

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 464**

21 Número de solicitud: 201931043

51 Int. Cl.:

C07D 213/04 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.11.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.05.2021

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (85.0%)
Avda. Teniente Flomesta 5, Edif. Convalecencia
30003 Murcia (Murcia) ES y
FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E
INVESTIGACIÓN SANITARIAS DE LA REGIÓN DE
MURCIA (15.0%)

72 Inventor/es:

MULERO MÉNDEZ, Victoriano Francisco ;
PÉREZ OLIVA, Ana Belén;
GARCÍA MORENO, Diana;
MARTÍNEZ MORCILLO, Francisco Javier;
MARTÍNEZ NAVARRO, Francisco Juan;
CANTÓN SANDOVAL, Joaquín;
CAYUELA FUENTES, María Luisa;
MARTÍNEZ MENCHÓN, Teresa y
CORBALÁN VÉLEZ, Antonio Raúl

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **INHIBIDORES DE LA MUERTE CELULAR POR PARTHANATOS PARA SER USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DE LA PIEL**

57 Resumen:

Inhibidor de la muerte celular Parthanatos para ser usado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel. La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de muerte celular parthanatos seleccionado del grupo que comprende: inhibidores de NAMPT, inhibidores de PARP o inhibidores de AIFM1 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.

ES 2 828 464 A1

DESCRIPCIÓN

**INHIBIDORES DE LA MUERTE CELULAR POR PARTHANATOS PARA SER
USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS
DE LA PIEL**

CAMPO DE INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo médico. En particular, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de muerte celular por parthanatos seleccionado del grupo que comprende: inhibidor de NAMPT, inhibidor de PARP y/o inhibidor de AIFM1 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.

ESTADO DEL ARTE

10 Parthanatos es una forma de muerte celular programada que es distinta de otros procesos de muerte celular como la necrosis y la apoptosis. Mientras que la necrosis es causada por una lesión celular aguda que resulta en muerte celular traumática y la apoptosis es un proceso altamente controlado señalado por señales intracelulares apoptóticas, parthanatos es causada por la acumulación de poli (ADP) ribosa (PAR) y la translocación nuclear del factor inductor de apoptosis 1 (AIFM1) desde las mitocondrias. Parthanatos también se conoce como muerte celular dependiente de la polimerasa 1 de PAR (PARP1). PARP1 media parthanatos cuando se sobreactiva en respuesta al estrés genómico extremo y sintetiza PAR, lo que causa la translocación nuclear de AIFM1. La activación excesiva de PARP1 está involucrada en enfermedades que afectan a cientos de millones de personas en todo el mundo. Las enfermedades bien conocidas relacionadas con la sobreactivación de PARP1 incluyen la enfermedad de Parkinson, derrame cerebral, ataque cardíaco y diabetes. También tiene un uso potencial como tratamiento para mejorar la enfermedad y diversas afecciones médicas como la diabetes y la obesidad.

25 En consecuencia, NAMPT, PARP y AIFM1 son reguladores clave aguas arriba para la activación de parthanatos.

El gen *NAMPT* codifica una proteína que es la enzima limitante de la velocidad en la vía de recuperación del de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) que convierte la nicotinamida (NAM) en mononucleótido de nicotinamida (NMN) en mamíferos para permitir la biosíntesis de NAD⁺. También se ha demostrado que NAMPT es una citocina (conocida como PBEF) que promueve la maduración de células B e inhibe la apoptosis de neutrófilos.

Se ha descrito que PARP1 desempeña un papel relevante en algunas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, como enfermedades neurológicas (enfermedad de Parkinson), sepsis, artritis, colitis, diabetes e infarto de miocardio. Una razón importante para esta relación es la muerte celular regulada independiente de caspasa impulsada por PARP1, Parthanatos. Bajo condiciones fisiológicas, el daño al ADN provocado por el metabolismo celular es manejado con éxito por PARP1. Sin embargo, el daño del ADN alquilante, el estrés oxidativo, la hipoxia, la hipoglucemia o la activación de las vías inflamatorias pueden desencadenar la hiperactivación de PARP1.

