barra de escala es 20 μm .

10 H: Análisis de Sholl de neuronas transfectadas como en G. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$). Véase también la FIG. 7.

Fig. 7: Análisis de neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-emptymC, rAAV-shVEGFD y rAAV-shSCR y del mecanismo de acción autocrino VEGFD.

15 A: Micrografías representativas de cultivos de hipocampo infectados en DIV3 con rAAVemptymC, rAAV-shVEGFD o rAAV-shSCR. En DIV10 las células se fijaron y se tiñeron con Hoechst (paneles izquierdos) para visualizar los núcleos; la señal de mCherry (paneles de la derecha) identifica las células infectadas y se usó para determinar las tasas de infección. Las imágenes de fusión se muestran a la derecha. La barra de escala es 20 μm .

20 B: Análisis de inmunotransferencia de neuronas hipocampales no infectadas y de neuronas del hipocampo infectadas con los rAAV indicados. rAAV-emptymC, rAAV-shVEGFD y rAAV-shSCR llevan todos los casetes mCherry que se usaron para la detección a través de un anticuerpo anti-DsRed. La inmunotransferencia de tubulina se muestra como control de la carga de proteína.

25 C: Análisis de inmunotransferencia de la expresión de VEGFD en neuronas del hipocampo no infectadas y en neuronas del hipocampo infectadas con las rAAV indicadas. La tubulina se utilizó para el control de carga. Las neuronas infectadas con rAAV-emptymC, rAAV-shVEGFD y rAAV-shSCR se detectaron mediante inmunotinción con DsRed (véase más arriba).

D: Análisis de la respuesta del interferón usando un gen informador Mx2:luc en neuronas del hipocampo 30 horas después de la transfección. pAAV-shVEGFD no indujo una respuesta de interferón; poli (I:C) se usa como control positivo del ensayo. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* $p < 0,05$).

30 E: Análisis de la apoptosis de cultivos de hipocampo no infectados o infectados con los rAAV indicados. Los valores se expresan como porcentaje del número total de células analizadas.

F: Análisis de la longitud dendrítica total de las neuronas transfectadas con diferentes secuencias de ARNhc (indicadas como '1', '2', '3') dirigidas a VEGFD. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada constructo. A lo largo de la aplicación se usó la construcción en este documento referida como shVEGFD ('1'). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (** $p < 0,005$).

35 G: Micrografías representativas de cultivos de hipocampo no infectados o infectados en DIV3 con rAAV-VEGFD marcado con HA. En DIV8 las células se transfectaron con pAAV-emptymC, pAAV-shSCR o pAAV-shVEGFD como se indica. En DIV13, los cultivos se fijaron y se tiñeron con Hoechst (paneles izquierdos) para visualizar los núcleos; HA para visualizar las neuronas infectadas con rAAV-VEGFD, la señal de mCherry identifica las células transfectadas y se usó para el análisis morfométrico. Las imágenes de fusión se muestran a la derecha. La barra de escala es 20 μm .

40 H-I: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total de neuronas infectadas y transfectadas como en G. 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes se examinaron para cada condición. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (*** $p < 0,0005$).

45 Fig. 8: La supresión mediada por ARNi de VEGFR3 causa el mismo fenotipo de arborización dendrítica simplificado observado al silenciar VEGFD.

A: Análisis de qRT-PCR de la expresión normalizada a células no infectadas de VEGFD, VEGF, VEGFC y VEGFR3 en neuronas del hipocampo no infectadas y en neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-emptymC, rAAV-shVEGFD, rAAV-shVEGF, rAAV-shVEGFC o con rAAV-shVEGFR3 ($n = 3$)

50 B: Micrografías representativas de neuronas del hipocampo transfectadas con pAAVemptymC, pAAV-shSCR, pAAV-shVEGFD, pAAV-shVEGF, pAAV-shVEGFC o con pAAV-shVEGFR3. La señal de mCherry se usó para visualizar las neuronas. La barra de escala es 20 μm .

C-D: Análisis de Sholl y análisis de la longitud dendrítica total de neuronas transfectadas como en C. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada construcción. Las diferencias

estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, *** p <0,0005).

Fig. 9: Eventos de señalización inducidos por VEGFD.

A: Análisis de inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos de fósforo de las neuronas del hipocampo con o sin tratamiento con rVEGFD durante los tiempos indicados. La tubulina se usó como control de carga.

5 B: Cuantificación del experimento que se muestra en A. El tratamiento con rVEGFD causa un aumento significativo de CREB, ERK1/2 y la fosforilación de la p38 MAP quinasa. Todos los valores se expresan como porcentaje de controles no tratados (n = 5).

10 C: Análisis inmunocitoquímico utilizando anticuerpos específicos de fósforo-CREB de neuronas del hipocampo con o sin tratamiento con rVEGFD durante los tiempos indicados. Los núcleos de las células se contratiñeron con Hoechst 33258; NeuN se usó como un marcador neuronal. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala es 20 μ m.

D: Análisis de la longitud dendrítica total de neuronas transfectadas con vectores de expresión para hrGFP, CaMBP4, CaMKIVK75E con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGFD y/o SB203580. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada condición experimental.

15 E: Análisis Sholl de neuronas transfectadas y tratadas como en D. Los datos de análisis de Sholl de neuronas que expresan hrGFP, CaMBP4 o CaMKIVK75E y tratados con SB203580 no mostraron diferencias en comparación con los controles no tratados respectivos y se omitieron del gráfico para mayor claridad.

20 F: Análisis de la longitud dendrítica total de neuronas transfectadas con vectores de expresión para hrGFP, CaMBP4, shSCR, shp38alpha o shp38beta (como se indica) con o sin tratamiento durante 3 días con rVEGFD. Se examinaron 12 neuronas de un mínimo de 3 preparaciones independientes para cada condición experimental. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005).

Fig. 10: El análisis MEA y patch clamp revela actividad reducida, área de superficie y transmisión sináptica en neuronas que expresan shVEGFD.

25 A: Análisis MEA de las frecuencias de pico absoluto de las neuronas hipocámpales no infectadas y las neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-emptymC, rAAV-shVEGFD y rAAV-shSCR. Cuando se indicó, los cultivos se trataron en DIV6 con 100 ng/ml de rVEGFD. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (* p <0,05, *** p <0,0005).

B: Diagrama de dispersión que muestra la distribución y la media (barra horizontal) de la capacitancia de membrana (Cm) de las neuronas transfectadas e infectadas que expresan shVEGFD o shSCR.

30 C: mEPSCs representativos promediados de 160 a 220 eventos en una célula transfectada con pAAV-shVEGFD y pAAV-shSCR que muestra el promedio sin procesar anterior y el promedio escalado siguiente.

D: Respuestas representativas a la aplicación en baño de AMPA (10 μ M, barra negra o roja) en presencia de ciclotiazida (20 μ M), TTX (1 μ M) y gabazina (5 μ M) registradas a partir de células transfectadas con pAAV-shVEGFD y pAAV-shSCR.

35 E-G: Diagramas de dispersión que muestran la distribución y la media (barra horizontal) del intervalo entre eventos de mEPSC (IEI) (E), amplitud de mEPSC (F) y respuesta de AMPA (G). Obsérvese la escala logarítmica del eje de ordenadas en E y F. Se indican las diferencias significativas entre las células que expresaban shVEGFD y sus respectivos controles que expresaban shSCR transfectadas o infectadas (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001 usando dos pruebas de muestra de Kolmogorov-Smirnov, n = 26 a 31 células por grupo).

40 Véase también la Tabla 1.

Fig. 11: La supresión mediada por ARNi de la expresión de VEGFD in vivo afecta la morfología dendrítica y altera la formación de la memoria.

45 A: neuronas piramidales CA1 teñidas en Golgi de los hemisferios ipsilateral y contralateral de ratones inyectados estereotáxicamente en el hipocampo con rAAVshVEGFD, rAAV-emptymC o rAAV-shSCR. Se muestran trazados representativos del árbol dendrítico basal. La barra de escala es 10 μ m.

B-C: Análisis Sholl y análisis de la longitud dendrítica total de neuronas piramidales teñidas en CA1 Golgi del hipocampo ipsilateral y contralateral de ratones inyectados estereotáxicamente en el hipocampo con las construcciones indicadas. Se analizaron 20 neuronas para cada condición obtenidas de 4 animales inyectados por construcción.

50 D: Latencia media de escape durante la adquisición de la versión de plataforma oculta del laberinto de agua de Morris (rAAV-shVEGFD, n = 8; rAAV-shSCR n = 7).

E: Promedio de tiempo de permanencia en cada cuadrante durante la prueba de prueba del laberinto de agua de Morris. T, cuadrante objetivo; CW, cuadrante en el sentido de las agujas del reloj en relación con el objetivo; CCW, cuadrante en sentido antihorario en relación con el objetivo; O, cuadrante opuesto en relación con el objetivo (rAAV-shVEGFD, n = 8; rAAV-shSCR n = 7).

5 F: Velocidad media de nado durante la adquisición de la versión de plataforma oculta del laberinto de agua de Morris (rAAV-shVEGFD, n = 8; rAAV-shSCR n = 7).

G: Latencia media de escape durante la adquisición de la versión de plataforma visible del laberinto de agua de Morris (rAAV-shVEGFD, n = 8; rAAV-shSCR n = 7).

10 H: Memoria de miedo contextual a largo plazo. Los ratones fueron inyectados con rAAV-shVEGFD o rAAV-shSCR; los resultados se expresan como el porcentaje de tiempo que se pasa inmóvil durante la prueba de memoria contextual (24 horas después del entrenamiento). (rAAV-shVEGFD, n = 10; rAAV-shSCR, n = 11).

I: Velocidad de movimiento durante los 2 segundos del choque eléctrico en el pie suministrado en la sesión de entrenamiento de los animales representados en H (rAAV-shVEGFD, n = 10; rAAV-shSCR n = 11).

15 J: Distancia recorrida durante la exposición inicial de 2,5 minutos a la cámara de entrenamiento de los animales representados en H (rAAV-shVEGFD, n = 10; rAAV-shSCR n = 11).

Las diferencias estadísticamente significativas (ANOVA seguido de la prueba posthoc de Tukey para ANOVA morfométrico de medidas repetidas y ANOVA de una vía seguido por la prueba posthoc de Tukey para el laberinto de agua de Morris y la prueba t de Student para el análisis conductual) se indican con asteriscos (** p <0,005, *** p <0,0005).

20 Véase también la FIG. 12.

Fig. 12: Análisis del hipocampo de ratones inyectados estereotáxicamente con rAAV-shVEGFD y rAAV-shSCR.

25 Inmunohistoquímica de la expresión de VEGFD en la región CA1 del hipocampo de ratones adultos inyectados estereotáxicamente con rAAV-shVEGFD o rAAVshSCR usando un anticuerpo anti-VEGFD. Hoechst se usó para visualizar los núcleos; la fluorescencia de mCherry se usó para detectar neuronas infectadas. La barra de escala es 50 µm.

Fig. 13: Exploración de la actividad de una biblioteca de péptidos sintéticos que contiene un motivo de secuencia de VEGF-D y péptidos que se varían de forma sistemática. A: Péptidos 1 a 37; B: péptidos 38 a 79; C: péptidos 80 a 96.

30 Fig. 14: La sobreexpresión de CaMBP4 (péptido de unión a Calcio/Calmodulina 4) da como resultado una disminución de la longitud dendrítica y la complejidad que puede recuperarse a niveles normales mediante el tratamiento con rVEGFD.

Fig. 15: Capacidad de seis péptidos sintéticos para rescatar la reducción de la longitud y la complejidad de la dendrita causada por la expresión de CaMBP4.

Fig. 16: Análisis morfométrico de neuronas hipocampales primarias transfectadas con hrGFP y CaMBP4 y tratadas con péptidos.

35 A: Longitud dendrítica total. B: Complejidad dendrítica medida por el número de cruces frente a la distancia desde el soma.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos sin ninguna limitación a los mismos.

Ejemplos

Materiales y métodos

40 Cultivos del hipocampo y transfección. Las neuronas del hipocampo de ratones C57BL/6 recién nacidos se cultivaron como se conoce en la técnica. Los experimentos se realizaron después de un período de cultivo de 10 a 14 días in vitro (DIV). La transfección de ADN se realizó en DIV8 utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, San Diego, CA). Para los estudios sobre la morfología de la dendrita, las neuronas se analizaron 4-5 días después de la transfección.

45 Suministro estereotáxico de rAAVs. Los rAAV se administraron mediante inyección estereotáxica en el hipocampo dorsal derecho de ratones C57BL/6 machos de 2 meses de edad. Para el análisis morfométrico basado en la tinción de Golgi, las partículas virales se inyectaron unilateralmente durante un período de 20 min en las siguientes coordenadas relativas a Bregma: anteroposterior, -2,1 mm; mediolateral, -1,4 mm; dorsoventral, -1,4 a -1,8 mm desde la superficie del cráneo. Para experimentos de comportamiento, los ratones fueron inyectados bilateralmente.

50 Análisis morfométricos. Para el análisis 3D Sholl, la longitud dendrítica total y la morfología de espinas se calcularon

utilizando el software gratuito Object-Image con un conjunto específico de macros (escrito por el Dr. E. Ruthazer, McGill University, Quebec). Brevemente, se importó una adquisición de z-Stack, se calibró en Object-Image y se trazó manualmente. La longitud dendrítica total se calculó. Para el análisis Sholl, el intervalo de shell se estableció en 5 μm . Todos los análisis se realizaron a ciegas. En todos los experimentos in vitro, para cada condición, se analizó un mínimo de 12 neuronas de tres preparaciones independientes. Para la tinción de Golgi se rastrearon y analizaron cuantificaciones de 20 neuronas para cada condición de 4 animales inyectados diferentes por construcción viral.

Grabaciones MEA.

Las grabaciones MEA se realizaron como se conoce en la técnica. Desde DIV7 hasta DIV13, se adquirieron grabaciones de actividad de red espontánea durante 5 minutos una vez al día.

Grabaciones Patch Clamp.

Se realizaron registros de patch clamp de células enteras a temperatura ambiente de neuronas cultivadas del hipocampo colocadas en cubreobjetos asegurados con un anillo de platino en una cámara de registro (cámara de acceso abierto-1, Science Products GmbH, Hofheim, Alemania) montada en un microscopio vertical de etapa fija (BX51WI, Olympus, Hamburgo, Alemania). Se usaron ópticas de contraste de interferencia diferencial, iluminación infrarroja y una cámara CCD (PCO, Visitron Systems, Puchheim, Alemania) conectadas a una unidad de mejora de contraste (Argus, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, Alemania) para ver las neuronas en un monitor de video. Las grabaciones se realizaron con un amplificador Multiclamp 700A, digitalizado a través de un convertidor Digidata 1322A ND y adquirido mediante el software pClamp (Molecular Devices, CA, EE.UU.). Todos los potenciales de membrana han sido corregidos para el potencial de unión calculado de -11 mV (programa JPCalc del Dr. Peter H. Barry). Se registraron mEPSCs y respuestas AMPA de células completas (10 μM , 6 ml/min, Biotrend) como se conoce en la técnica excepto para las soluciones y se utilizó un potencial de retención de -71 mV y ambas TTX (1 μM , Biotrend, Colonia, Alemania) y gabazina (5 μM , Biotrend) se incluyeron en el ACSF. Se aplicó TTX antes de la gabazina para evitar la inducción del estallido del potencial de acción. Se monitoreó el acceso (intervalo: 7-18 MU) y la resistencia de la membrana (véase Tabla 1) antes y después de las grabaciones mEPSC y los datos fueron rechazados si ocurrían cambios mayores al 20%.

Experimentos de comportamiento. Los experimentos de comportamiento comenzaron tres semanas después del suministro estereotóxico de VAAr. Los ratones se habituaron a la sala experimental y se manipularon una vez al día durante tres días consecutivos antes de que comenzaran las pruebas. Se usaron dos conjuntos diferentes de ratones para el laberinto de agua de Morris y experimentos contextuales de acondicionamiento de miedo. Al final de los experimentos, se evaluó la infección del virus.

Laberinto de agua de Morris. Los ratones se probaron primero en la versión de plataforma oculta y luego en la versión de plataforma visible del laberinto de agua. El laberinto de agua consistía en una piscina circular (120 cm de diámetro) llena de agua opaca (el agua se hizo opaca con pintura blanca no tóxica). La plataforma (10 cm de diámetro) se sumergió 1 cm por debajo del nivel del agua. El primer día de la versión de plataforma oculta, los ratones se habituaron al agua y la plataforma para dos pruebas de 60 segundos. En cada prueba de habituación, a los ratones se les permitió nadar durante 30 segundos y luego se colocaron en la plataforma durante otros 30 segundos. Durante la fase de adquisición, los ratones se colocaron cuatro veces al día en una piscina con una plataforma sumergida situada en una posición fija (aproximadamente 5 minutos entre intervalos de prueba) durante cuatro días. Cada prueba de entrenamiento duró un máximo de 60 segundos, y cuando los ratones no encontraron la plataforma, se les colocó en ella y se les permitió estar durante 20 segundos. El quinto día, los ratones realizaron una prueba de 60 segundos, para la cual la plataforma no estaba situada en la piscina. Esto fue seguido por cuatro días más de entrenamiento. Una segunda prueba se hizo en el décimo día. En la versión de la plataforma visible, los ratones fueron entrenados para encontrar la plataforma usando una señal visible proximal (bola roja colocada a 10 cm por encima de la plataforma). Todas las otras señales visuales se eliminaron de la sala y la ubicación de la plataforma fue diferente en cada prueba. La capacitación consistió en cuatro ensayos al día durante tres días consecutivos. Cada prueba duró un máximo de 60 segundos y cuando los ratones no encontraban la plataforma se colocaron sobre ella durante 20 segundos. La ruta del ratón se grabó utilizando un sistema de seguimiento de video (ANY-Maze, Stoelting, Irlanda).

Condicionamiento de miedo contextual. En el día de entrenamiento, los ratones se colocaron en la cámara de acondicionamiento (23 \times 23 \times 35 cm, TSE, Bad Homburg, Alemania) y recibieron un choque de pie revuelto de 2 segundos y 0,5 mA 148 segundos después de la colocación en la cámara. Los ratones se retiraron de la cámara 30 segundos después del choque. Durante la prueba, los ratones recibieron una exposición de 5 minutos en el mismo contexto en ausencia de choque en el pie 24 horas después del acondicionamiento. La congelación, definida como la ausencia de movimiento a excepción de la respiración, se calificó de manera continua durante el entrenamiento y las sesiones de prueba.

Análisis de los datos. Todos los datos representados representan la media \pm SEM. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba post hoc de Tukey se utilizó para los análisis estadísticos, excepto que se indique lo contrario. En aquellos experimentos en los que solo se probaron dos condiciones, las comparaciones se realizaron

utilizando una prueba t de Student para muestras independientes. En el experimento del laberinto de agua de Morris, se usaron ANOVA de medidas repetidas y ANOVA de una vía para analizar curvas de adquisición y pruebas de sonda, respectivamente.

5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc. Se aisló el ARN total en DIV10 a DIV13 de cultivos de neuronas primarias de hipocampo o tejidos cerebrales aislados con Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) que incluye un tratamiento opcional con Dnasa I a temperatura ambiente durante 15 min según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Se transcribieron inversamente 1,2 µg de ARN extraído en ADNc de la primera cadena usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA).

10 PCR cuantitativa en tiempo real. La PCR de transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR) se realizó en un termociclador ABI7300 usando una mezcla maestra de qRT-PCR universal con ensayos de expresión génica TaqMan para los genes indicados (Applied Biosystems). Los siguientes ensayos de expresión génica TaqMan se usaron en este estudio: Gusb (Mm00446953_m1), cFos (Mm00487425_m1), VEGFD (Mm00438965_m1), VEGFF (Mm01202432_m1), VEGF (Mm01281449_m1), VEGFR3 (Mm01292618_m1), beta-actina (Mm00607939_s1), beta-2 microglobulina (Mm00437762_m1), CBP (Mm01342435_m1), p38 MAPK alfa (Mm00442497_m1), p38 MAPK beta (Mm00440955_m1). La expresión de genes diana se normalizó frente a la expresión de Gusb como gen de control endógeno. Los datos se derivaron de al menos 5 experimentos independientes.

15 Virus adeno-asociados recombinantes. Los vectores usados para construir y empaquetar rAAV se han descrito en la técnica. rAAV-CaMKIVK75E, rAAV-LacZ y rAAV-CaMBP4 generan todas las proteínas marcadas con Flag que se han caracterizado previamente en la técnica. El ADNc que codifica VEGFD de ratón, VEGFD de ratón resistente a shVEGFD, E1A y E1AΔCR1 fusionado a la secuencia que codifica un marcador de HA se clonaron en el mismo vector de VAAr mediante técnicas de biología molecular estándar y se verificaron mediante secuenciación. Las partículas virales se produjeron y purificaron como se conoce en la técnica. Para la infección viral, las neuronas se infectaron con $2-5 \times 10^9$ partículas/ml en DIV3 y se cosecharon en DIV10. Las eficacias de infección se determinaron inmunocitoquímicamente y mediante inmunotransferencia usando anticuerpos para el marcador apropiado o
25 analizando la fluorescencia de mCherry y variando de 80 a 95 por ciento de la población neuronal.

ARN corto de horquilla y el silenciamiento mediado por ARN interferente pequeño. Para la expresión de ARNhc, se utilizó un vector rAAV que contenía el promotor U6 para la expresión de ARNhc y un promotor CaMKII que dirigía la expresión de mCherry. Se obtuvieron tres secuencias diferentes de Open Biosystems (shVEGFD 1, shVEGFD 2 y shVEGFD 3), se clonaron y se probó la eficacia del silenciamiento. shVEGFD (1) (GGGCTTCAGGAGCGAACAT; SEQ ID NO: 1) se seleccionó como el más potente. Como control, se usaron una versión de mezcla de esta secuencia (shSCR; GTGCCAAGACGGGTAGTCA; SEQ ID NO: 2) y el vector que llevaba solo el mCherry (emptyC). Shp38alpha (AAACACGAAAATGTGATTGGT; SEQ ID N°: 3), shp38beta (AAGCACGAGAACGTCATAGGA; SEQ ID N°: 4), shVEGF (ACCTACCAAAGCCAGCAC; SEQ ID N°: 5), shVEGFC (GTTTCATTCCATTATTAGAC; SEQ ID N°: 6) y shVEGFR3 (CCCAGTATTGTGTGGTACAAA; SEQ ID NO: 7, secuencia obtenida de Open Biosystems www.openbiosystems.com) también se clonaron en el mismo vector. El nivel de expresión de CBP se eliminó utilizando un conjunto de cuatro ARN cortos de interferencia (ARNip) dirigidos a CBP de ratón (siARN de Accell SMARTpool, Thermo Scientific Dharmacon). El SMARTpool es un grupo de cuatro siRNAs que se han evaluado para reducir una variedad de posibles efectos fuera de objetivo, incluido la inclusión de motivos de semillas similares a miRNA (microRNA). El silenciamiento de GAPDH se midió usando Accell ratón GAPDH como control positivo, y como control negativo, se utilizó un conjunto de ARNip de ratón Accell no dirigido. Además, también se usó un ARNip de ratón Accell no dirigido marcado con fluorescencia para evaluar la eficacia de penetración en neuronas del hipocampo mediante inmunocitoquímica. Brevemente, siRNAs 500 nM se complementaron en el medio de cultivo libre de suero en DIV8, y los niveles de mRNA se analizaron en DIV13.

45 Inmunocitoquímica. Las neuronas del hipocampo se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para la inmunotinción, se aplicaron anticuerpos primarios y secundarios en tampón GDB (tampón de fosfato 30 mM [pH 7,4] que contenía gelatina al 0,2%, Triton X-100 al 0,5% y NaCl 0,9 M). Para los análisis morfológicos, las imágenes de fluorescencia se adquirieron usando un microscopio de escaneo láser confocal TCS SP2 (Leica, Mannheim, Alemania) equipado con un microscopio de fluorescencia invertido DM IRE2 (Leica) y el software de escaneo confocal Leica. Todas las imágenes se obtuvieron con configuración de adquisición secuencial a una resolución de 1024 × 1024 píxeles. Cada imagen era una proyección en serie z de imágenes
50 tomadas a intervalos de 1 µm.

Inmunohistoquímica. Los animales se anestesiaron profundamente con Nembutal, se perfundieron con antelación transcardiacamente con PBS y se perfundieron con formalina al 10% tamponada con fosfato neutro (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). Los cerebros se retiraron y se fijaron posteriormente durante la noche en la misma solución de fijación. Para la crioprotección, los cerebros se incubaron durante 2 días en sacarosa al 30% en tampón de fosfato 0,1 M que contenía timerosal al 0,04% (Sigma). Se recogieron secciones congeladas de 40 µm de grosor, se cortaron a -20°C, y se recogieron en PBS que contenía timerosal al 0,04%. Las neuronas se identificaron mediante inmunotinción de NeuN (1:500, monoclonal de ratón, Chemicon); VEGFD se detectó con un anticuerpo producido contra el precursor inmaduro (1:250, policlonal de conejo, Santa Cruz). Las secciones se bloquearon en BSA al 1%, suero de cabra normal al 5% (NGS), tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, se incubaron con anticuerpo primario diluido en BSA al 1% y suero de cabra normal al 1% (NGS), 0,1% de Triton X-100
60

a 4°C, durante la noche. Las secciones se enjuagaron dos veces con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario en la misma solución que el anticuerpo primario. Las secciones se incubaron en Hoechst 33258 (1:5000) durante 5 minutos, se enjuagaron dos veces con agua destilada y luego se montaron en portaobjetos de vidrio.

- 5 Tinción de Golgi. La impregnación de Golgi se realizó con un kit de tinción Rapid Golgi (FD Neuro Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se adquirieron pilas Z de neuronas CA1 teñidas de Golgi con un objetivo 20x montado en un microscopio automático vertical Eclipse 90i de Nikon con un intervalo de 5 µm.

- 10 Ensayo del informador de respuesta al interferón. El plásmido informador Mx2:luc que contenía el elemento de respuesta Mx2 se co-transfectó con un pAAV que contenía un casete de expresión para luciferasa de Renilla para la normalización más pAAV-shVEGFD o poliinosina-ácido policitidílico (poli(I:C)), (Sigma); se sabe que la poli (I:C) transfectada en las células induce una fuerte respuesta al interferón. Las neuronas se recogieron 30 horas después de la transfección. Las actividades de luciferasa se midieron con el kit de Ensayo Dual-luciferasa (Promega, Mannheim, Alemania). Los datos se derivan de tres experimentos independientes, cada uno realizado en duplicados.

- 15 Animales. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices alemanas para el cuidado y el uso de animales de laboratorio y la Directiva 86/609/CEE del Consejo de la Comunidad Europea correspondiente.

- 20 Grabaciones Patch Clamp. Se hicieron electrodos Patch (3-4 MU) de vidrio de borosilicato (1,5 mm, WPI, Sarasota, Fla., EE.UU.) y se rellenaron de solución intracelular (que contenía en mM: KCH₃SO₄, 145; NaCl, 8; HEPES, 10; K₂-fosfocreatina, 10; Mg₂-ATP, 4; Na₃-GTP, 0,3; pH 7,35 con KOH). La solución extracelular fue un líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, en mM: NaCl, 125; KCl, 3,5; MgCl₂, 1,3; NaH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 2,4; glucosa, 25; NaHCO₃, 26; gaseado con 95 % O₂ y 5% CO₂).

Reactivos. Se usaron los siguientes medicamentos: TTX (Biotrend, Colonia, Alemania), Bicuculina (Alexis Biochemicals, Gruenberg, Alemania), MK801 (Tocris), Nifedipina (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania), Actinomicina D (Applichem, Darmstadt, Alemania), VEGFD recombinante de ratón, (R & D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania), VEGF de ratón recombinante y VEGFC (Biocat, Heidelberg, Alemania).

- 25 Anticuerpos. Anticuerpo monoclonal de ratón para tubulina (Sigma); anticuerpo NeuN monoclonal de ratón (Chemicon); anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfo-p38 MAP quinasa (BD); anticuerpos policlonales de conejo para el marcador HA, anticuerpos anti-VEGFD, anti-VEGFR3 (Santa Cruz); anticuerpo policlonal de conejo para fósforo-CREB (Upstate-Millipore); anticuerpo policlonal de conejo para fósforo-CaMKII (Promega); anticuerpos policlonales de conejo para fósforo-MSK1, fósforo-ATF2, fósforo-ERK, fósforo-Akt, fósforo-MKK4, fósforo-JNK, fósforo-p70, fósforo-GSKα/β (Cell Signaling). Anticuerpos policlonales de conejo para DsRed (Clontech). Los anticuerpos secundarios marcados con AlexaFluor 488, AlexaFluor 594 y AlexaFluor 633 fueron de Molecular Probes (Eugene, Oregón, EE.UU.).

Ejemplo 1: El calcio nuclear controla la geometría de la dendrita y la densidad de las espinas

- 35 Para investigar el papel de la señalización nuclear de calcio en la regulación de la arquitectura dendrítica, se expresó CaMBP4 en los núcleos de las neuronas del hipocampo. CaMBP4 contiene cuatro repeticiones del péptido de unión a calmodulina M13 (CaM) derivado de la cinasa de cadena ligera de miosina de músculo esquelético de conejo. CaMBP4 inactiva eficazmente el complejo calcio/CaM nuclear y bloquea las respuestas genómicas inducidas por la señalización nuclear de calcio. Los análisis morfométricos revelaron que, en comparación con el control, las neuronas del hipocampo que expresan CaMBP4 junto con la proteína fluorescente verde Renilla Reniformis humanizada (hrGFP) para visualizar las células, mostraron una disminución significativa tanto en la longitud dendrítica total como en la complejidad de las dendritas evaluadas por el análisis Sholl (Figuras 1 A a C). La expresión de CaMBP4 también causó una disminución significativa en la densidad de la espina dendrítica (Figura 1 D a E), y un considerable acortamiento y adelgazamiento de las espinas restantes (Figuras 1F a G). Se observó una reducción similar en la longitud dendrítica total, complejidad dendrítica y tamaño y densidad de las espinas en neuronas del hipocampo que expresaban CaMKIVK75E, un mutante dominante negativo de CaMKIV (Figura 1). Estos resultados indican que el calcio nuclear es una señal importante en el control de la geometría dendrítica y la densidad de las espinas.

Ejemplo 2: La señalización de calcio-CaMKIV nuclear regula la expresión de VEGFD

- 50 A continuación se intentó identificar genes regulados por calcio/CaMKIV nuclear que mediaban los cambios estructurales observados. El examen de los datos del transcriptoma obtenidos de las neuronas del hipocampo que expresaban CaMBP4 insinuaba al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D (VEGFD) como un posible candidato. VEGFD es bien conocido por su papel en la angiogénesis y linfangiogénesis en tejidos sanos y en varios tipos de cáncer. VEGFD es detectable en el sistema nervioso pero no se ha descrito una función para este factor secretado en las neuronas, aunque otros dos miembros de la familia VEGF, VEGF (también conocido como VEGFA) y VEGFC, se han implicado en la neurogénesis y la maduración de las neuronas de los recién nacidos. El análisis cuantitativo de PCR de transcriptasa inversa (qRT-PCR) reveló que VEGFD se expresa en neuronas del hipocampo cultivadas, y alcanza niveles máximos de expresión después de un período de cultivo de 10 a 13 días (Figura 2A, 3A). El ARNm de VEGFD y la proteína son detectables en neuronas cultivadas e in vivo en diferentes etapas de desarrollo en el

hipocampo y la corteza del ratón (Figuras 3 C a F). La expresión de VEGFD es significativamente menor en neuronas del hipocampo infectadas con un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que contiene un casete de expresión para CaMBP4 (rAAV-CaMBP4) o CaMKIVK75E (rAAV-CaMKIVK75E) que en neuronas no infectadas o en neuronas infectadas con un rAAV que expresa LacZ (rAAV-LacZ) (Figura 2B, 3A). Los niveles de expresión de muchos otros genes, que incluyen otros miembros de la familia VEGF, no se vieron afectados por CaMBP4 o CaMKIVK75E (Figura 3B). El neurotropismo de estos rAAVs se dirige específicamente a las neuronas sobre la glía, lo que indica que la modulación de la expresión de VEGFD está restringida a las neuronas.

Para investigar una posible contribución de la actividad neuronal a la expresión de VEGFD, las neuronas cultivadas del hipocampo se trataron con TTX durante 5 días (desde el día 5 in vitro hasta el punto temporal del análisis de expresión génica el día 10 in vitro). Se encontró que, en comparación con los controles, este tratamiento reducía la expresión de VEGFD y también la de cFos, un marcador de la actividad neuronal bien caracterizado (Figura 2C). Para varios otros genes analizados en paralelo, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión después del tratamiento con TTX (figura 2C). Dada la duración prolongada del tratamiento con TTX, no se puede descartar la posibilidad de que la reducción observada en la expresión de VEGFD pueda ser causada indirectamente por efectos secundarios. Para determinar si los niveles de ARNm de VEGFD se ven afectados por un aumento en la actividad sináptica, las neuronas del hipocampo se expusieron al bloqueador del receptor GABAA bicuculina. Este tratamiento alivia la inhibición tónica, mediada por el receptor GABAA, de la transmisión sináptica de la red del hipocampo e induce ráfagas de potenciales de acción (Aps). El tratamiento con bicuculina causó una inducción robusta de mRNA de cFos pero no alteró los niveles de mRNA de VEGF o VEGFD (figura 2D). Para investigar la implicación de los receptores NMDA y los canales de calcio dependientes de voltaje en la expresión de VEGFD, las neuronas del hipocampo se trataron con el bloqueador del receptor NMDA MK801 y/o nifedipina, un bloqueador de canales de calcio de tipo L dependientes del voltaje. Tanto MK801 como nifedipina redujeron significativamente la expresión del ARNm de VEGFD; el tratamiento con una combinación de ambos bloqueadores de los canales produjo la mayor reducción en los niveles de ARNm de VEGFD (Figura 2E). Estos resultados indican que la expresión de VEGFD está controlada por la actividad neuronal basal a través de un mecanismo que es iniciado por los receptores NMDA y los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L y requiere una señalización nuclear de calcio-CaMKIV.

Debido a que la reducción observada de los niveles de ARNm de VEGFD después de la inhibición de la señalización nuclear de calcio podría deberse a un cambio en la estabilidad del ARNm de VEGFD, se determinó a continuación la vida media del ARNm de VEGFD. Los niveles de mRNA de VEGFD, y en paralelo los de cFos, se midieron en neuronas hipocámpales infectadas con rAAV-CaMBP4 y no infectadas antes y en diversos momentos (0,5 h a 24 h) después del tratamiento de las células con actinomicina D, un inhibidor de la transcripción génica. Se encontró que el ARNm de VEGFD tiene una vida media de más de 24 horas en neuronas del hipocampo no infectadas; se observó una velocidad de desintegración virtualmente idéntica para VEGFD en neuronas infectadas con rAAV-CaMBP4 (Figura 2F), aunque en comparación con los controles no infectados, las cantidades absolutas de ARNm de VEGFD en estas neuronas fueron más bajas (véase también la Figura 2B, 3A). El análisis del ARNm de cFos reveló una vida media de menos de 1 hora (figura 2F). Estos resultados indican que la regulación de la expresión de VEGFD por señalización de calcio nuclear tiene lugar al nivel de la transcripción de genes en lugar de a nivel postranscripcional.

Ejemplo 3: CBP regula la expresión de VEGFD

El análisis in silico utilizando TESS (Transcription Element Search System, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) de una región reguladora de 2000 pares de bases aguas arriba del gen murino VEGFD reveló una gran cantidad de posibles sitios de unión para varios factores de transcripción que incluyen el complejo AP-1, NF-AT, MEF-2, HNF, NF-κB, POU2-Oct y HNF4. Sin embargo, parece faltar un elemento de respuesta de cAMP (CRE), lo que sugiere que la regulación de VEGFD mediada por calcio-CaMKIV nuclear tiene lugar por factores de transcripción distintos de CREB, el objetivo prototípico de esta vía de señalización. Debido a que la actividad del coactivador transcripcional CBP está controlada por el calcio nuclear y CaMKIV, el papel de CBP en la regulación de VEGFD se probó a continuación. CBP interactúa con una variedad de factores de transcripción, que incluye algunos de aquellos para los que se han identificado sitios de unión putativos en el gen VEGFD (véase más arriba). Además, se ha sugerido una contribución de CBP a la regulación del promotor de VEGFD humano en células cancerosas. Para investigar directamente un posible papel de CBP en la regulación del gen de VEGFD endógeno en neuronas del hipocampo, las neuronas se infectaron con un rAAV que expresaba la proteína de adenovirus E1A. E1A se une a CBP a través de su región conservada amino terminal 1 (CR1) y altera la función de CBP. Como se esperaba, la expresión de E1A mediada por rAAV bloqueaba el aumento inducido por estallido de AP en la expresión de cFos (figura 2G), un objetivo conocido del complejo del factor de transcripción CREB/CBP. La expresión de E1A también redujo significativamente los niveles de ARNm de VEGFD (Figura 2G). La infección de las neuronas del hipocampo con un rAAV que expresaba una versión mutante de E1A (E1AΔCR1) que carece de CR1 y no puede interactuar con CBP no tuvo ningún efecto sobre la regulación de cFos o la transcripción de VEGFD (Figura 2G). La interferencia de ARN (ARNi) también se usó para disminuir específicamente los niveles de ARNm de CBP en neuronas del hipocampo (Figura 2H). Esto causó una reducción significativa de los niveles de ARNm de VEGFD (Figura 2H), confirmando el papel de CBP en la modulación de la transcripción de VEGFD. Un análisis morfométrico reveló que las neuronas del hipocampo que expresan E1A tienen árboles dendríticos más cortos y simplificados en comparación con las neuronas que expresan E1AΔCR1 (Figuras 2 I a J). Estos resultados indican que CBP actúa corriente abajo de la señalización de calcio-CaMKIV nuclear para regular la expresión de VEGFD en las neuronas

del hipocampo.

Ejemplo 4: VEGFD restaura la complejidad de las dendritas, pero no la densidad de espinas en las neuronas agotadoras de la señalización del calcio nuclear

5 Para investigar si VEGFD interviene en la mediación de los efectos de la señalización de calcio-CaMKIV nuclear sobre la estructura neuronal, se transfectaron o se infectaron neuronas del hipocampo, respectivamente, con un plásmido de rAAV (pAAV-VEGFD) o un rAAV (rAAVVEGFD) que contenía un casete de expresión para VEGFD marcado con HA, o las neuronas se trataron con VEGFD recombinante (rVEGFD). La expresión de VEGFD marcado con HA se detectó inmunocitoquímicamente y mediante inmunotransferencia en neuronas hipocámpales infectadas con rAAV-VEGFD y en los medios de cultivo (Figura 3 G, H). Aunque la expresión de VEGFD-HA o rVEGFD aplicado exógenamente no tuvo un efecto detectable sobre la morfología neuronal, ambos tratamientos rescataron la reducción en la longitud y complejidad de la dendrita causada por la expresión de CaMBP4 o CaMKIVK75E (Figura 4 A a C, E a F). Por el contrario, VEGFD-HA y rVEGFD no restauraron la densidad normal de la columna en CaMBP4 o CaMKIVK75E que expresan neuronas (Figura 4 D, G), indicando que los mecanismos a través de los cuales la señalización CaMKIV de calcio nuclear regulan la geometría de la dendrita y la densidad de las espinas son distintos. Debido a que VEGFD pertenece a una familia de factores estrechamente relacionados que, en parte, comparten los receptores, se probó si VEGF o VEGFC también afectan a la arborización de la dendrita. Sin embargo, ni VEGF recombinante (rVEGF) ni VEGFC recombinante (rVEGFC) pudieron rescatar la reducción en la longitud y complejidad de la dendrita causada por la expresión de CaMBP4 o CaMKIVK75E (figura 5), indicando un papel específico para VEGFD en el control de la arborización de dendritas por señalización nuclear de calcio-CaMKIV.

Ejemplo 5: La señalización autocrina de VEGFD es esencial para la arborización dendrítica compleja

25 Para determinar si la reducción observada en la expresión de VEGFD que siguió al bloqueo de la señalización nuclear de calcio-CaMKIV era suficiente para alterar la arquitectura dendrítica, se usó ARNi para disminuir la expresión de VEGFD en neuronas del hipocampo. Las secuencias de ADN que codificaban los ARN de horquilla corta (shARN) diseñadas para dirigirse al ARNm de VEGFD de ratón se insertaron aguas abajo del promotor U6 de un vector de rAAV. El rAAV resultante, rAAV-shVEGFD, también alberga un casete de expresión que contiene el promotor de la proteína cinasa II (CaMKII) dependiente de calcio/calmodulina para la proteína roja fluorescente mCherry (Figura 6A). Los rAAVs de control fueron idénticos a rAAV-shVEGFD excepto que carecían de secuencias de ADN que codificaran ARNhcs (rAAV-emptymC) o contenían secuencias de DNA que codificaban una versión codificada del ARNhc específico de VEGFD (rAAV-shSCR). Se obtuvieron tasas de infección de 80 a 95 por ciento de la población de neuronas para los tres rAAV (Figura 7 A, B). qRT-PCR y el análisis de inmunotransferencia revelaron que rAAVshVEGFD, pero no rAAV-shSCR o rAAV-emptymC, redujeron los niveles de ARNm de VEGFD y bloquearon la expresión de la proteína VEGFD (Figura 6B, Figura 7C). La expresión de VEGFC no se vio afectada por rAAV-shVEGFD o por los dos rAAV de control (Figura 6B). Se ha informado que la expresión de ciertos ARNhc puede tener un efecto sobre la morfología neuronal debido a la inducción de una respuesta de interferón. Sin embargo, usando un sistema de gen informador sensible a interferón no se encontró evidencia de una respuesta de interferón inducida por rAAV-shVEGFD (Figura 7D). Además, no se observó ningún aumento en la muerte celular en las neuronas del hipocampo infectadas con rAAV-shVEGFD (Figura 7E).

40 Los análisis morfológicos revelaron que, en comparación con las neuronas del hipocampo transfectadas con pAAV-shSCR o pAAV-emptymC, las neuronas transfectadas con pAAV-shVEGFD mostraban un árbol dendrítico menos complejo y una reducción en la longitud dendrítica total (Figuras 6C a E). Por el contrario, el silenciamiento de VEGFD mediado por ARNi no modificó la densidad de espinas (número de espinas/20 μ m: 7,1 \pm 0,36, pAAV-emptymC, 6,17 \pm 0,56, pAAV-shSCR, 6,52 \pm 0,51, pAAV-shVEGFD). Se obtuvieron resultados similares con diferentes secuencias de ARNhc dirigidas contra VEGFD (Figura 7F). El efecto de la transfección de pAAV-shVEGFD en el árbol dendrítico podría revertirse mediante el tratamiento con rVEGFD. Por el contrario, rVEGFD no afectó a la longitud de la dendrita ni a la complejidad de las neuronas del hipocampo transfectadas con pAAV-shSCR y pAAV-emptymC (Figuras 6C a E). Estos resultados identifican un papel para VEGFD en la regulación de la arquitectura dendrítica y respaldan adicionalmente el concepto mencionado anteriormente (véase la Figura 4) de que la arborización de la dendrita y la morfogénesis de las espinas están controladas por distintos procesos regulados por calcio nuclear/CaMKIV.

55 La observación de que la estructura de la dendrita está alterada en neuronas que expresan shVEGFD incluso si las células circundantes no transfectadas tienen un nivel de expresión de VEGFD normal sugiere un posible mecanismo de acción autocrino de VEGFD. Para investigar esto más profundamente, se transfectaron neuronas del hipocampo con pAAV-VEGFD-HA o con un plásmido que contenía un casete de expresión para VEGFD marcado con HA resistente a shVEGFD (pAAVresiVEGFD-HA) junto con pAAV-shVEGFD para sobreexpresar VEGFD en las mismas neuronas que expresaban shVEGFD. La expresión de resiVEGFD-HA rescató la reducción de la longitud y complejidad de las dendritas causada por la expresión de shVEGFD (Figura 6F, H), lo que indicó que VEGFD actuaba de manera autocrina. Esta conclusión está respaldada por un experimento en el que las neuronas del hipocampo se infectaron por primera vez con rAAV-VEGFD y posteriormente se transfectaron con pAAV-shVEGFD. Como las tasas de infección son muy altas pero las tasas de transfección son muy bajas, esto crea una situación en la que un pequeño número de células transfectadas con bajos niveles de expresión de VEGFD y una longitud de

dendritas y arborización reducidas están rodeadas por células infectadas que sobreexpresan VEGFD. Se encontró que incluso en estas condiciones, el deterioro en la morfología de la dendrita provocado por shVEGFD no puede superarse mediante el VEGFD sobreexpresado en las neuronas infectadas (Figura 7G a I). Por lo tanto, aunque la acción paracrina de VEGFD no se puede excluir por completo, todas las evidencias disponibles sugiere fuertemente

Ejemplo 6: VEGFD regula la arborización dendrítica a través de VEGFR3

El VEGFD humano y su VEGFC relativo cercano pueden unirse y activar los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular 2 y 3 (VEGFR2 y VEGFR3); sin embargo, VEGFD murino solo puede activar VEGFR3. Para investigar si la arquitectura dendrítica está específicamente controlada por VEGFD que actúa a través de VEGFR3, se generaron rAAV que expresan ARNhc específicos para VEGF (rAAV-shVEGF), VEGFC (rAAV-shVEGFC) y VEGFR3 (rAAV-sh VEGFR3). Usando qRT-PCR podría demostrarse que rAAV-shVEGF, rAAV-shVEGFC, rAAV-sh VEGFR3 y rAAV-shVEGFD redujeron los niveles de ARNm de sus respectivos objetivos, dejando inalterada la expresión de los otros miembros de la familia VEGF (Figura 8A). Los análisis morfológicos revelaron que la transfección de las neuronas del hipocampo con pAAVshVEGF o pAAV-shVEGFC, similar a la transfección con los plásmidos de control, pAAVshSCR o pAAV-emptymC, no tuvo ningún efecto sobre la longitud o complejidad de las dendritas (Figura 8 B a D). Por el contrario, la eliminación de VEGFR3 mediante la transfección de neuronas con pAVV-VEGFR3 condujo a cambios en la estructura dendrítica que eran virtualmente idénticos a los obtenidos en neuronas hipocámpales transfectadas con pAAV-shVEGFD (Figura 8 B a D; véase también la Figura 6 C a H, y la figura 7G a I, para los efectos de pAAV-shVEGFD en la morfología de la dendrita). Estos resultados indican que entre los miembros de la familia VEGF, VEGFD, actuando a través de VEGFR3, juega un papel específico en la regulación de la arborización de dendritas.

Ejemplo 7: VEGFD regula las rutas de señalización múltiples en las neuronas del hipocampo y conforma la morfología de las dendritas a través de la activación de la p38 MAP quinasa

A continuación, se determinaron los mecanismos de señalización a través de los cuales VEGFD controla la arquitectura dendrítica. Los lisados celulares de las neuronas del hipocampo tratados con rVEGFD durante varios periodos de tiempo se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando un gran panel de anticuerpos que son específicos para las formas fosforiladas (es decir, activadas) de las moléculas de señalización (Figura 9). Se encontró que rVEGFD activa ERK1/2, p38 MAP quinasa (MAPK) y CREB (Figura 9A, B). El aumento en la fosforilación de ERK1/2 y la fosforilación de CREB (que tiene lugar en neuronas y no en células gliales como se muestra por inmunotinción doble usando el marcador neuronal NeuN; Figura 9C) fue significativo pero moderado (Figura 9A, B). Por el contrario, la activación de p38 MAPK fue muy robusta (Figuras 9A, B), lo que indica que puede ser un importante transductor de la señalización de VEGFD en las neuronas del hipocampo. Por lo tanto, se determinó si p38 MAPK mediaba los efectos de VEGFD en la geometría de las dendritas. De hecho, el bloqueo selectivo de p38 MAPK usando el inhibidor de p38 MAPK SB203580 comprometió gravemente la capacidad de rVEGFD para rescatar el deterioro de la longitud y complejidad de la dendrita en neuronas del hipocampo que expresaban CaMBP4 y CaMKIVK75E (Figura 9D, E; véase también la Figura 4A, E a F). Debido a que SB203580 inhibe las isoformas alfa y beta de p38 MAPK, se investigó adicionalmente el papel de p38 MAPK en la arborización dendrítica mediada por VEGFD mediante RNAi. Se generaron dos pAAVs, shp38 α y shp38 β , que contienen casetes de expresión para ARNhc específicos para la isoforma alfa y beta, respectivamente, de p38 MAPK. Se encontró que la reducción de la expresión de p38 alfa MAPK impedía el rescate inducido por rVEGFD de los fenotipos de dendritas de las neuronas del hipocampo que expresaban CaMBP4 (Figura 9F). Estos resultados indican que se requiere p38 alfa MAPK para la regulación de VEGFD de la arquitectura dendrítica.