La PARilación excesiva agota el NAD⁺ celular y el ATP, aunque no implica necesariamente la muerte celular. Sin embargo, la acumulación de polímeros PAR y proteínas PARiladas alcanzan las mitocondrias causando la despolarización del potencial de membrana y la liberación de AIFM1 en el citosol, donde recluta el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) al núcleo. En el núcleo, la actividad de nucleasa AIFM1-MIF ejecuta una fragmentación de ADN a gran escala que produce la muerte celular.

Por otro lado, la psoriasis y la dermatitis atópica, o eccema, son dos enfermedades inflamatorias crónicas cutáneas no contagiosas, cuya prevalencia global es 0.1-3% y 2-20%, respectivamente. Desafortunadamente, la prevalencia parece estar aumentando con el tiempo. Si bien la incidencia de dermatitis atópica es común en la infancia, mejora en la adolescencia y reaparece durante los años treinta, la prevalencia de psoriasis aumenta después de los cuarenta años. Además, aunque ambas enfermedades tienen una predisposición genética, los factores ambientales actúan como desencadenantes de la patología. A pesar de ser enfermedades recurrentes e incapacitantes que afectan tanto física como mentalmente, ninguna de ellas suele poner en peligro la vida. Sin embargo, las citocinas y las quimiocinas producidas en la lesión llegan a la sangre y, en consecuencia, estos pacientes sufren comorbilidades. En la psoriasis, las comorbilidades más comunes causadas por la inflamación sistémica (especialmente IL-1 β y TNF α) son complicaciones cardiovasculares, síndrome metabólico (como obesidad, dislipidemia, aterosclerosis y diabetes mellitus tipo 2) y enfermedades autoinmunes (la complicación de la psoriasis desarrolla artritis psoriásica). El desarrollo de comorbilidades es progresivo, siendo un proceso conocido como la "marcha inflamatoria de la piel". Aunque algunos estudios encontraron resultados similares en la dermatitis atópica, según algunos autores, las comorbilidades más comunes son la rinitis alérgica, el asma (como resultado de la sobreexpresión de IgE mediada por linfocitos TH2) y, en menor grado, la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide.

La dermatitis atópica se caracteriza por enrojecimiento de las lesiones eccematosas de la piel que provocan prurito intenso (picazón, debido a la liberación de histamina) y, en consecuencia, inducen la interrupción de la barrera epidérmica debido al rascado. De hecho, la vecindad de las lesiones cutáneas muestra hiperinervación y aumento de la sensación de picazón. Además, en estas regiones la microbiota está alterada (disbiosis), con una colonización principal por *Staphylococcus aureus*. En el sitio de la inflamación, hay una presencia importante de células de Langerhans (células dendríticas de la piel) y células T auxiliares (linfocitos T auxiliares CD4+). Predominantemente, las respuestas inmunes TH2 (liberan citocinas IL4, IL10 e IL13) y TH12 (producen IL22) contribuyen a la patología.

La psoriasis vulgar es la forma de psoriasis más extendida, que afecta la piel y las articulaciones con una susceptibilidad genética muy relevante. La manifestación histológica es la hiperproliferación de queratinocitos y el aumento del grosor del tejido (acantosis), que se caracteriza por el desarrollo de placas escamosas y eritematosas plateadas. Estas lesiones provocan dolor, ardor y sensación de picazón, que generalmente ocurren en el cuero cabelludo, el tronco y las superficies extensoras de las extremidades. El sistema inmunitario innato y adaptativo contribuyen a la patología en la dermis y la epidermis. Sorprendentemente, los queratinocitos, neutrófilos, células dendríticas y células T (respuestas inmunes TH17 mediadas por IL17 e IL23) juegan un papel crucial.

En general, el primer tratamiento aplicado a ambos pacientes son las terapias tópicas seguidas de fototerapia. En pacientes moderados a severos, los inmunosupresores sistémicos pueden ser una alternativa, pero no a largo plazo debido a los efectos secundarios. Finalmente, los anticuerpos neutralizantes contra las citocinas características son los tratamientos más caros, sin embargo, conducen a un rescate parcial / casi total de la inflamación. Es de destacar que la inhibición de IL4 o IL13 en dermatitis atópica e IL17, IL23 o TNF α en psoriasis son los tratamientos más eficientes.