Ejemplo 8: VEGFD modula la actividad en red

Para investigar si los cambios regulados por VEGFD en la estructura de las dendritas están asociados con cambios en la actividad de la red neuronal, se usaron registros de microelectrodos (MEA). De hecho, las frecuencias pico de las cultivos del hipocampo infectadas con rAAV-shVEGFD se redujeron en comparación con los cultivos infectados con rAAV-shSCR o rAAV-emptymC. Esta disminución podría rescatarse parcialmente mediante la adición de rVEGFD a los medios (Figura 10A). La disminución en la actividad en la red causada por la infección con rAAVshVEGFD se observó por primera vez en el día 10 in vitro (DIV) (Figura 10A), coincidiendo con el inicio de la expresión robusta del ARNm de VEGFD in vitro (véase la Figura 2A, 3A).

Ejemplo 9: Las grabaciones de patch clamp verifican una superficie reducida y excitabilidad después de silenciar la expresión de VEGFD

Los efectos del silenciamiento de la expresión de VEGFD sobre las propiedades eléctricas de las neuronas se investigaron con patch clamp de células enteras (Tabla 1, Figura 10B). Las neuronas transfectadas con pAAV-shVEGFD o infectadas con rAAV-shVEGFD mostraron, en comparación con su grupo de control respectivo, una capacitancia de membrana marcadamente menor indicativa de un área superficial de membrana plasmática reducida, un hallazgo consistente con la reducción observada en la arborización dendrítica (Fig. 6, 8). A pesar de esta diferencia, las neuronas que expresaban shVEGFD no mostraron un potencial de membrana en reposo alterado o un potencial de membrana umbral para el inicio del potencial de acción (Tabla 1). Esto refleja la integridad

5 saludable de estas neuronas a pesar de su morfología alterada. Se requirió una inyección un poco corriente para
provocar un potencial de acción en las células que expresaban shVEGFD, aunque esta tendencia fue solo
significativa en el grupo de neuronas del hipocampo en las que se usó la infección para expresar el shVEGFD (Tabla
1). Además, se encontró una acomodación más fuerte en los patrones de pico inducidos por inyecciones de
corriente de onda cuadrada en neuronas que expresaban shVEGFD (datos no mostrados). Esto sugiere una
excitabilidad ligeramente reducida en las neuronas que expresaban shVEGFD, consistente con la frecuencia de pico
absoluta reducida identificada con los registros de MEA (véase la Figura 10A). El aumento en la acomodación puede
deberse a una contribución reducida de los canales dendríticos de sodio, los canales h o los canales de potasio
10 activados por calcio, que en las neuronas piramidales pueden conducir a lentas descargas repetitivas e influir en las
formas de onda de las ráfagas.

Tabla 1: Efectos del silenciamiento de la expresión de VEGFD en las propiedades eléctricas de las neuronas medida con patch clamp de célula completa

	Vreposo (mV)	Cm (pF)	Rm (MΩ)	Trilla de AP (mV)	Trilla de AP induc. (pA)	Aumento de mEPSC τ (ms)	Disminución de mEPSC τ (ms)
shSCR infectado (n = 31)	-78,7 ± 1,7	102,4 ± 4,4	275 ± 15	-48,4 ± 1,0	116 ± 10	3,36 ± 0,07	5,70 ± 0,12
shVEGFD infectado (n = 26)	-82,9 ± 1,9	68,3 ± 3,3 ****	316 ± 19	-46,5 ± 1,1	162 ± 14	2,91 ± 0,10 ***	4,14 ± 0,15 ****
shSCR infectado (n = 26)	-76,5 ± 2,3	88,6 ± 5,5	291 ± 32	-44,1 ± 1,6	125 ± 13	3,18 ± 0,14	6,06 ± 0,07
shVEGFD transfectadas (n = 27)	-79,7 ± 2,0	59,7 ± 3,8 ****	352 ± 29	-45,6 ± 1,6	149 ± 14	2,82 ± 0,23	3,82 ± 0,26 ***

15 Propiedades de membrana pasiva, umbrales de potencial de acción y cinética mEPSC. Los valores indican el
potencial de membrana en reposo (Vreposo), la capacitancia de membrana (Cm), la resistencia de membrana (Rm),
el potencial de membrana en el que los potenciales de acción se inician (umbral de AP), la inyección de corriente
necesaria para inducir un potencial de acción (umbral de AP de inducción) y la constantes de tiempo de subida y
bajada de mEPSC. Se indican diferencias significativas entre las células que expresan shVEGFD y sus respectivos
20 controles que expresan shSCR transfectadas o infectadas (** p <0,001, **** p <0,0001) usando una prueba de
Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes.

Ejemplo 10: La reducción de la expresión de VEGFD reduce el número de receptores de AMPA funcionales

La influencia de la expresión de VEGFD en la transmisión sináptica en neuronas del hipocampo en cultivo se evaluó
directamente mediante el registro de corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (mEPSC) en presencia de
TTX y bloqueador del receptor GABAA gabazina. Las neuronas transfectadas con pAAV-shVEGFD o infectadas con
25 rAAV-shVEGFD mostraron intervalos de mEPSC entre eventos más largos (IEIs, 1/frecuencia) y amplitudes de
mEPSC más pequeñas que sus respectivos controles que expresan shSCR (Figura 10 E a F). La frecuencia
reducida de mEPSC en neuronas hipocámpales transfectadas sugiere que el efecto no estuvo mediado por una
probabilidad de liberación reducida presináptica ya que la baja tasa de transfección asegura que la mayoría de las
entradas de datos sinápticas a las células que expresan ARNhc provienen de células que no expresan ARNhc. La
30 frecuencia reducida de mEPSC es, por lo tanto, muy indicativa de menos sinapsis que contienen receptores de
AMPA por célula. La reducción del 21 al 24% en la amplitud mEPSC también sugiere una menor densidad de
receptores AMPA en las sinapsis en las células que expresan shVEGFD. mEPSCs de las neuronas del hipocampo
que expresan shVEGFD también mostraron constantes de tiempo de aumento y disminución más rápidas que sus
35 respectivos controles que expresan shSCR (Figura 10C, Tabla 1), muy probablemente debido a la filtración reducida
de mEPSC en sus árboles dendríticos más compactos. Alternativamente, un componente lento mediado por el
receptor NMDA sináptico del mEPSC puede haberse reducido en neuronas que expresan shVEGFD, aunque las
corrientes de NMDA significativas son poco probables en las condiciones de registro de los inventores (potencial de
mantenimiento de -71 mV, Mg²⁺ 1,3 mM). Las respuestas también se registraron en AMPA aplicado en baño, que
40 produjo un pico en 30 s cuya amplitud se usó como una indicación del número total de receptores de AMPA
funcionales por célula (Figura 10D). Las amplitudes de respuesta de AMPA fueron menores en las neuronas del
hipocampo que expresan shVEGFD (Figuras 10D, G) indicativas de un número total reducido de receptores de
AMPA expresados en superficie por célula. Tomados en conjunto, este análisis de patch clamp ha identificado un
45 área superficial de membrana plasmática reducida, así como un número reducido de sinapsis que contienen
receptores AMPA, un número reducido de receptores AMPA por sinapsis y un número total reducido de receptores
AMPA en células que expresan shVEGFD. Estos resultados son consistentes con la morfología dendrítica reducida

identificada por análisis morfométricos.

Ejemplo 11: VEGFD conforma la arborización dendrítica in vivo

A continuación, se investigó el papel de VEGFD in vivo. rAAV-shVEGFD o los rAAV de control apropiados se administraron estereotáxicamente al hipocampo dorsal de ratones machos C57BL/6 de 2 meses de edad. Las neuronas infectadas se identificaron fácilmente por análisis de la fluorescencia de mCherry (Figura 12). La morfología de las neuronas en el área CA1 del hipocampo se evaluó mediante el trazado manual de las dendritas basales de las rodajas de cerebro teñidas de Golgi obtenidas de animales a las 2,5 semanas de la administración del gen viral. Como en las neuronas cultivadas, la infección de las neuronas del hipocampo in vivo con rAAV-shVEGFD pero no con rAAVshSCR o rAAV-emptymC redujo tanto la longitud total de las dendritas como su complejidad (Figuras 11 A a C).

Ejemplo 12: VEGFD es requerido para la formación de la memoria

Finalmente, se investigó si los cambios en la estructura neuronal inducida por el silenciamiento mediado por RNAi de VEGFD causaban déficits cognitivos. Los ratones inyectados estereotáxicamente con rAAV-shVEGFD o rAAV-shSCR en el hipocampo se probaron en dos pruebas de memoria bien caracterizadas dependientes del hipocampo: el laberinto de agua de Morris y el condicionamiento contextual del miedo. En la versión de la plataforma oculta del laberinto de agua de Morris, los ratones aprenden la ubicación de la plataforma utilizando señales visuales distales. Se encontró que los ratones inyectados estereotáxicamente con rAAV-shSCR o rAAV-shVEGFD necesitaron significativamente menos tiempo para encontrar la plataforma oculta en los ensayos de entrenamiento (efecto principal de la sesión de entrenamiento: $F [7,91] = 11,30, p < 0,0001$), sin embargo no se observó ningún efecto del tratamiento (efecto principal del tratamiento: $F [1,13] = 1,34, p = NS$) (Figura 11D). Esto sugiere que ambos grupos han desarrollado una estrategia de aprendizaje para encontrar la plataforma oculta. Los ratones pueden emplear múltiples estrategias de comportamiento para obtener la recompensa (escapar del agua) y algunas de estas estrategias pueden ser comparativamente eficientes pero distintas en cuanto a los requisitos de la función del hipocampo. Para evaluar la memoria espacial, se realizó una prueba durante la cual se quitó la plataforma del laberinto de agua y se les dio a los ratones 60 segundos para buscarla. El patrón de búsqueda durante la prueba puede revelar una preferencia espacial que se cree que representa la memoria espacial. Se observó que los ratones inyectados con rAAV-shSCR muestran una preferencia espacial por el cuadrante diana, mientras que los ratones inyectados con rAAV-shVEGFD no la tuvieron (Figura 11E). Esto se expresó como un tiempo significativamente mayor pasado en el cuadrante objetivo por los ratones inyectados con rAAV-shSCR en comparación con los otros cuadrantes (ANOVA de una vía: $F [3,28] = 9,84, p < 0,001$; comparaciones múltiples post-hoc: tiempo en cuadrante diana versus tiempo en cuadrantes adyacentes u opuestos, $p < 0,05$). Por el contrario, los ratones inyectados con rAAV-shVEGFD pasaron cantidades de tiempo similares en los diferentes cuadrantes ($F [3,24] = 1,2, p = NS$). Esto sugiere que los ratones inyectados con rAAV-shVEGFD no desarrollaron una estrategia de búsqueda espacial que apunte a la alteración de la memoria espacial en estos ratones. La velocidad de natación no fue diferente entre los dos grupos (figura 11F, efecto principal del tratamiento: $F [1,13] = 3,94, p = NS$).

Para determinar si las anomalías en la motivación, la coordinación motora o la visión podrían explicar el déficit en la memoria espacial, los ratones también fueron entrenados en una versión de plataforma visible del laberinto de agua, una tarea independiente del hipocampo. En esta tarea, los ratones usan una señal visual proximal para ubicar la plataforma (Figura 11G). Los ratones inyectados con rAAV-shSCR y rAAV-shVEGFD mostraron latencias de escape similares para encontrar la plataforma visible (efecto principal de la sesión de entrenamiento: $F [2,26] = 7,12, p < 0,01$; efecto principal del tratamiento: $F [1,13] = 0,36, p = NS$) lo que demuestra que ambos grupos adquirieron la tarea (Figura 11G). En general, estos resultados sugieren que los ratones inyectados con rAAV-shVEGFD tienen memoria espacial deteriorada.

En el condicionamiento contextual del miedo, los ratones aprenden la asociación entre un estímulo aversivo, un choque leve en el pie y el contexto en el que se produjo. En los ratones que han formado una memoria asociativa, una segunda exposición al mismo contexto induce una respuesta temerosa expresada como congelación o inmovilidad, parámetros utilizados para cuantificar la formación de la memoria. Se encontró que los ratones inyectados estereotáxicamente con rAAVshVEGFD mostraban niveles de congelación significativamente más bajos durante la sesión de prueba de 24 horas que los ratones inyectados con rAAV-shSCR (Figura 11H). La reducción en los niveles de congelación no se debió a la disminución de la actividad locomotora o a la sensibilidad al dolor ya que la actividad exploratoria basal y la reacción al choque durante la sesión de entrenamiento no fueron diferentes entre los dos grupos (Figuras 11I, J). Estos hallazgos junto con los resultados obtenidos con el laberinto de agua de Morris indican que VEGFD es importante para la formación de la memoria.

Ejemplo 13: Los péptidos seleccionados muestran una actividad agonística en VEGFR2/3

Se razonó que los péptidos podrían generarse para actuar como mimicos de VEGF-D, lo que podría tener posibles implicaciones clínicas.

Los datos estructurales recientemente reportados de VEGF-D proporcionaron alguna información sobre las características estructurales esenciales para las interacciones moleculares entre VEGF-D y VEGFR-2. En base a

5 estos datos, se identificó un motivo de secuencia en VEGF-D que se esperaba que tuviera propiedades agonistas en el receptor. Esta secuencia se varió de forma sistemática para identificar análogos con actividad agonista incrementada. Dado que el plegamiento helicoidal del motivo parece ser de importancia crítica, se introdujeron residuos y pares de residuos que tienden a aumentar la propensión al plegamiento helicoidal. Entre estos residuos se encontraban alanina, los aminoácidos no naturales ácido alfa-amino-isobutírico (aib) y gabapentina (gpn) así como pares de aminoácidos catiónicos y aniónicos (Figura 13).

10 A continuación, se probó la eficacia de la biblioteca de péptidos sintetizados para producir los mismos efectos biológicos de VEGFD recombinante en células neuronales. p38 MAP quinasa es un actor clave en el proceso que vincula la señalización de VEGFD con la arquitectura dendrítica. Por esta razón, se midió la potencia de los péptidos para inducir la activación de p38 MAP quinasa. Para este fin, lisados celulares de neuronas del hipocampo tratados con rVEGFD o con uno de los péptidos (7,7 nM, 2 horas) se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos que son específicos para la forma fosforilada (es decir, activada) de p38 MAP quinasa. Además, las muestras también se analizaron para determinar la actividad de GSK-3 α/β y α -tubulina como control de carga de gel. Los resultados de este examen de actividad se muestran en la FIG. 13. En cada ronda de experimentos, rVEGFD se usó en paralelo como control positivo y representa el umbral. Todos los péptidos que inducen la actividad de p38 MAP quinasa a niveles idénticos o más altos que rVEGFD pasaron el límite. Los valores de la actividad de p38 MAP quinasa expresados como porcentaje de control no estimulado se pueden ver en la FIG. 13 debajo de la columna "P38".

20 Los péptidos también se enviaron a una selección negativa. Para este fin, se midieron los valores de la actividad de GSK-3 α/β , que no está alterada por el tratamiento con rVEGFD (Figura 13, columna "GSK"). Todos los péptidos que disminuyen o aumentan la actividad de GSK-3 α/β del 25% en comparación con el control se excluyeron mediante un análisis adicional.

25 A continuación, los péptidos que pasaron las selecciones positiva (inducción de la actividad de p38 MAP quinasa) y negativa (sin efecto sobre la actividad de GSK-3 α/β) se puntuaron por su potencia para activar la p38 MAP quinasa. La relación entre el valor bruto de la inducción de p38 MAP quinasa y el valor de la inducción de p38 MAP quinasa dada por rVEGFD se calculó para identificar péptidos menos/más potentes que rVEGFD. De acuerdo con estas puntuaciones, los péptidos se dividieron luego en clases (Figura 13, columnas "eficacia sobre rec" y "bin").

30 Sorprendentemente, se encontraron ciertas posiciones en la secuencia que son particularmente sensibles para sustituciones e intercambios de aminoácidos, tales como las posiciones 6 y 7. También se encontró que el residuo de gpn generalmente no se asocia con una mayor actividad, pero que los "hélices-formadores" de Ala y aib tienen un efecto positivo pronunciado cuando se introducen en las posiciones 6 y 7.

Los seis péptidos más potentes (n. ° 6, n. ° 21, n. ° 59, n. ° 60, n. ° 65, n. ° 69) se probaron para determinar su eficacia para modular la longitud y la complejidad dendríticas.

35 Se sabe que el bloqueo de la señalización nuclear de calcio al sobreexpresar CaMBP4 (Péptido de Unión de Calcio/Calmodulina 4) da como resultado una disminución de la longitud y complejidad dendríticas que pueden rescatarse a niveles normales tratando neuronas con rVEGFD (Figura 14). Se probó la capacidad de seis péptidos seleccionados para rescatar la reducción de la longitud y complejidad de la dendrita causada por la expresión de CaMBP4 (Figura 15).

40 Además, las neuronas del hipocampo primario se transfectaron con hrGFP (para visualizar toda la arborización dendrítica) y, cuando se indica, también con CaMBP4 para causar un deterioro en el árbol dendrítico. Posteriormente, las neuronas se trataron con el péptido indicado y luego se realizó un análisis morfométrico. Se midió la longitud dendrítica total y la complejidad; los resultados de estos análisis se muestran en la FIG. 16. Los seis péptidos fueron capaces de restaurar la longitud y complejidad dendríticas normales.

Listado de secuencias

45 <110> University of Heidelberg

<120> Regulación de dendritas mediada por VEGF-D/VEGFR

<130> H 3438WO

<150> EP 11004490.6

<151> 2011-06-01

50 <150> US 13/150,846

<151> 2011-06-01

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> DNA codificante de un shRNA

<400> 1
 gggcttcagg agcgaacat 19

10 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> DNA codificante de un shRNA

15 <400> 2
 gtgccaagac gggtagtca 19

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> DNA codificante de un shRNA

<400> 3
 aaacacgaaa atgtgattgg t 21

25 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> DNA codificante de un shRNA

30 <400> 4
 aagcacgaga acgtcatagg a 21

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> DNA codificante de un shRNA

<400> 5
 acctaccaa agccagcac 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> DNA codificante de un shRNA

<400> 6
 gttcattcca ttattagac 19

50 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA

ES 2 657 078 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DNA codificante de un shRNA

<400> 7

5 cccagatttg tgtgtacaa a 21

<210> 8

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

<400> 8

Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Phe Tyr Asp Thr Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln
 20 25 30

Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu
 35 40 45

Leu Gly Lys Thr Thr Asn Thr
 50 55

15 <210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

20 <400> 9

Ala Leu Ala Leu Lys Glu Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Lys Gly Ile
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

<400> 10

Ala Leu Thr Leu Lys Glu Ala Asp Glu Glu Trp Gln Arg Lys Gly Ile
 1 5 10 15

30 <210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

<400> 11

Ala Leu Thr Leu Lys Glu Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Lys Gly Val
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

<400> 12
 Ala Leu Thr Leu Lys Glu Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Lys Gly Gly
 5 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)

15 <223> Xaa denota ácido amino-isobutírico

<400> 13
 Ala Leu Xaa Leu Lys Glu Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Lys Gly Ile
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido que se une al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)

25 <223> Xaa denota ácido amino-isobutírico

<400> 14
 Ala Leu Thr Leu Lys Glu Xaa Asp Glu Glu Trp Gln Arg Lys Gly Ile
 1 5 10 15

30

REIVINDICACIONES

1. El receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 y/o 3 (VEGFR2/3) que activa el agente para uso en el tratamiento de un trastorno cognitivo relacionado con la edad y/o la enfermedad, en donde el agente activador es un péptido que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID N°: 9 a 14.
- 5 2. El agente activador VEGFR2/3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la disfunción cognitiva está causada por una condición, seleccionada del grupo que consiste en isquemia cerebral, Síndrome de Down, Síndrome de Rett, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, envejecimiento, disfunción metabólica e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- 10 3. El agente activador de VEGFR2/3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el sujeto es un ser humano.
4. El agente activador de VEGFR2/3 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido consiste al menos en una de las secuencias de aminoácidos, mostradas en SEQ ID NO: 9 a 14.

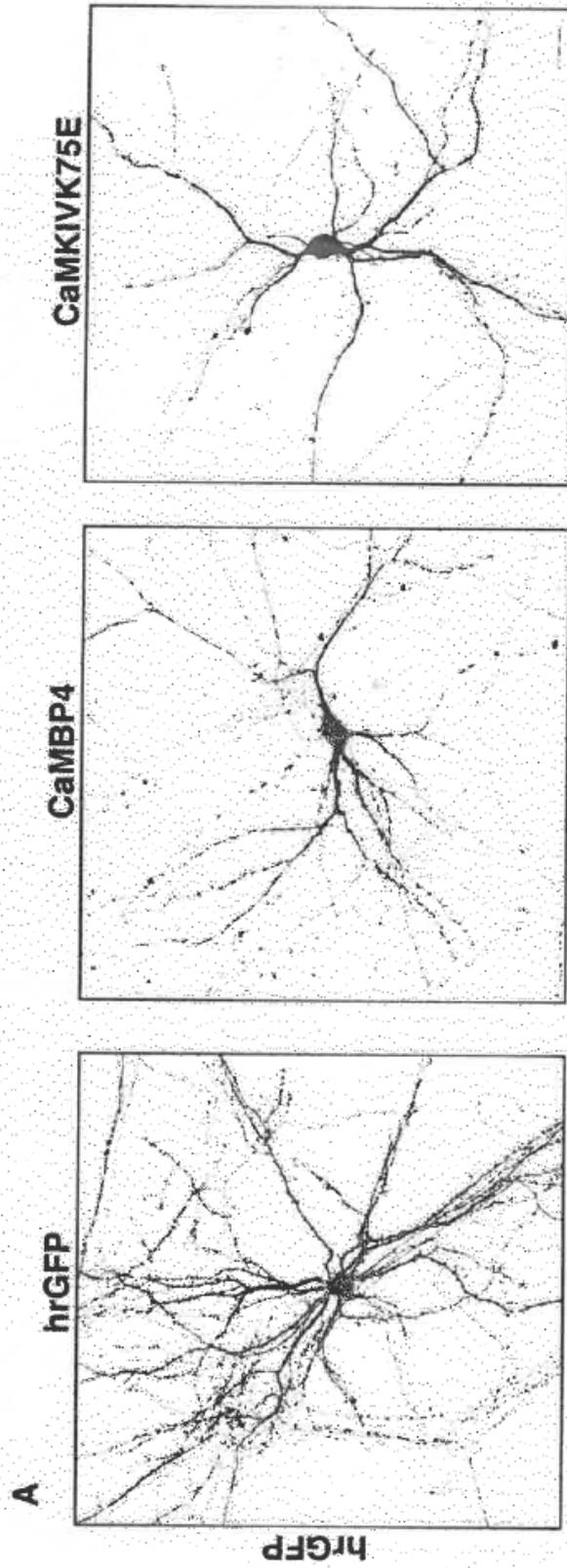


Figura 1A

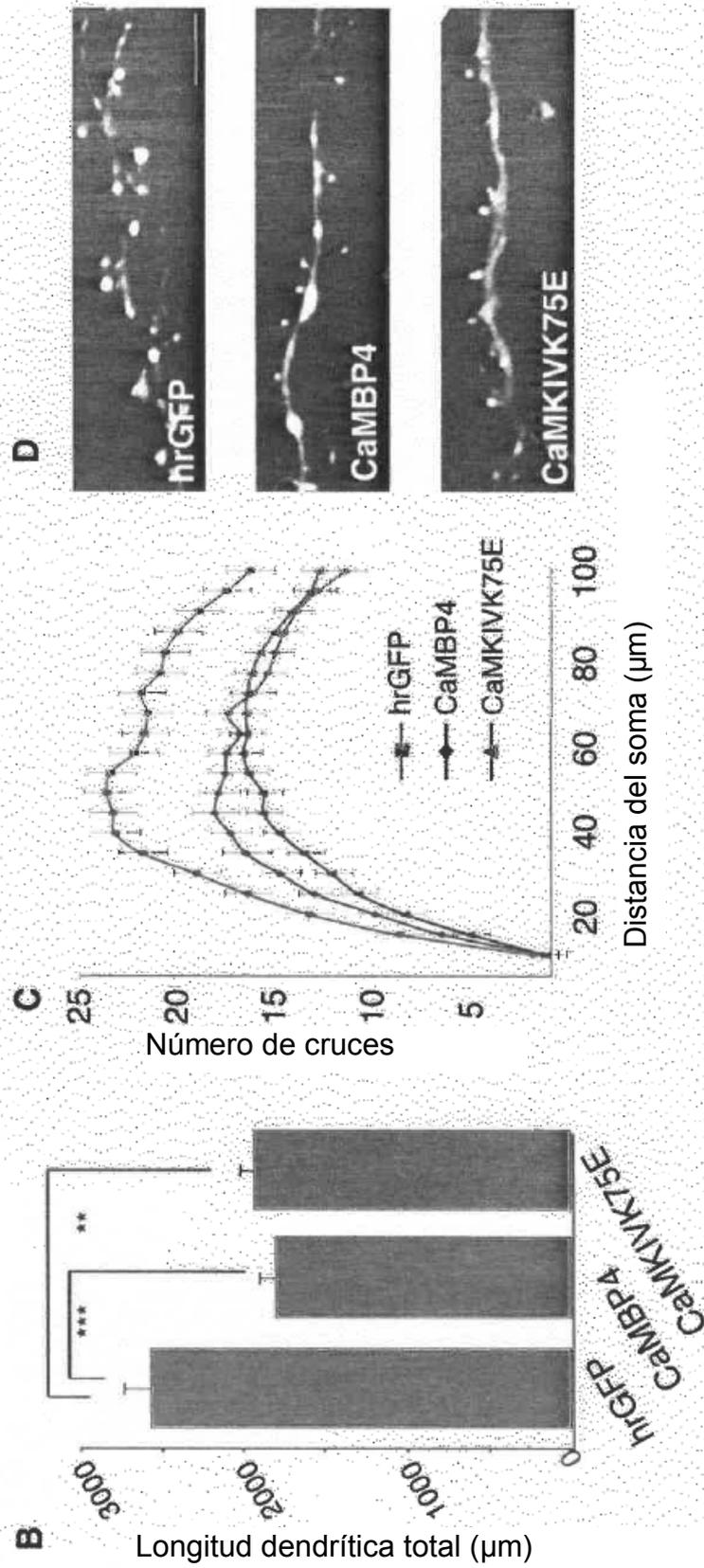


Figura 1 B a D

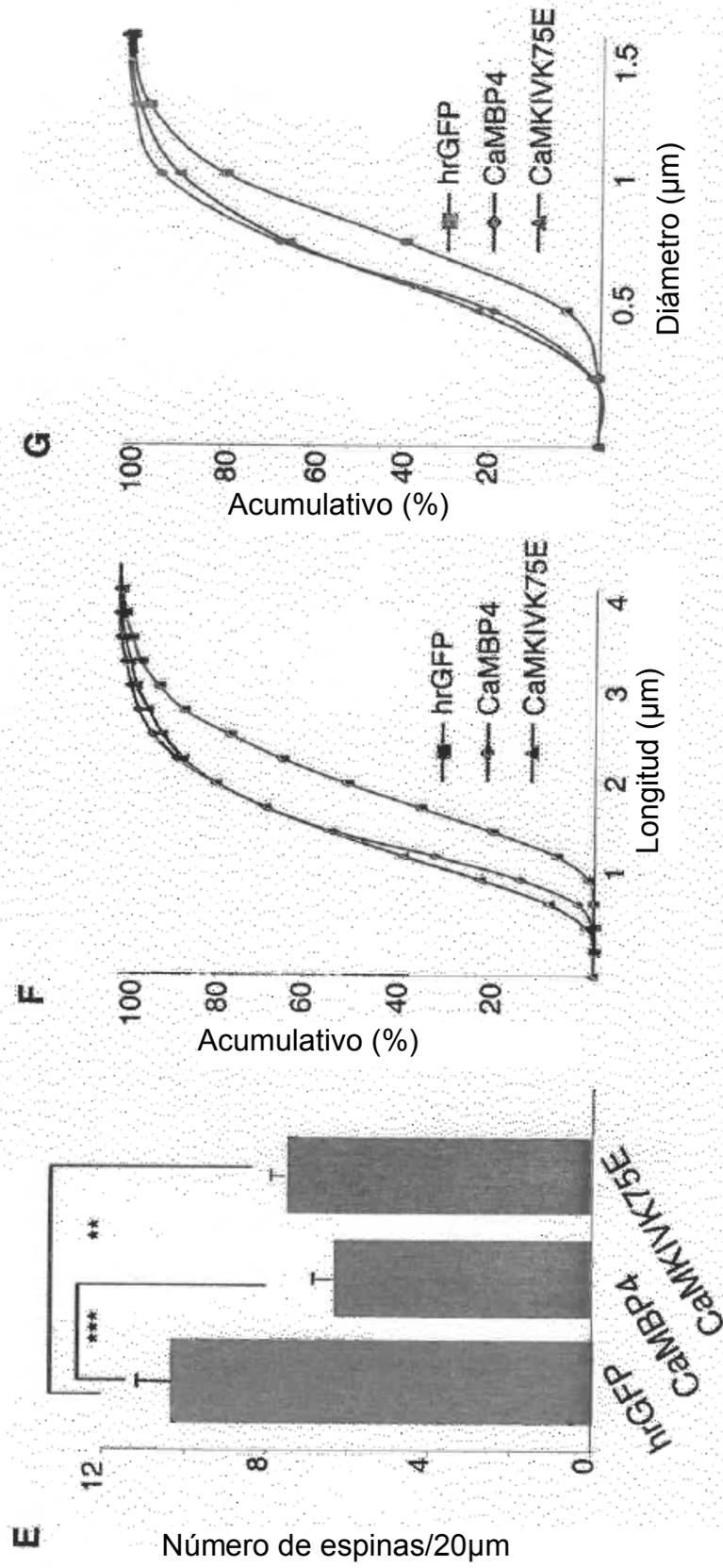


Figura 1 F a G

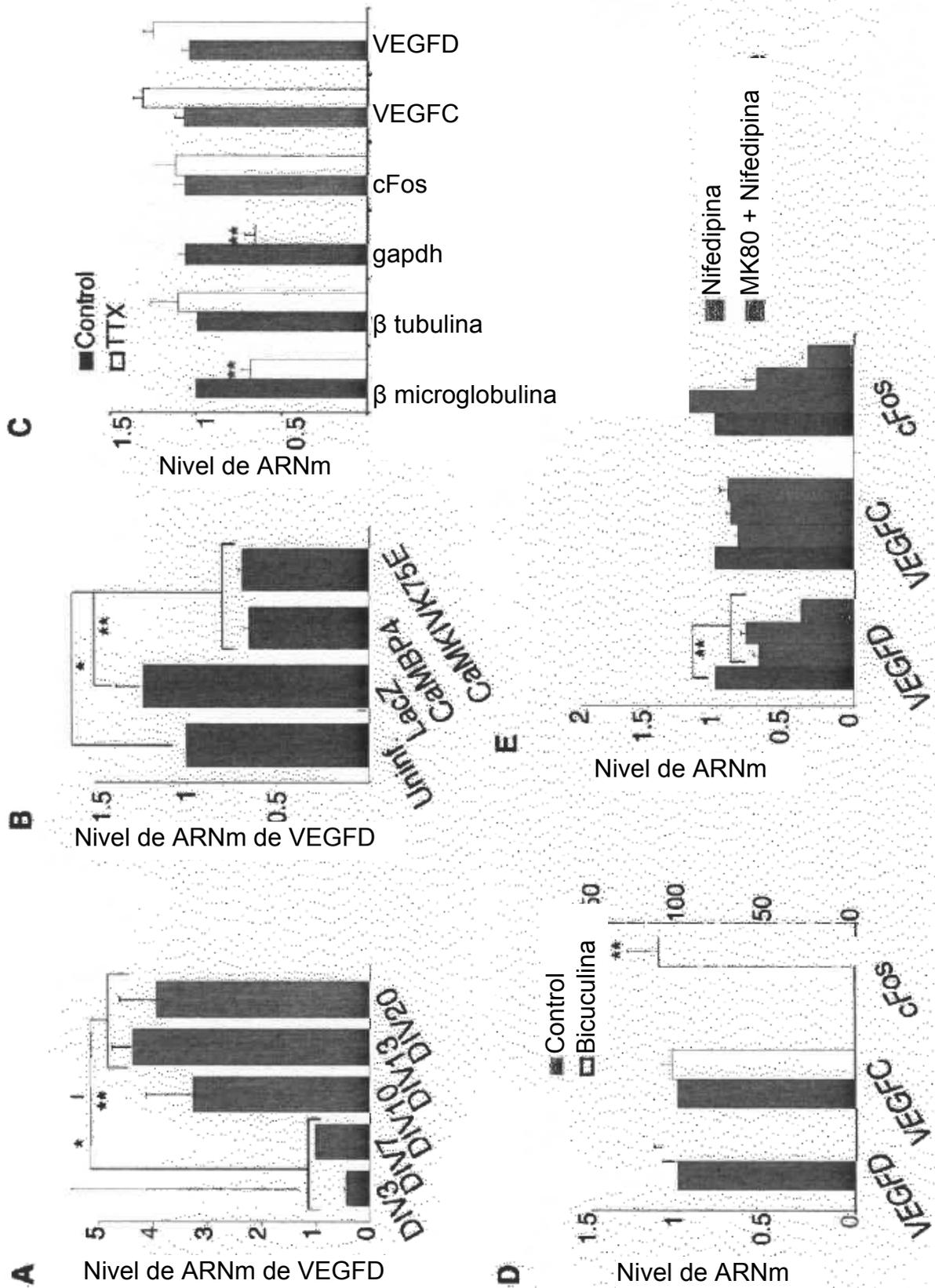


Figura 2 A a E

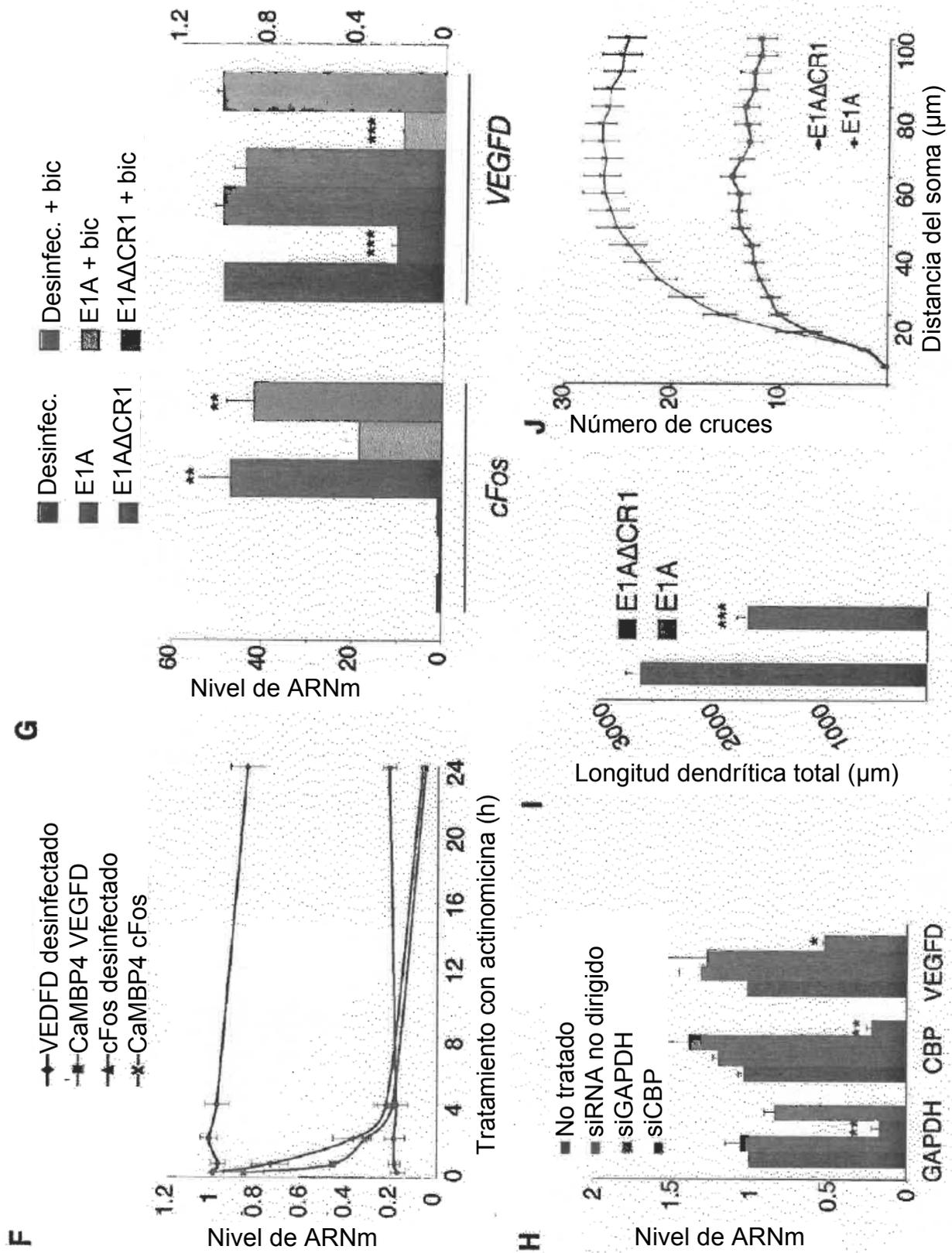


Figura 2 F a J

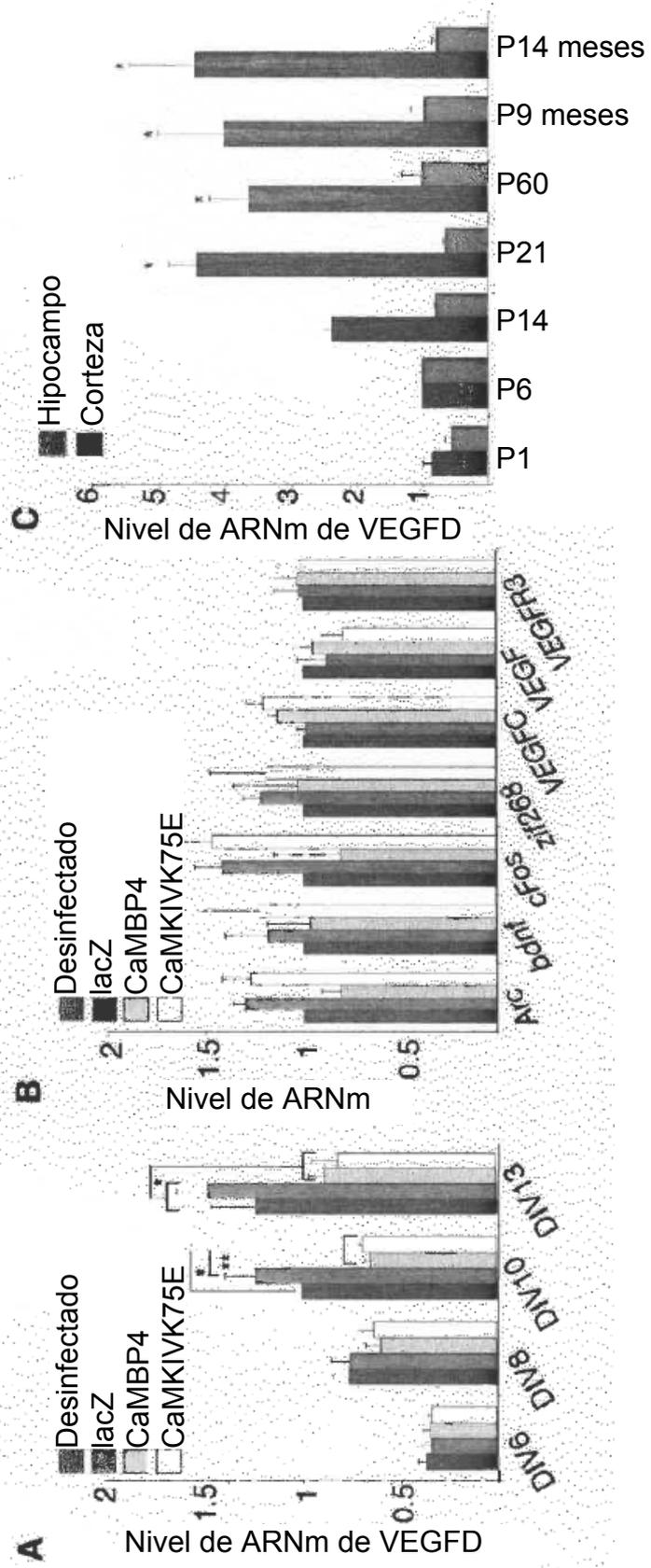


Figura 3 A a C

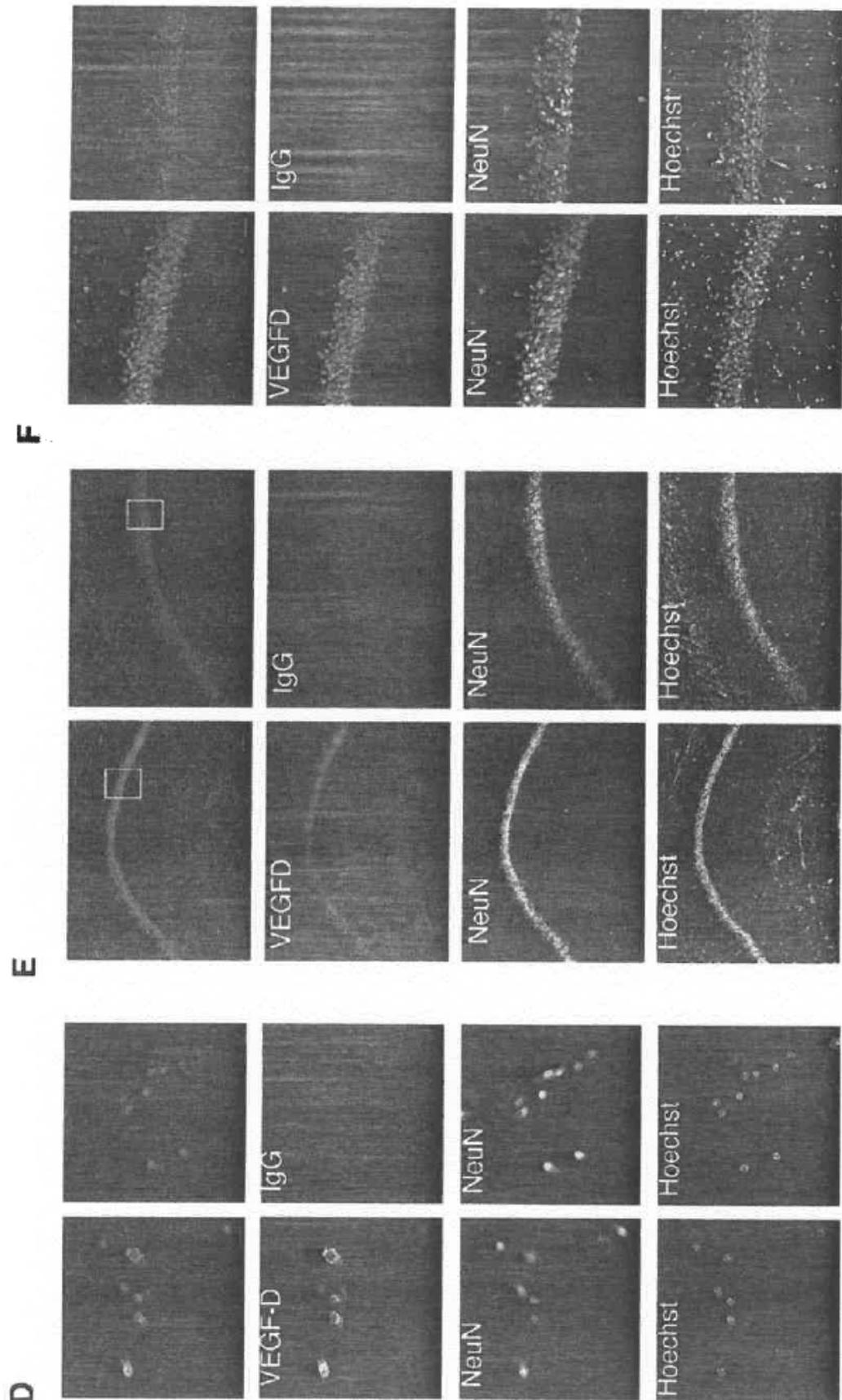


Figura 3 D a F

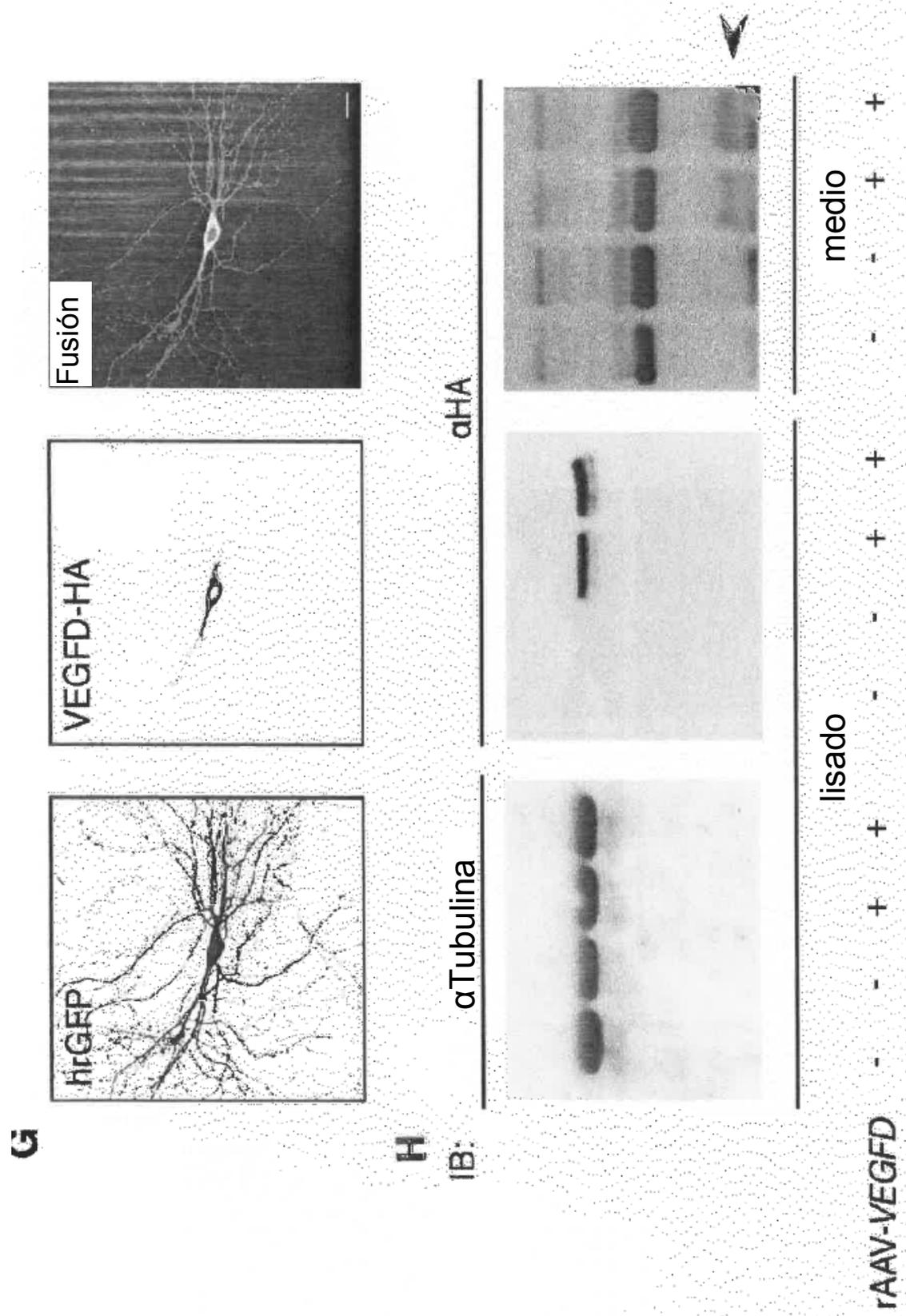