En consecuencia, existe una necesidad médica insatisfecha de encontrar terapias efectivas para tratar enfermedades inflamatorias de la piel, particularmente psoriasis o dermatitis atópica. La presente invención se centra en resolver este problema y se propone en este documento la inhibición de la muerte celular de parthanatos como una estrategia clave para tratar enfermedades inflamatorias de la piel, por ejemplo, psoriasis o dermatitis atópica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención demuestra que las enfermedades inflamatorias de la piel, por ejemplo, la psoriasis y la dermatitis atópica, mostraron niveles diferenciales de ARNm de genes clave que actúan como reguladores de la muerte celular por parthanatos. Particularmente, se

5 demuestra que los pacientes con psoriasis y dermatitis atópica mostraron niveles diferenciales de ARNm de genes que codifican enzimas clave del metabolismo de NAD⁺. La inhibición genética (con CRISPR-Cas9) y farmacológica de NAMPT con, por ejemplo, Daporinab (FK866, APO866) disminuyó efectivamente la producción de peróxido de hidrógeno, la infiltración de neutrófilos en la piel, la activación de NFκB, y el daño del ADN, la

10 hiperproliferación y la muerte celular de los queratinocitos en los modelos de pez cebra de inflamación crónica de la piel. Todos estos efectos fueron revertidos por la suplementación exógena con NAD⁺. Sorprendentemente, la inhibición genética (inactivación de PARP1 con CRISPR o sobreexpresión de PAR glicohidrolasa (PARG)) y farmacológica (Veliparib, Olaparib y Talazoparib) de PARP tenía el mismo efecto que la inhibición de NAMPT. Del

15 mismo modo, el tratamiento de larvas con secuestradores de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS / RNS), o la inhibición farmacológica y genética de la translocación de AIFM1 de las mitocondrias al núcleo, también redujo la inflamación de la piel en estos modelos preclínicos de inflamación de la piel, lo que sugiere que la sobreactivación de PARP1 en respuesta al daño en el ADN inducido por ROS / RNS media la muerte de las

20 células de queratinocitos a través de parthanatos. El análisis inmunohistoquímico de la piel lesionada de pacientes con psoriasis mostró una inducción dramática tanto de las cantidades de proteína NAMPT en los núcleos de queratinocitos como de la actividad de PARP tanto en los núcleos de queratinocitos como de células dérmicas. Colectivamente, los resultados proporcionados por la presente invención sugieren que la hiperactivación de PARP1 en

25 respuesta al daño del ADN inducido por ROS / RNS media la inflamación de la piel en la psoriasis y la dermatitis atópica, y que la inhibición farmacológica de NAMPT, PARP y / o AIFM1 podría ser estrategias terapéuticas poderosas para tratar estos trastornos inflamatorios de la piel.

Por lo tanto, la presente invención presenta por primera vez la inhibición de la muerte celular

30 de parthanatos como una estrategia clave para tratar los trastornos inflamatorios de la piel, como la psoriasis y la dermatitis atópica. La inhibición de la muerte celular por parthanatos se puede lograr mediante el uso de inhibidores dirigidos a cualquiera de los genes que participan en la regulación de este tipo de muerte celular, como, por ejemplo, NAMPT, PARP1 y/o

AIFM1. En resumen, la característica técnica especial o contribución sobre la técnica anterior que ofrece la presente invención es la inhibición de la muerte celular de parthanatos para el tratamiento de trastornos inflamatorios de la piel. Para hacerlo, cualquiera de las proteínas que participa en la regulación de la muerte celular de parthanatos, como, por ejemplo, NAMPT, PARP1 y / o AIFM1, puede usarse como objetivos terapéuticos. Entonces, aunque los inhibidores específicos dirigidos a NAMPT, PARP1 y / o AIFM1 se usan en la presente invención como prueba de concepto, cualquier molécula química o biológica capaz de inhibir NAMPT, PARP y/o AIFM1 podría usarse en la presente invención para inhibir partanatos y, en consecuencia, tratar a pacientes que sufren trastornos inflamatorios de la piel como la psoriasis y la dermatitis atópica.