Figura 3 G, H

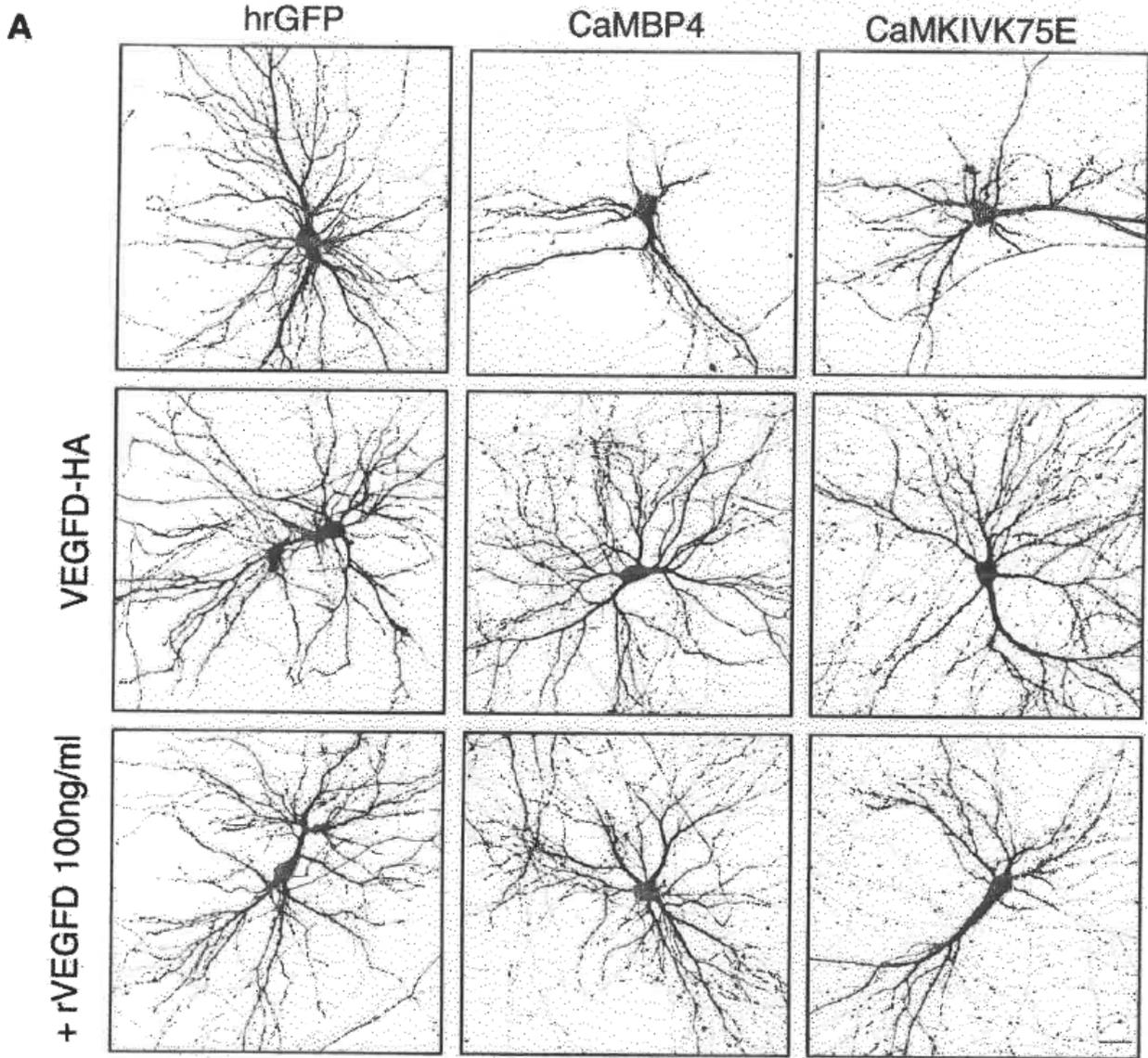


Figura 4 A

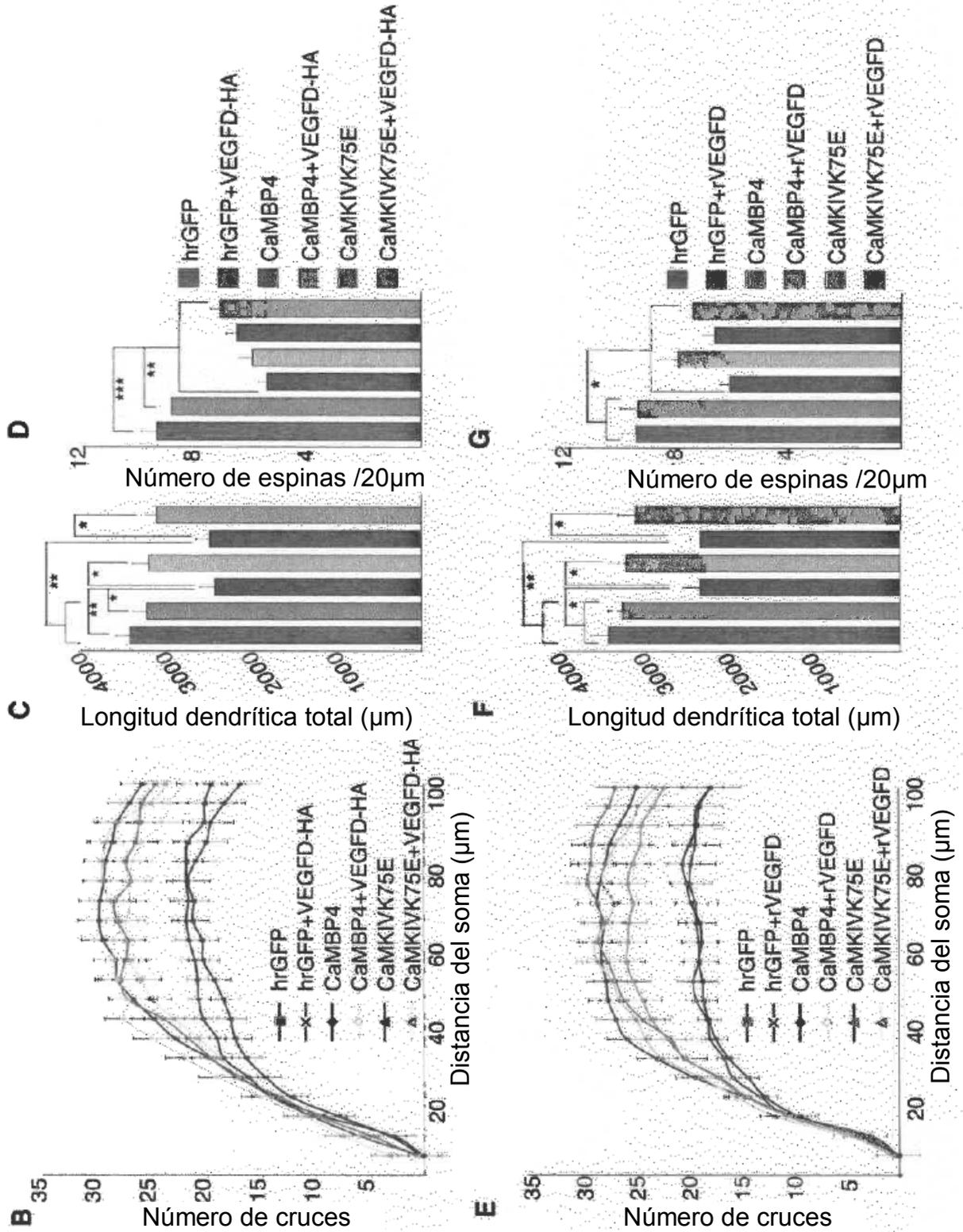


Figura 4 B a G

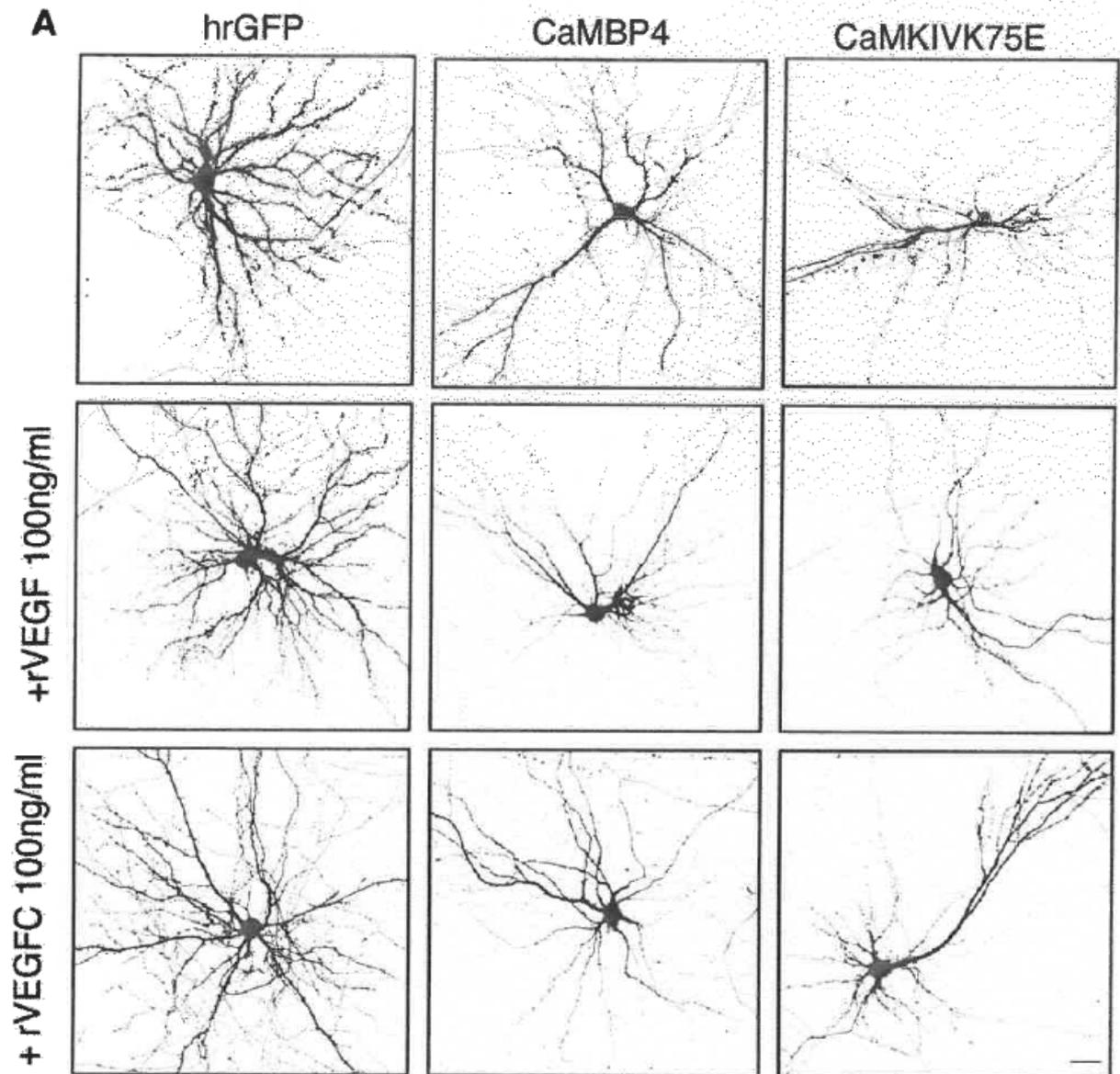


Figura 5 A

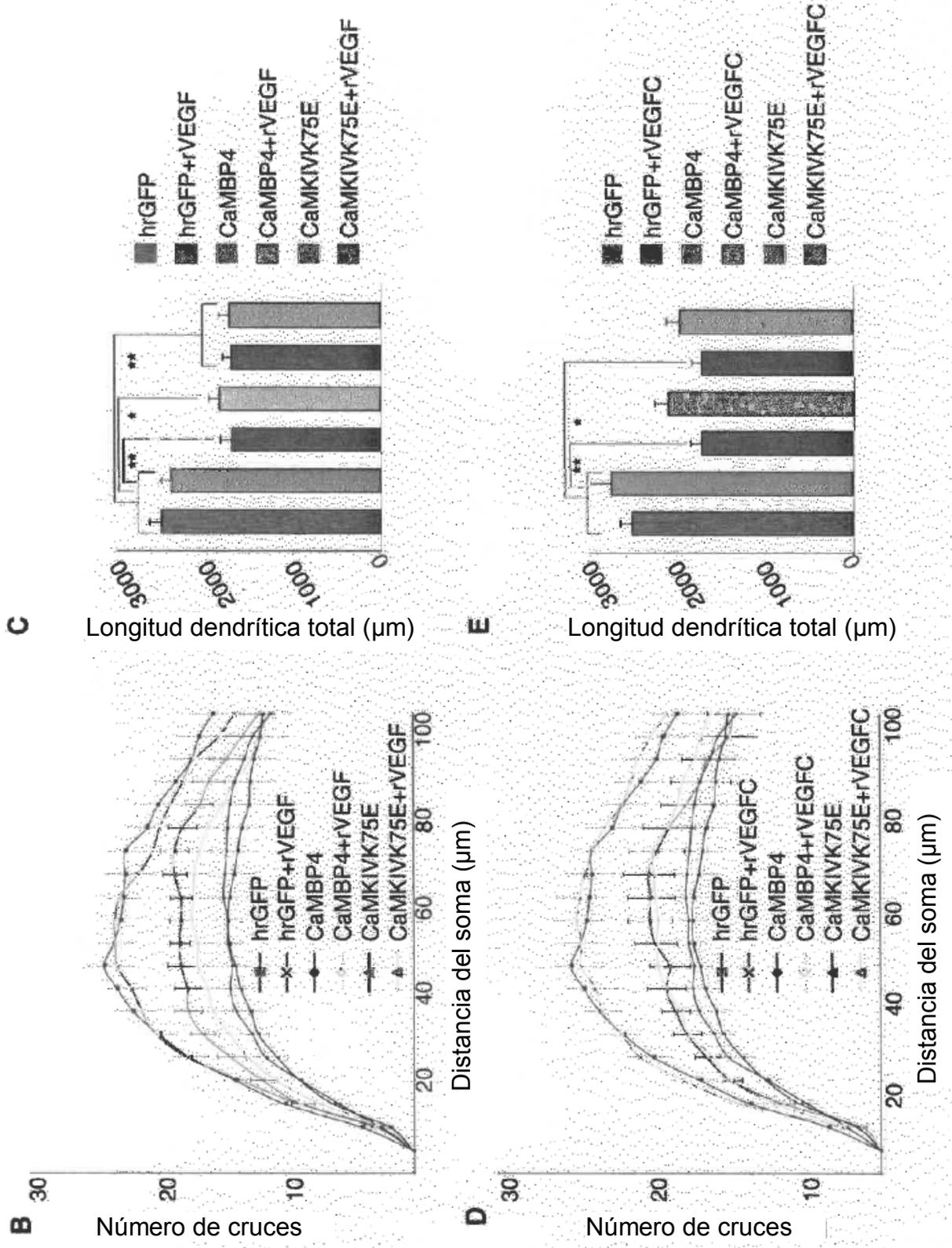


Figura 5 B a E

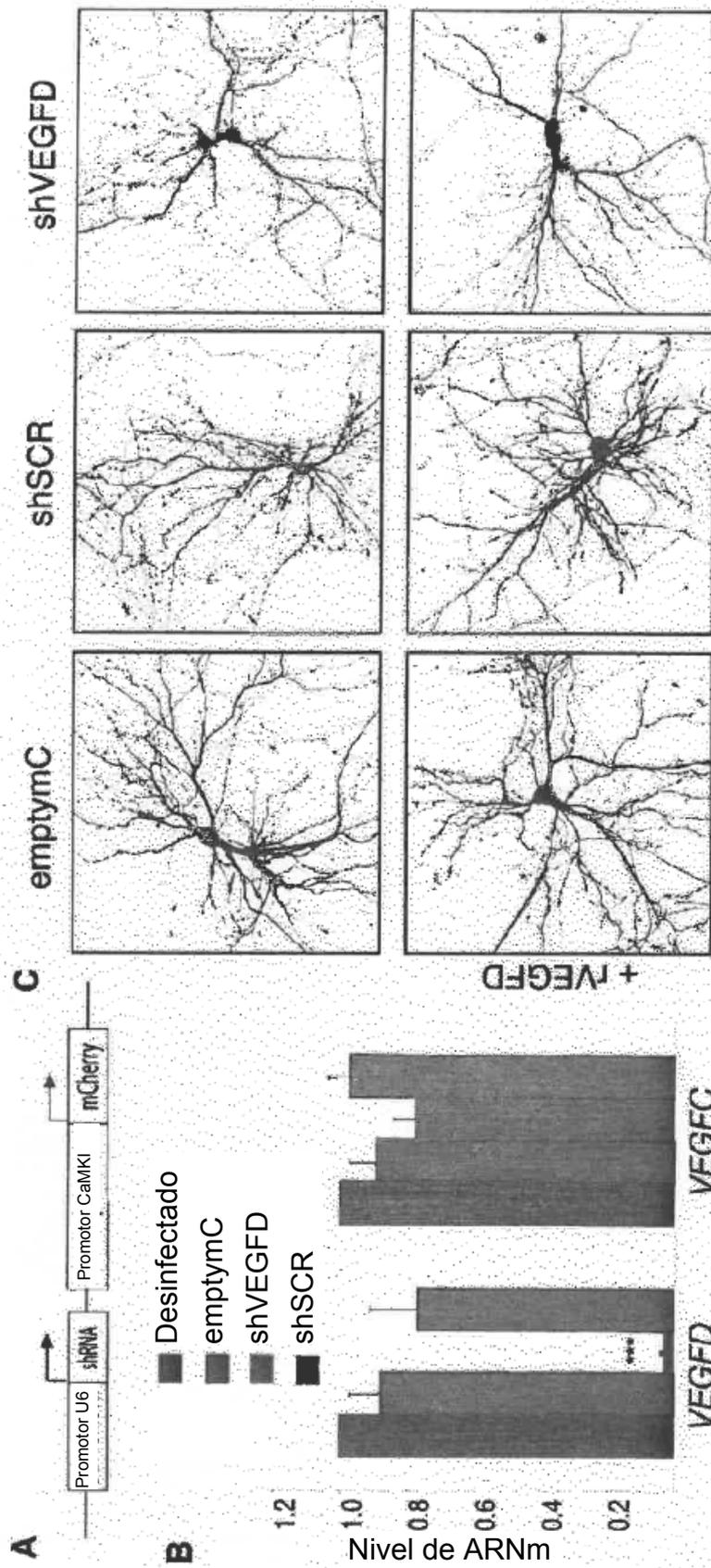


Figura 6 A a C

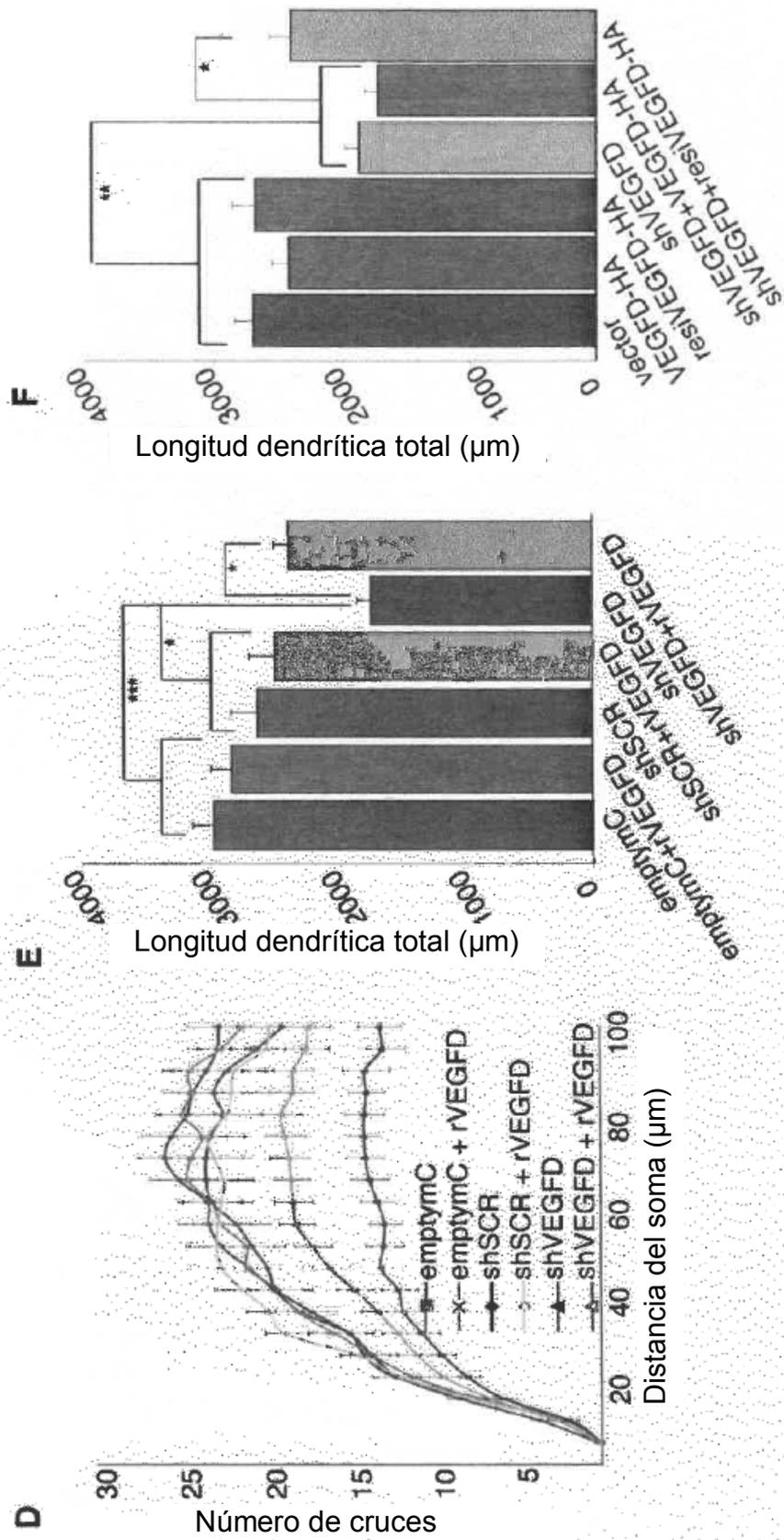


Figura 6 D a F

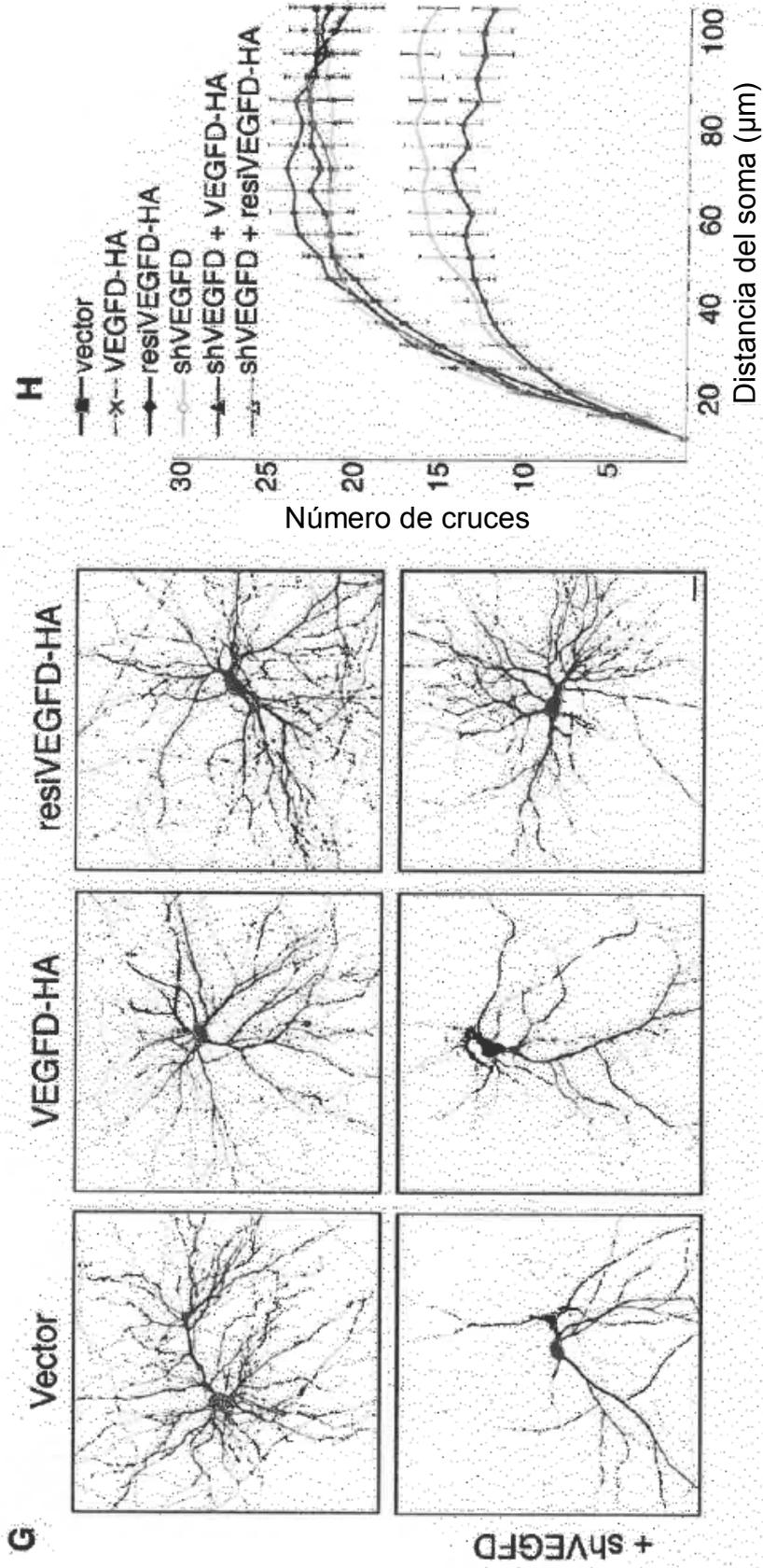


Figura 6 G, H

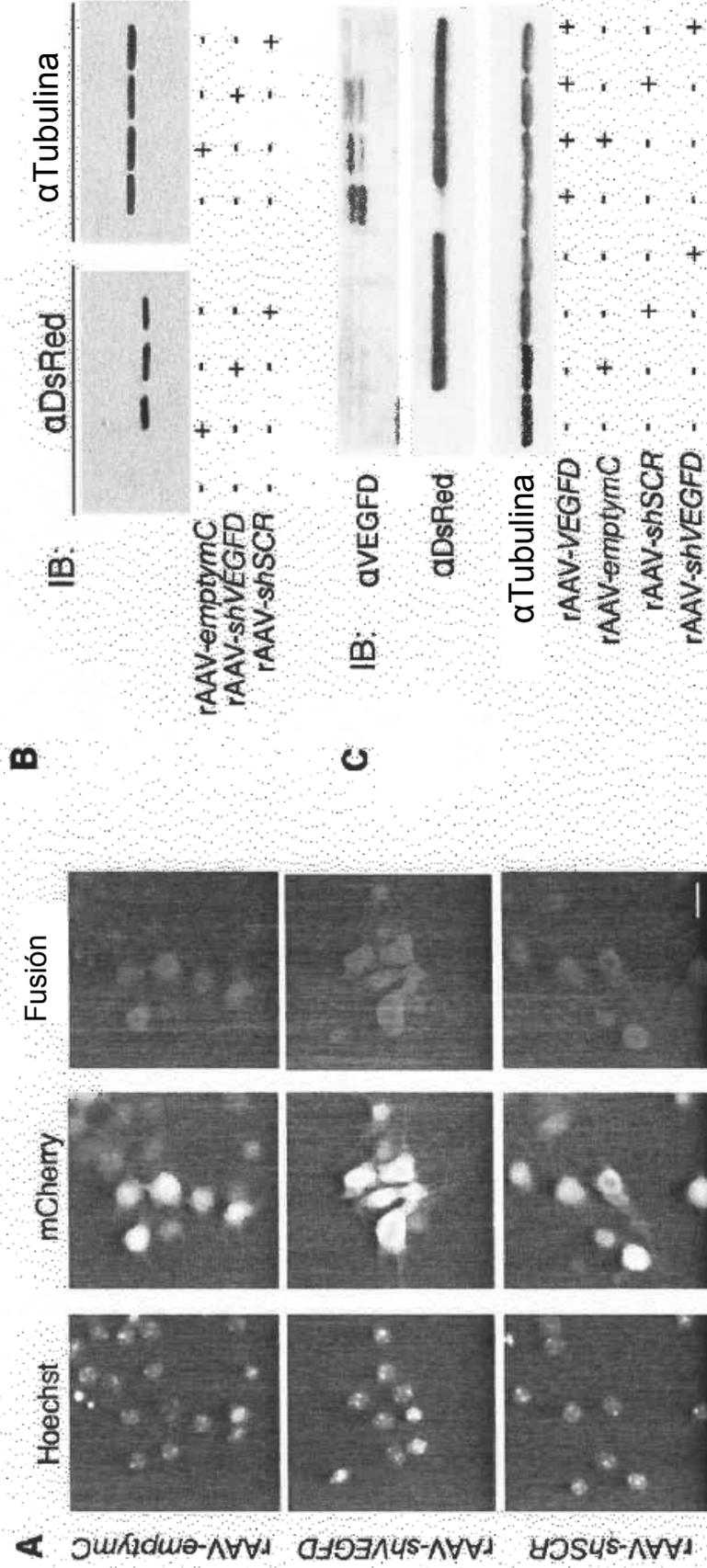


Figura 7 A a C

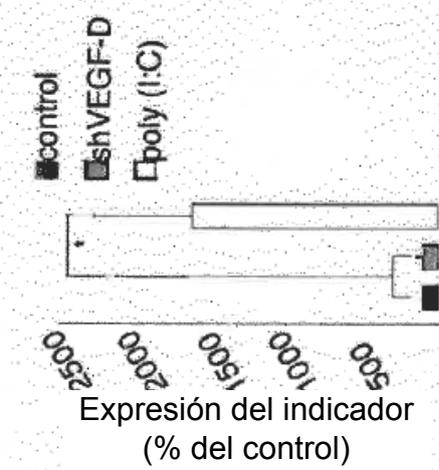
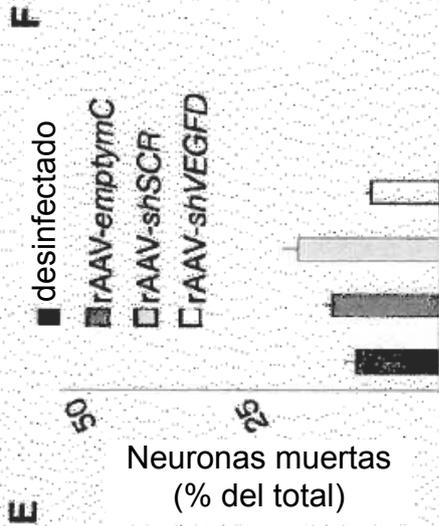
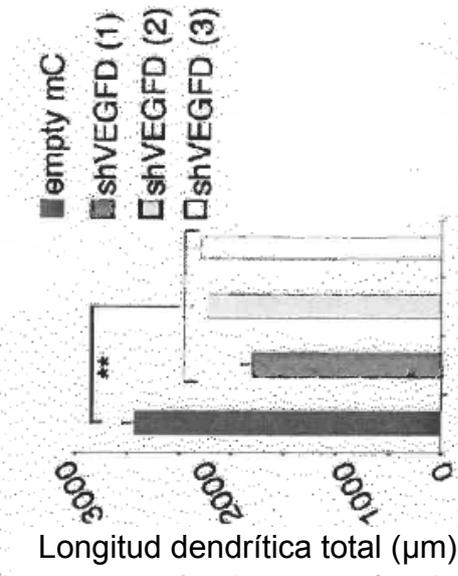


Figura 7 D a F

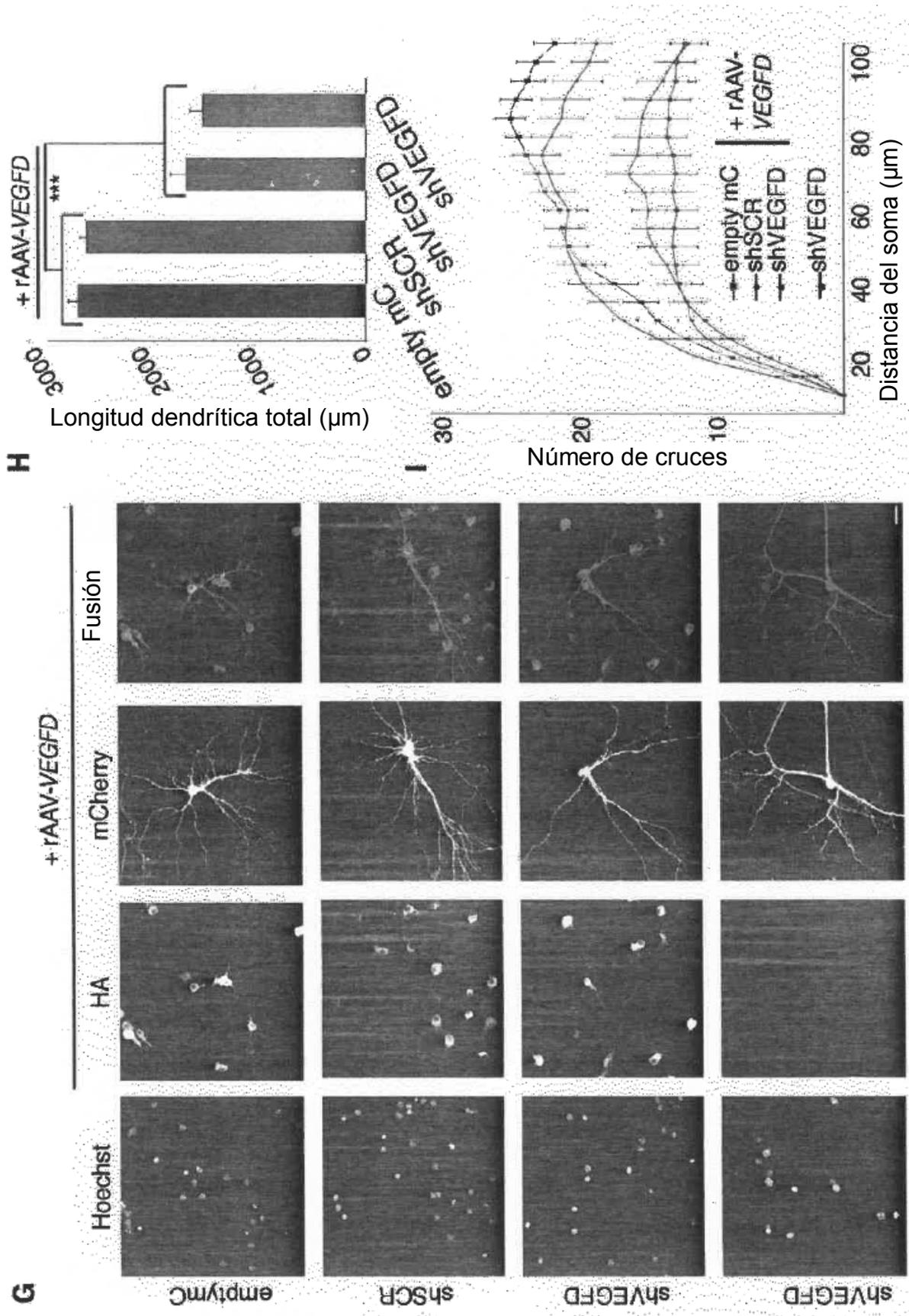


Figura 7 G a I

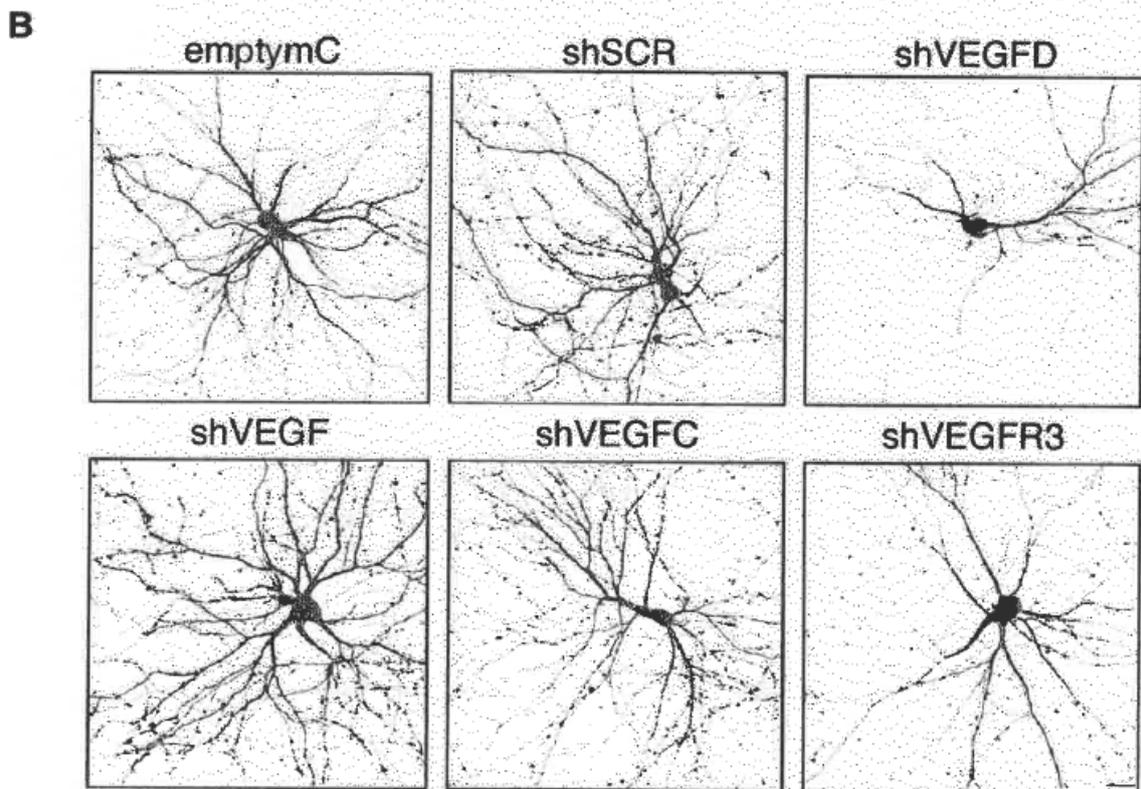
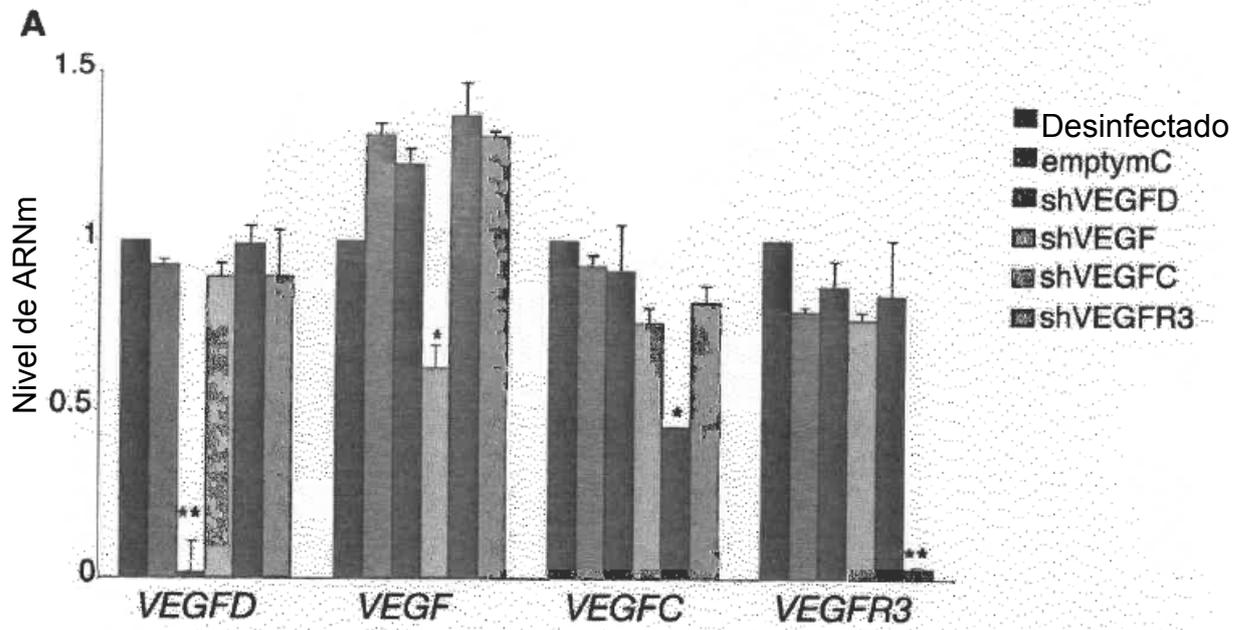
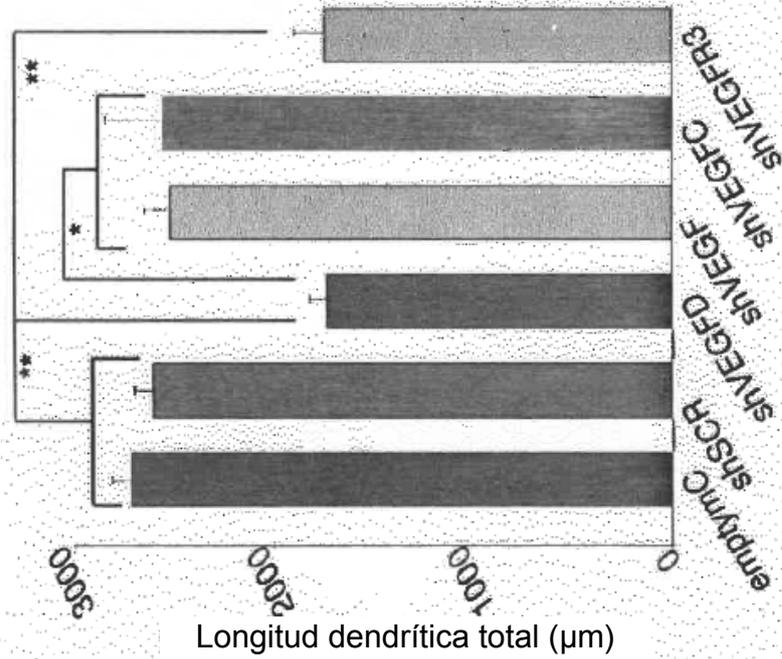
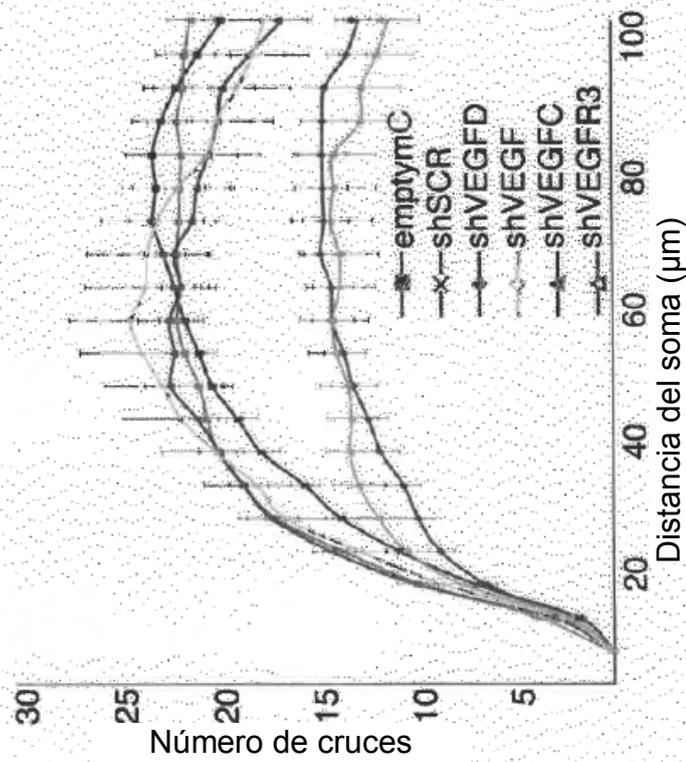


Figura 8 A, B



D



C

Figura 8 C, D

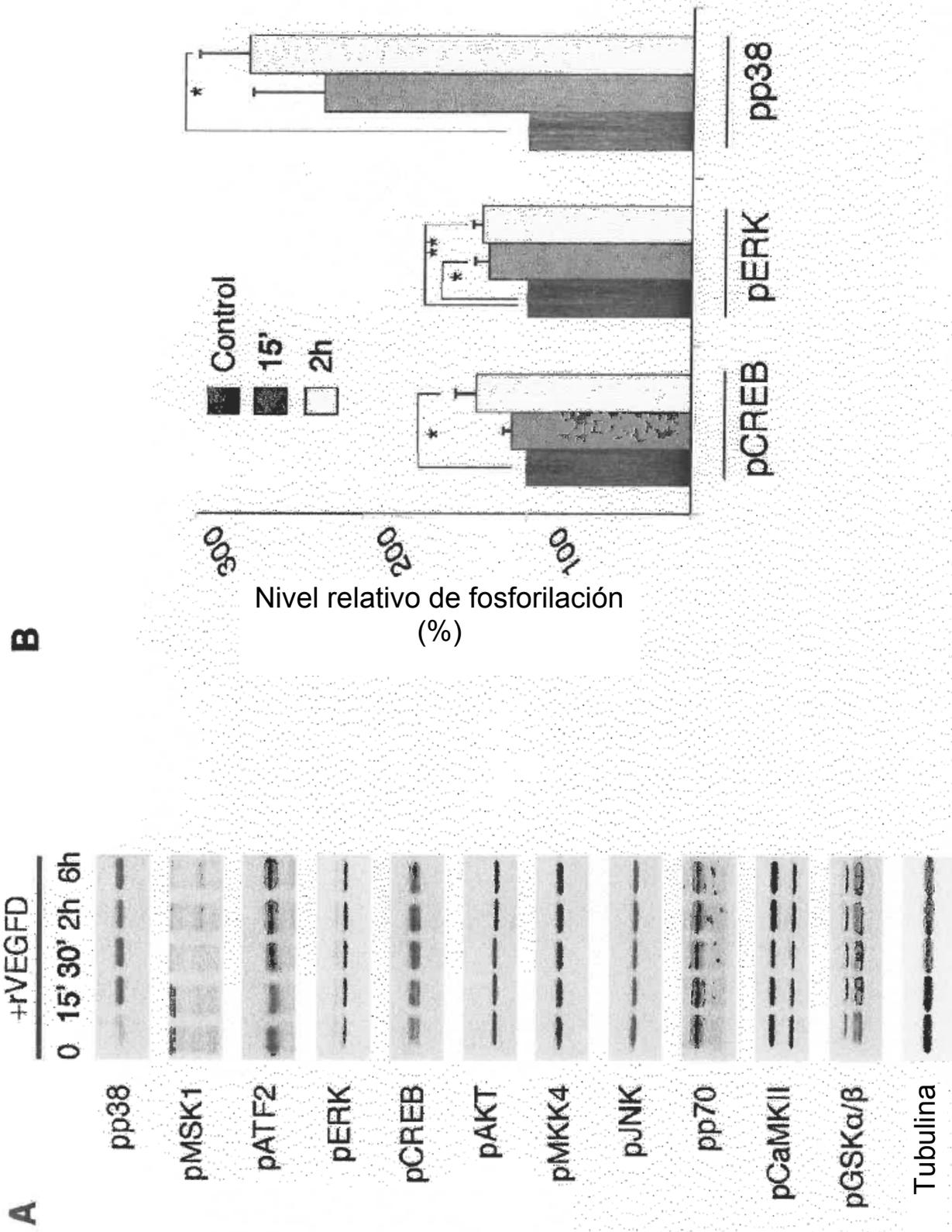


Figura 9 A, B

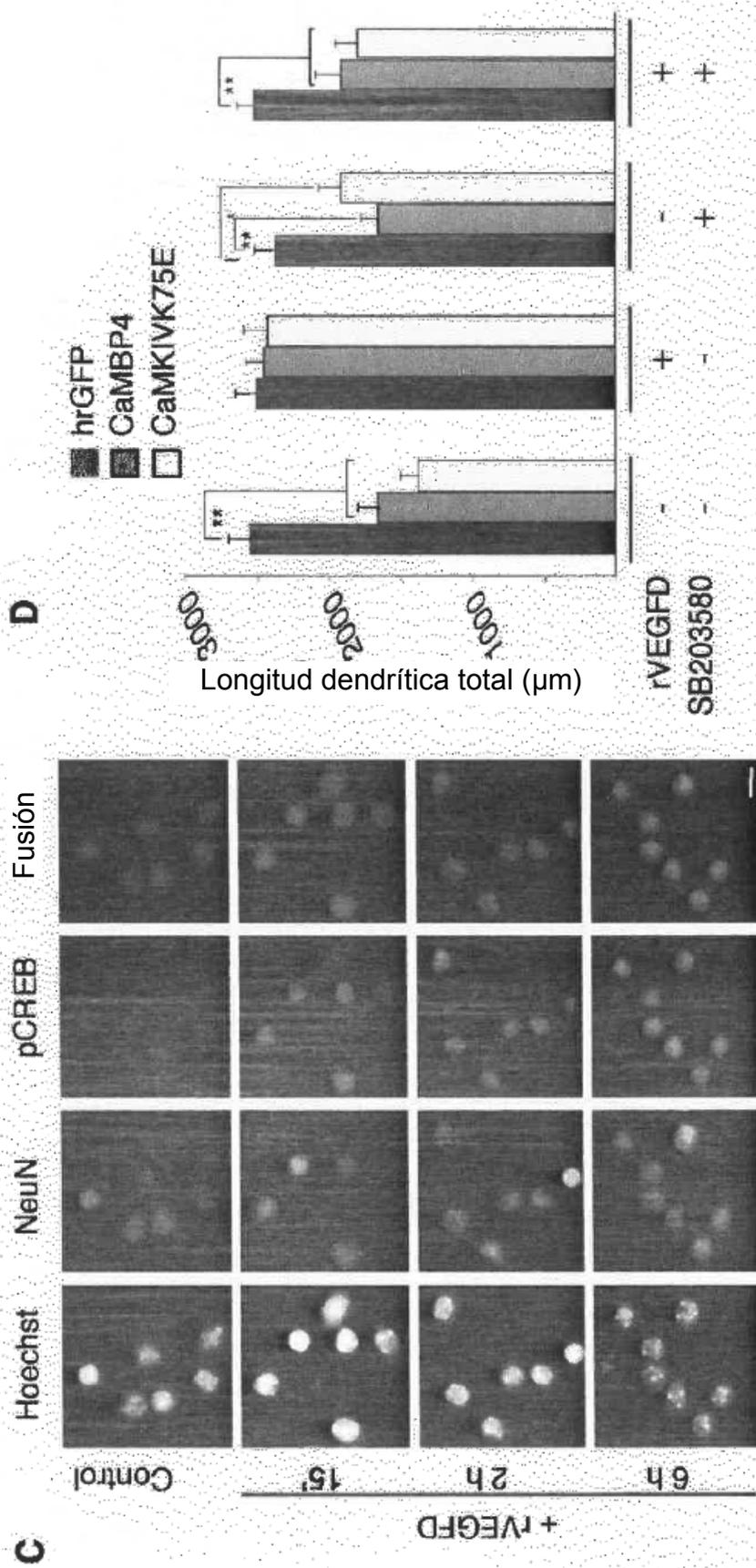


Figura 9 C, D

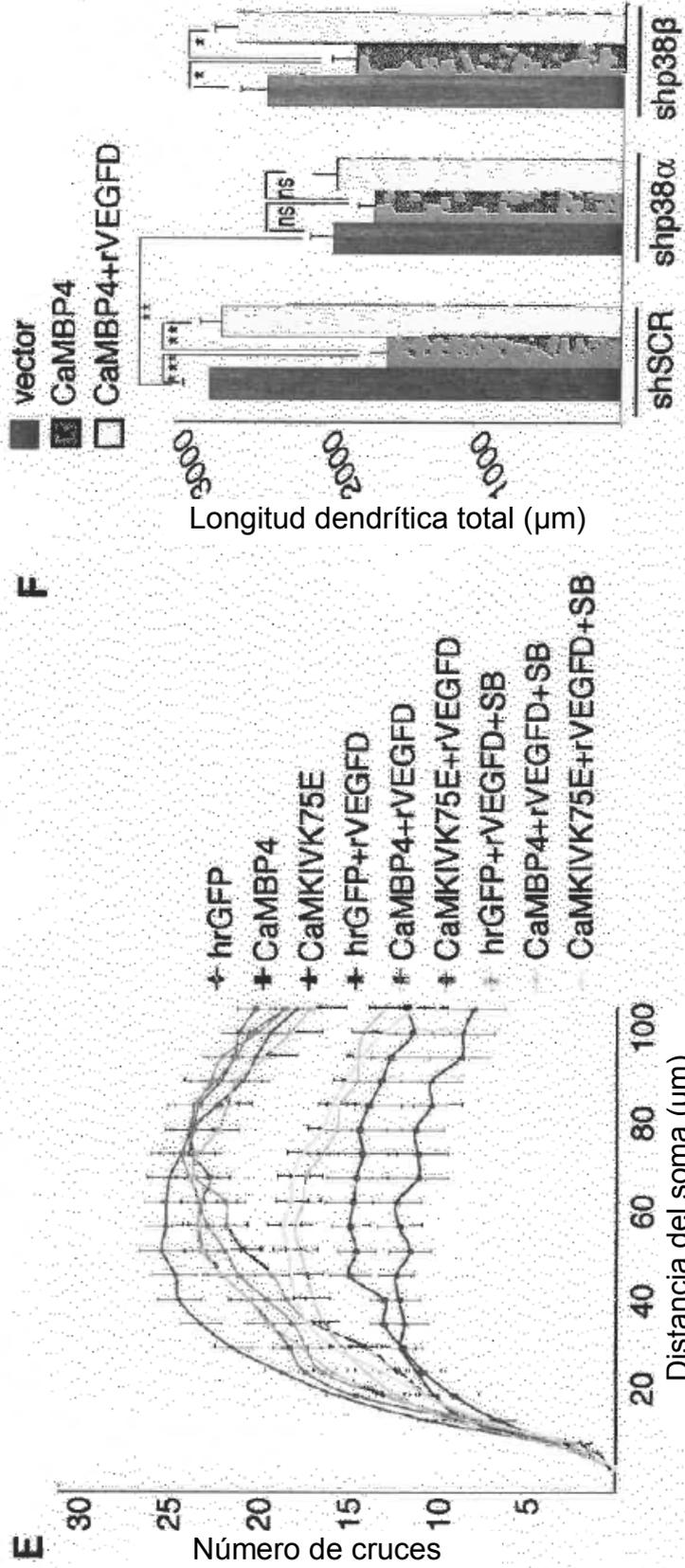


Figura 9 E, F

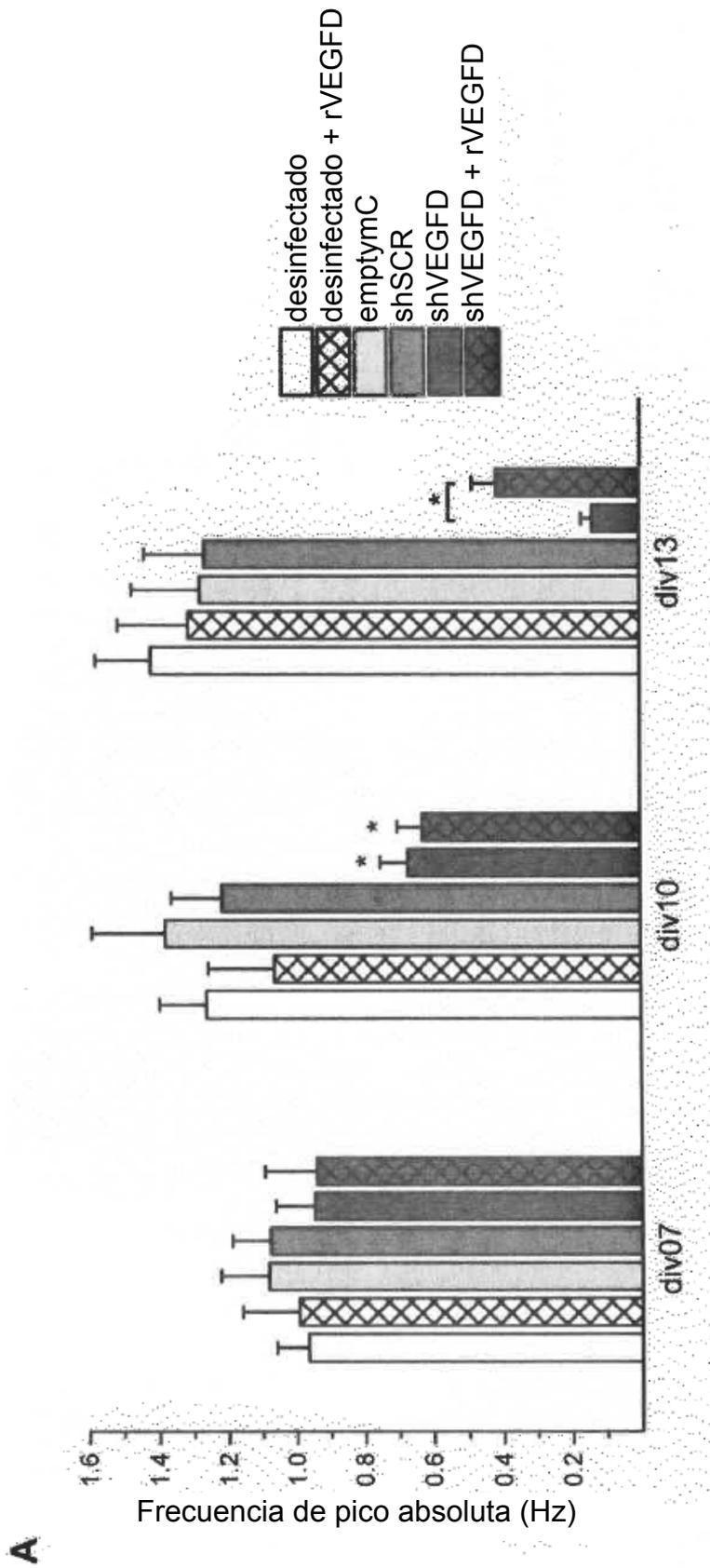


Figura 10 A

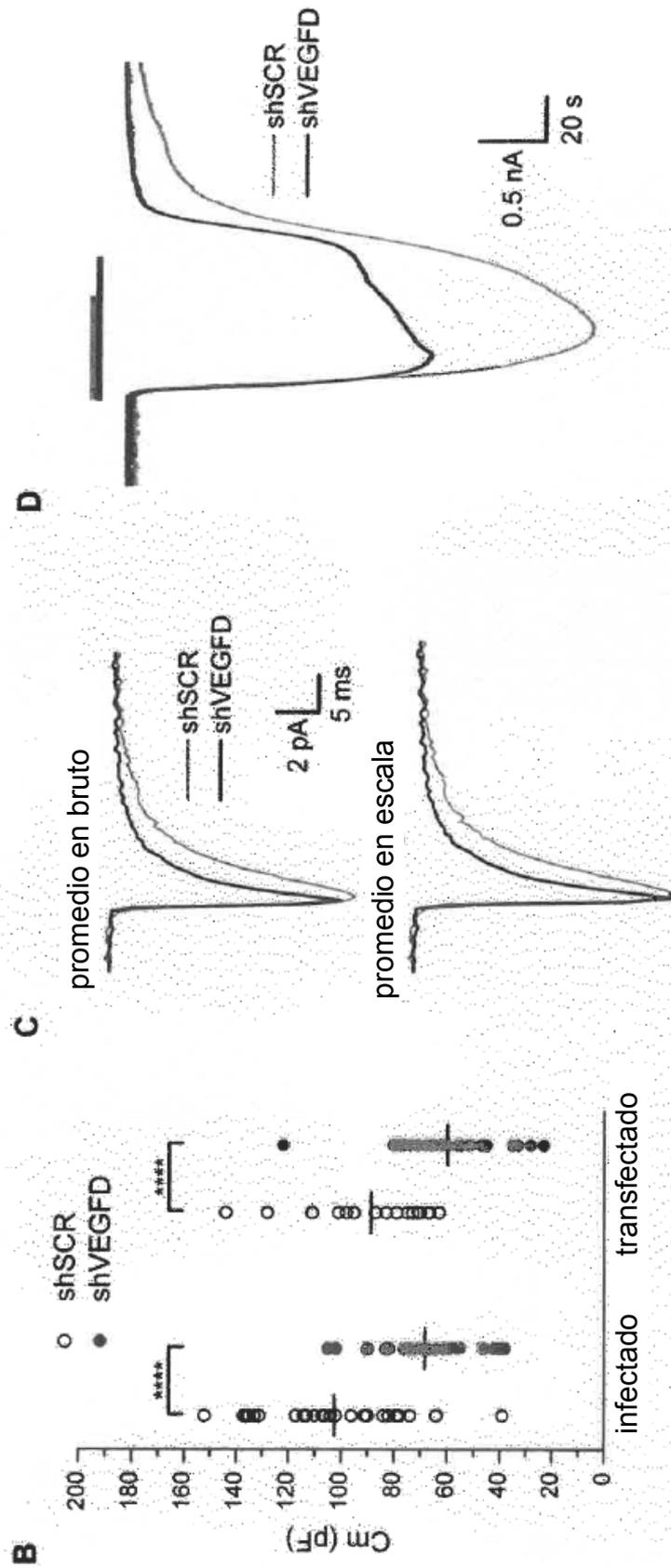


Figura 10 B a D

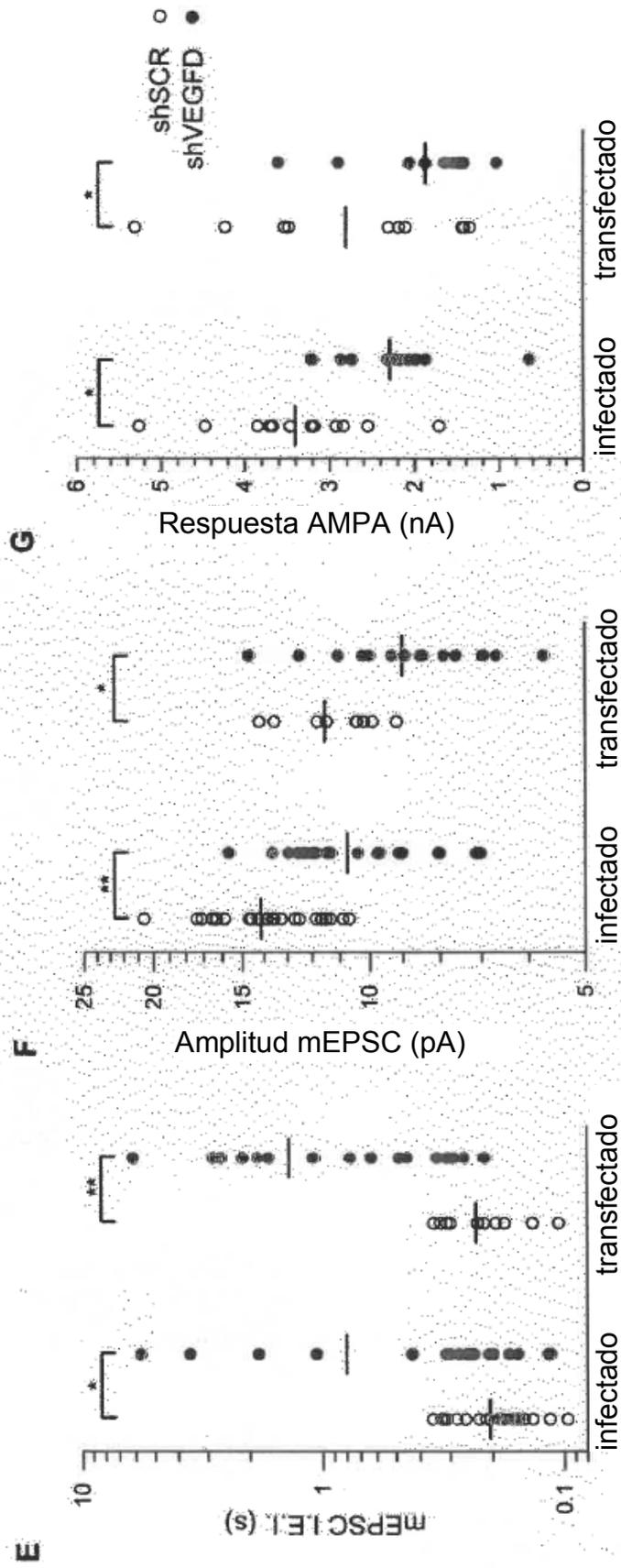


Figura 10 E a G

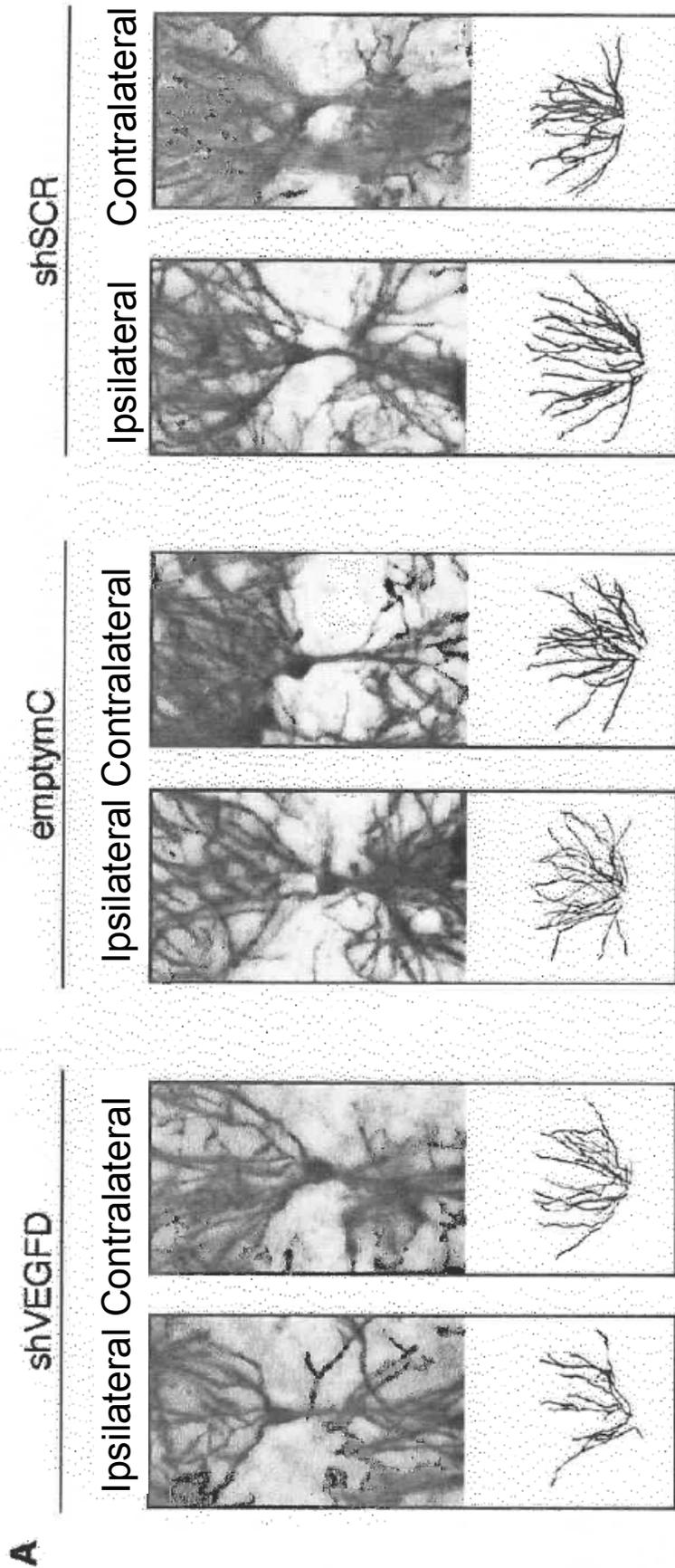


Figura 11 A

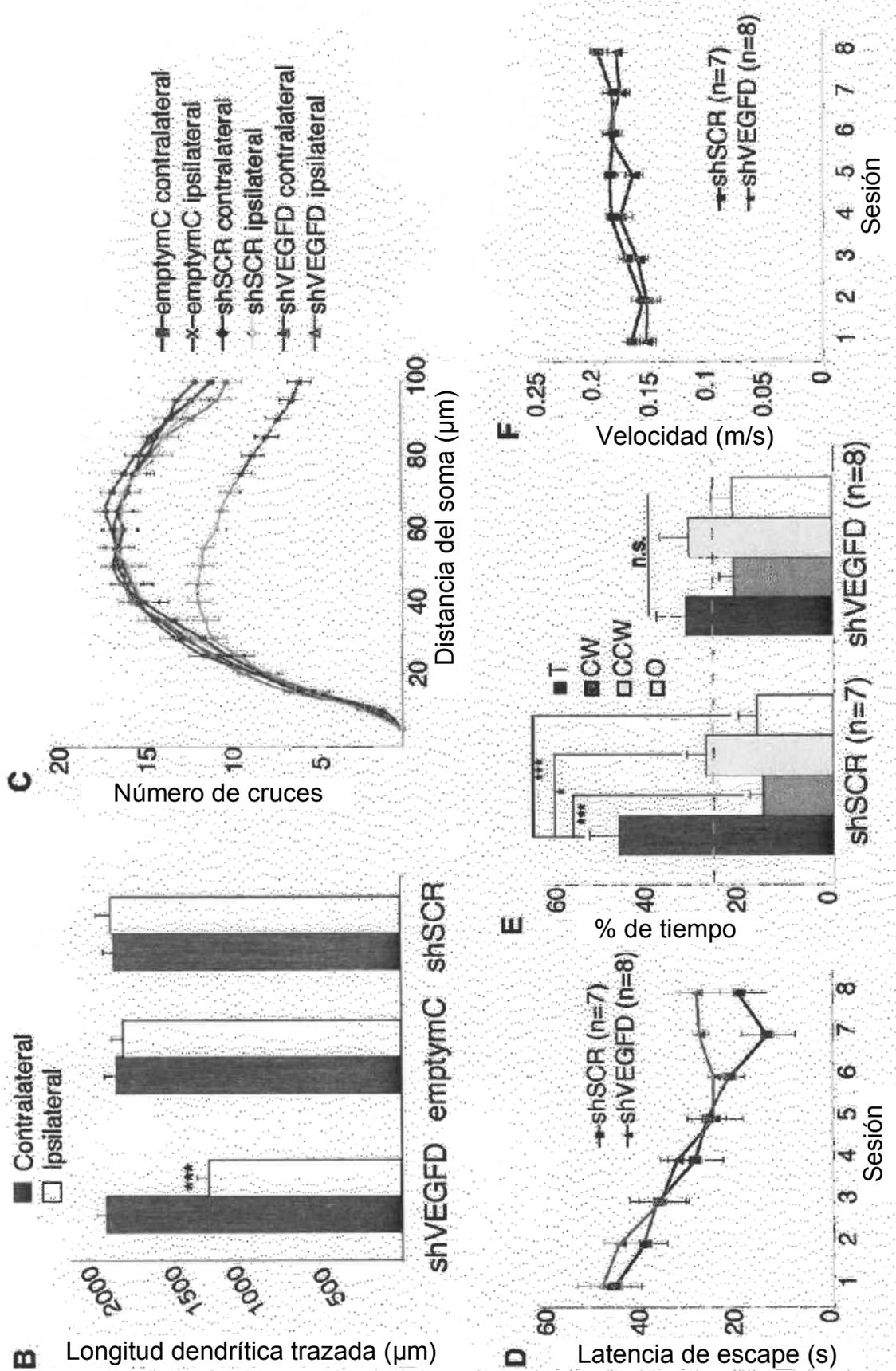


Figura 11 B a F

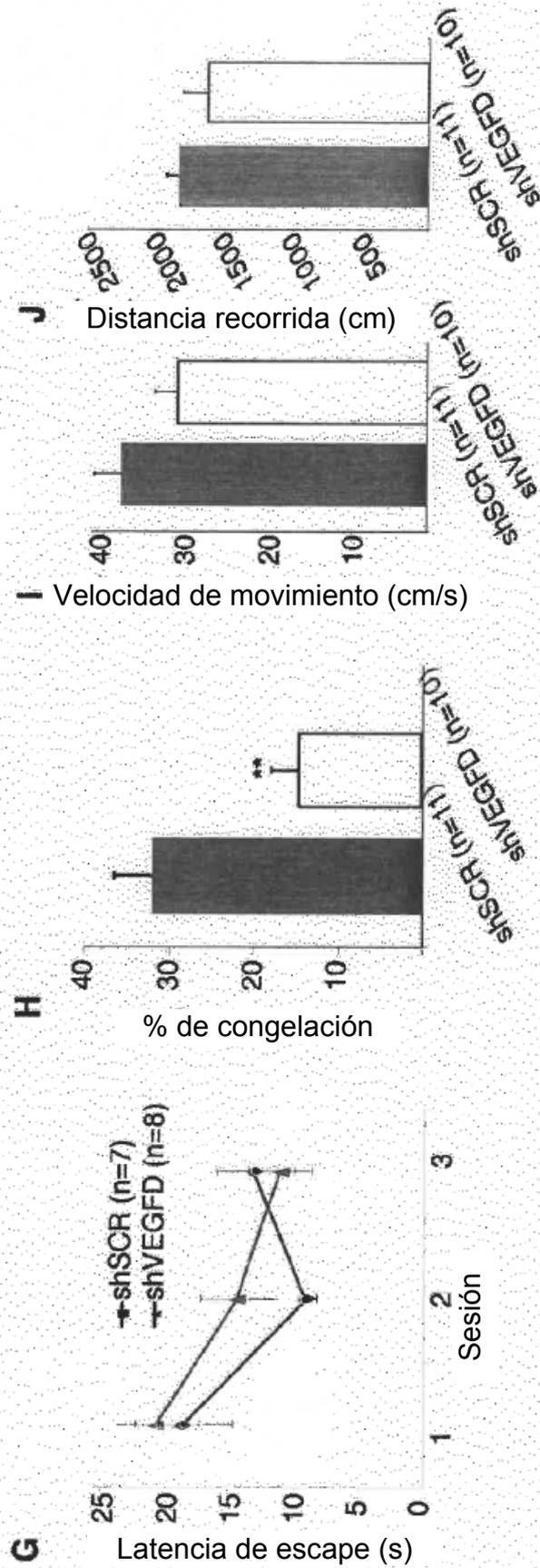


Figura 11 G a J

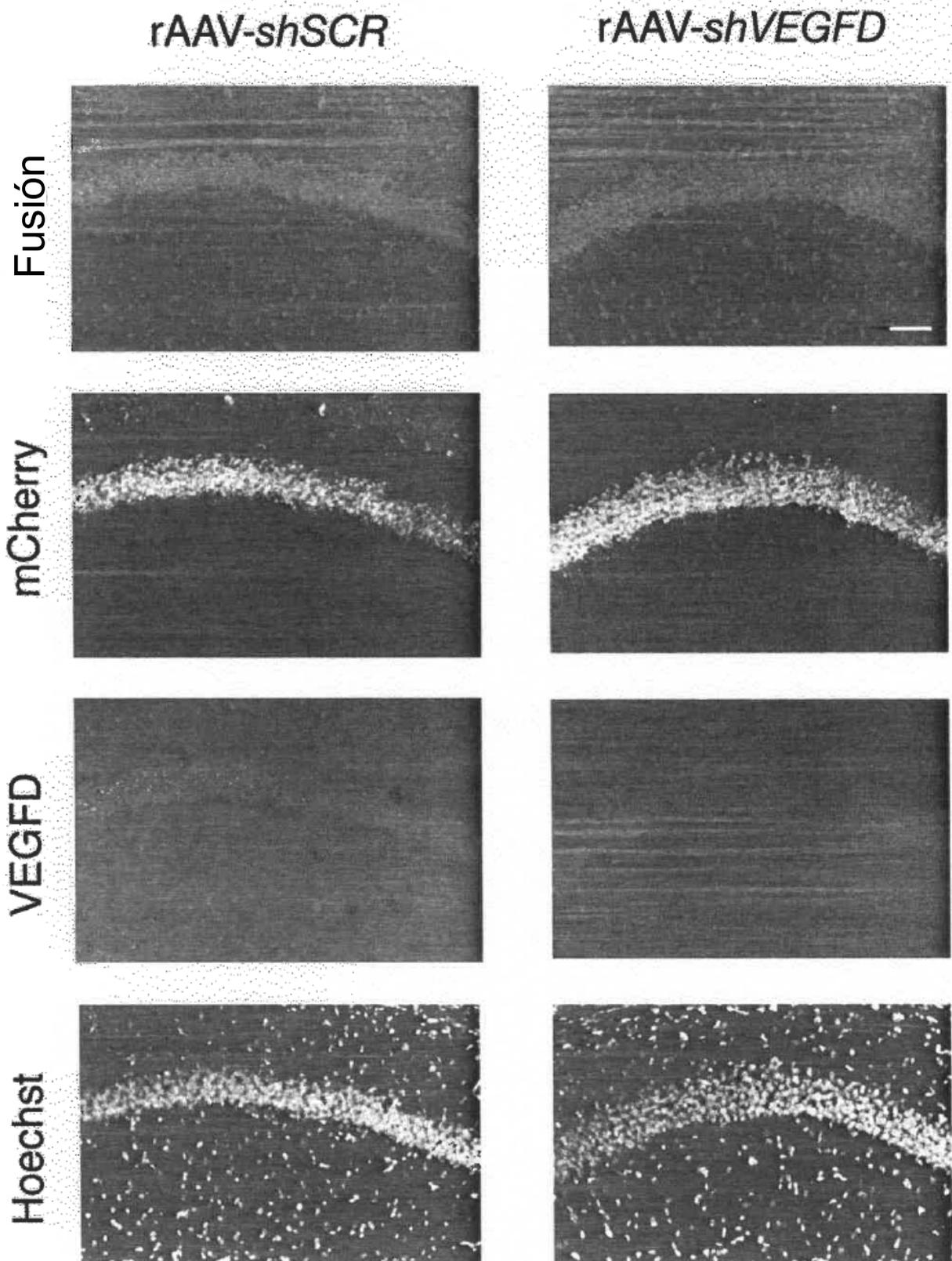


Figura 12

Nº PÉPTIDO	P38	GSK	Nº PÉPTIDO	eficacia en rec	bin	morfo	veg/d	D	I	E	T	L	K	V	I	D	E	E	W	Q	R	T	C	S
1	315	141	1	2.10	++			Ac	K	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I
2	306	163	2	2.04	++			Ac	V	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I
3	274	126	3	1.83	+			Ac	R	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I
4	175	104	4	1.17	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
5	294	143	5	1.96	+			Ac	A	E	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I
6	434	315	6	2.89	+++			Ac	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I			
7	216	109	7	1.44	+			Ac	V	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
8	236	119	8	1.57	+			Ac	L	S	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
9	281	73	9	1.87	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
10	259	80	10	1.73	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
11	229	111	11	1.91	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
12	162	90	12	1.52	+			Ac	L	T	V	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
13	184	90	13	1.53	+			Ac	L	T	F	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
14	173	83	14	1.44	+			Ac	L	T	L	R	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
15	193	127	15	1.61	+			Ac	L	T	L	R	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
16	375	66	16	3.13	+++			Ac	L	T	L	I	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
17	223	113	17	1.46	+			Ac	L	T	L	L	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
18	134	76	18	0.88	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
19	146	78	19	0.95	+			Ac	L	T	L	K	D	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
20	171	94	20	1.12	+			Ac	L	T	L	K	V	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
21	347	80	21	2.27	++			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
22	282	76	22	1.91	+			Ac	L	T	L	K	E	V	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
23	187	62	23	1.22	+			Ac	L	T	L	K	E	L	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
24	132	66	24	0.86	+			Ac	L	T	L	K	E	F	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
25	395	67	25	2.58	++			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
26	265	59	26	1.73	+			Ac	L	T	L	K	E	I	E	E	E	W	Q	R	K	G	I	
27	144	98	27	1.20	+			Ac	L	T	L	K	E	I	N	D	E	E	W	Q	R	K	G	I
28	154	108	28	1.29	+			Ac	L	T	L	K	E	I	O	D	E	E	W	Q	R	K	G	I
29	119	140	29	0.99	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
31	134	128	31	1.11	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	O	E	E	W	Q	R	K	G	I
32	170	87	32	1.42	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
33	108	95	33	0.90	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	
34	151	90	34	1.26	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	D	E	W	Q	R	K	G	I
35	229	83	35	1.91	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	N	W	Q	R	K	G	I	
36	167	85	36	1.39	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	O	W	Q	R	K	G	I	
37	168	83	37	1.40	+			Ac	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I	

Figura 13 A

Nº PEPTIDO	P38	GSK	Nº PEPTIDO	eficacia en rec	bin	morfo	veg/d	D	I	E	T	L	K	V	I	D	E	E	W	Q	R	T	Q	C	S
38	174	100	38	0.77																					
39	261	117	39	1.16	+																				
40	167	135	40	0.74																					
41	228	132	41	1.01	+																				
42	358	126	42	1.58	+																				
43	323	129	43	1.43	+																				
44	223	119	44	0.99																					
45	230	103	45	1.02	+																				
46	179	112	46	0.79																					
47	270	89	47	1.19	+																				
48	350	165	48	2.92	++																				
49	397	183	49	3.30	+++																				
51	239	76	51	1.99	+																				
52	197	115	52	1.64	+																				
53	293	146	53	2.44	++																				
54	513	140	54	4.27	++++																				
55	197	116	55	1.84	+																				
56	590	132	56	4.92	++++																				
57	110	51	57	0.92																					
58	250	72	58	2.08	+																				
59	260	123	59	2.08	++																				
60	349	118	60	2.79	++																				
61	98	87	61	0.78																					
62	94	83	62	0.75																					
64	140	84	64	1.12	+																				
65	349	122	65	2.79	++																				
66	188	81	66	1.50	+																				
67	214	92	67	1.71	+																				
68	413	135	68	3.30	+++																				
69	392	93	69	3.14	+++																				
70	314	111	70	1.83	+																				
71	266	93	71	1.55	+																				
72	87	75	72	0.50																					
73	215	106	73	1.25	+																				
74	203	106	74	1.18	+																				
75	236	95	75	1.37	+																				
76	210	108	76	1.22	+																				
77	214	120	77	1.24	+																				
78	137	78	78	0.80																					
79	222	112	79	1.29	+																				

Figura 13 B

N° PÉPTIDO	P38	GSK	N° PÉPTIDO	eficacia en rec	bln	morfo	vegl-d	I	E	T	L	K	V	I	D	E	E	W	Q	R	T	Q	C	S
80	168	101	80	1.24	+		Ac-	L	gp	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I			-amid
81	135	110	81	1.00			Ac-	L	T	gp	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I			-amid
82	57	74	82	0.42			Ac-	L	T	L	gp	I	D	E	E	W	Q	R	K	G	I			-amid
83	88	92	83	0.65			Ac-	L	T	L	K	gp	D	E	E	W	Q	R	K	G	I			-amid
84	131	77	84	0.97			Ac-	L	T	L	K	E	gp	E	E	W	Q	R	K	G	I			-amid
85	144	84	85	1.07	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	gp	E	W	Q	R	K	G	I			-amid
87	177	90	87	1.31	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	gp	Q	R	K	G	I			-amid
88	202	91	88	1.50	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	gp	R	K	G	I			-amid
89	193	96	89	1.43	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	gp	R	K	G	I			-amid
90	195	93	90	1.45	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	gp	K	G	I			-amid
91	148	94	91	1.10	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	gp	R	G	I		-amid
92	205	80	92	1.52	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	gp	I			-amid
93	237	89	93	1.94	+		Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	gp	R	A	-amid
94	113	75	94	0.93			Ac-	L	T	L	K	E	I	D	E	E	W	Q	R	K	I	gp		-amid
95	194	84	95	1.59	+		Ac-	V	T	V	K	E	V	D	E	E	W	Q	R	K	G	V		-amid
96	112	67	96	0.91	+		Ac-	T	K	E	E	D	E	E	W	Q	R	K	G					-amid
							Ac-	E	T	L	K	V	I	D	E	E	W	Q	R	T	Q	S		-amid

Figura 13 C

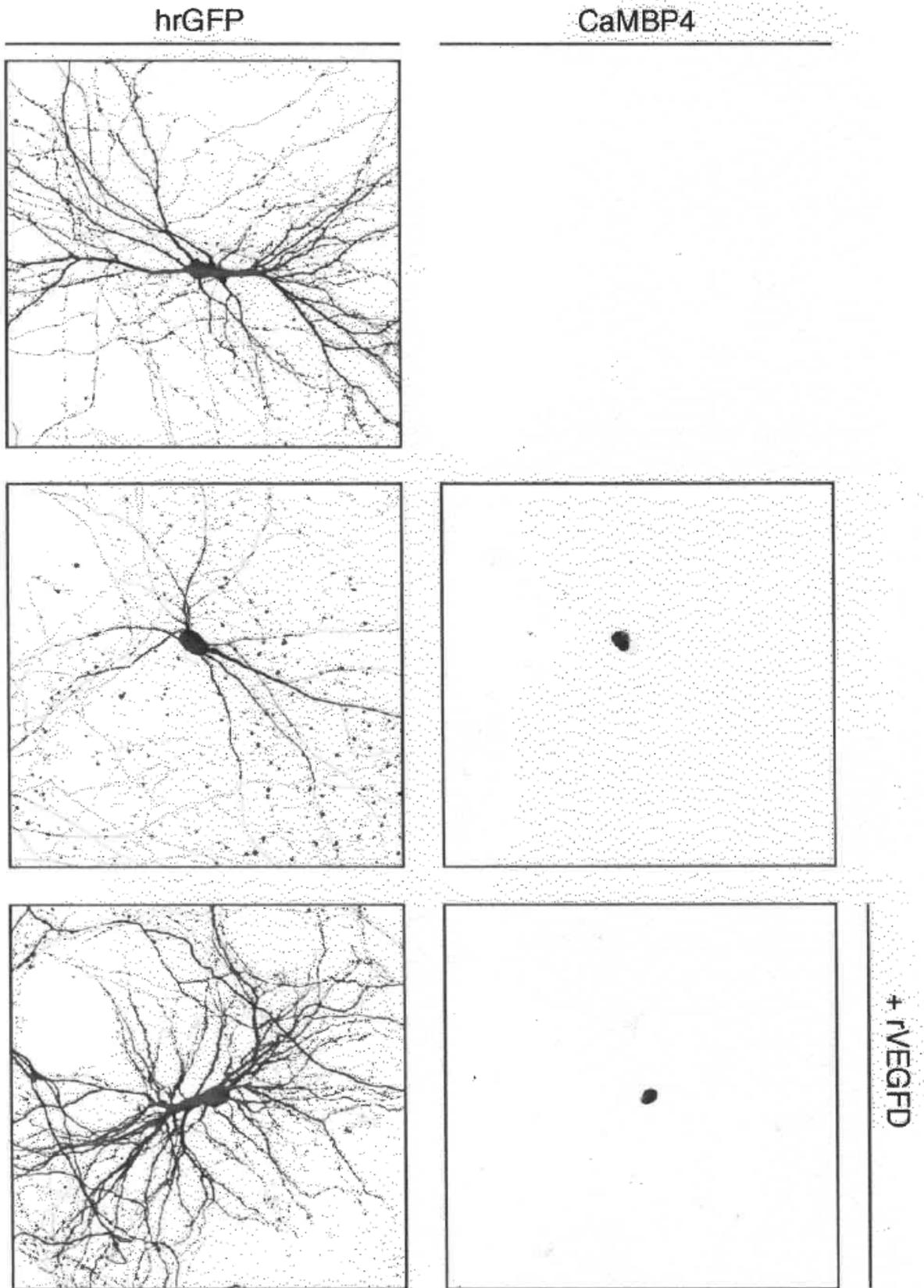


Figura 14

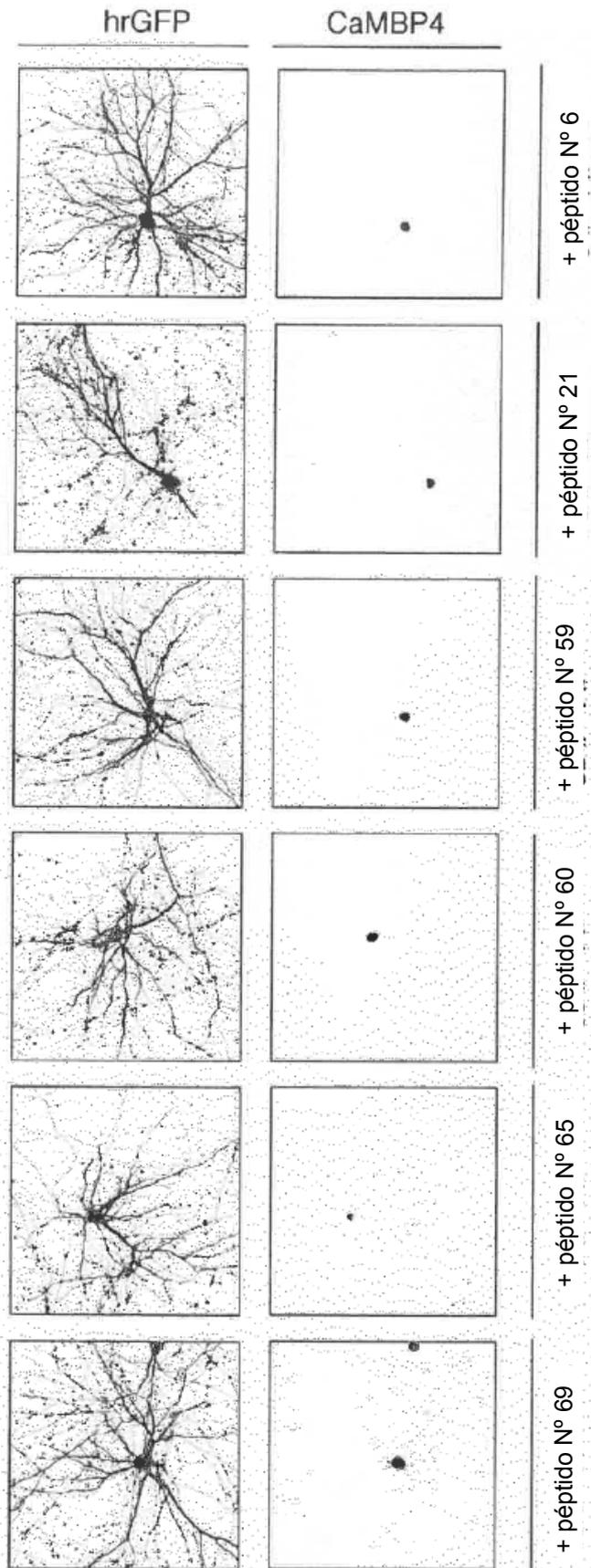


Figura 15

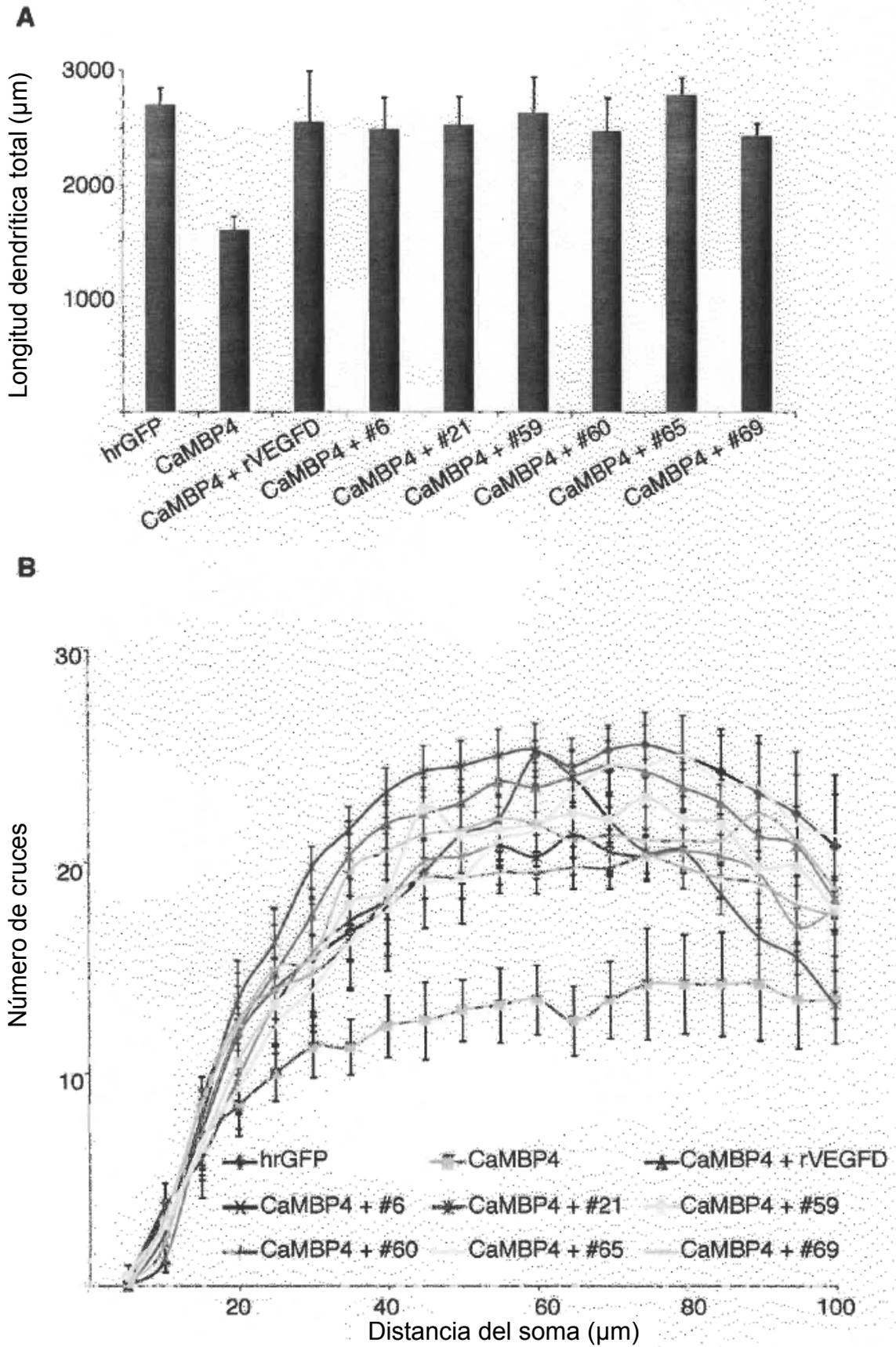


Figura 16