En consecuencia, el primer aspecto de la presente invención se refiere a inhibidores de la muerte celular por parthanatos seleccionados del grupo que comprende: inhibidores de NAMPT, inhibidores de PARP y/o inhibidores de AIFM1, para ser usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel. Alternativamente, la presente invención se refiere a un método para tratar pacientes que padecen enfermedades inflamatorias de la piel que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la muerte celular por parthanatos seleccionado del grupo que comprende: inhibidor de NAMPT, inhibidor de PARP y/o inhibidor de AIFM1.

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de muerte celular de parthanatos seleccionado del grupo que comprende: inhibidor de NAMPT, inhibidor de PARP o inhibidor de AIFM1 y, opcionalmente, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, para ser usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.

El tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método in vitro para identificar y producir compuestos candidatos útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel que comprende: (a) Determinar si la muerte celular por parthanatos se ha inhibido midiendo al menos la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, S-adenosilmetinina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en una muestra biológica aislada del paciente después de la administración del compuesto candidato; (b) en el que si después de la administración del compuesto candidato se determina que la muerte celular por parthanatos se ha inhibido porque la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM,

NMN, SAM, SAH y/o PAR; y o la proteólisis de AIFM1 son estadísticamente inferiores en comparación con la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 antes de la administración del compuesto candidato (estos valores se usan como valores de referencia o control), esto es
5 indicativo de que el compuesto candidato es eficaz en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.

El cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método in vitro para determinar la eficacia o la respuesta a un tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel que comprende: (a) Determinar si la muerte celular por parthanatos se ha inhibido midiendo al
10 menos la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en una muestra biológica aislada del paciente después de la administración del tratamiento; (b) en donde si después de la administración del tratamiento se determina que la muerte celular por parthanatos se ha inhibido debido a que la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH,
15 NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 son estadísticamente inferiores en comparación con la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 antes de la administración del tratamiento (estos valores se usan como valores de referencia o control), esto es indicativo de que el tratamiento es efectivo.

20 El quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de la piel y/o para seleccionar pacientes que padecen enfermedades inflamatorias de la piel para un tratamiento con inhibidores de la muerte celular por parthanatos que comprende: (a) Determinar si la muerte celular de parthanatos se ha activado midiendo al menos la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de
25 NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en una muestra biológica aislada del paciente; (b) en el que si se determina que la muerte celular por parthanatos se ha activado debido a que la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 son estadísticamente mayores en comparación con la actividad enzimática de NAMPT y
30 PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en pacientes sanos (estos valores se usan como valores de referencia o control), esto es indicativo de que el paciente padece una enfermedad inflamatoria de la piel y se puede recomendar un tratamiento con inhibidores de la muerte celular por parthanatos.

El sexto aspecto de la presente invención se refiere a un kit adaptado para identificar y producir compuestos candidatos útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, para determinar la eficacia o respuesta a un tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel o para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de la piel que comprende: a)

5 Herramientas para obtener una muestra biológica del paciente, y b) herramientas o reactivos para determinar si la muerte celular por parthanatos se activa o inhibe, midiendo al menos la actividad enzimática NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1.

10 En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria de la piel es psoriasis o dermatitis atópica.

En una realización preferida, los inhibidores se administran mediante una administración local o sistémica, preferiblemente administración tópica.

15 En una realización preferida, el inhibidor de NAMPT se selecciona de la lista que comprende: FK-866 (APO866 o daporinad), STF-118804, KPT-9274, GMX1778 (CHS828) y/o nicotinamida (NAM); el inhibidor de PARP se selecciona de la lista que comprende: olaparib (AZD2281, KU0059436), AZD2461, talazoparib (BMN 673), veliparib (ABT-288), niraparib, iniparib (INN, BSI 201), rucaparib (AG-014699, PF- 01367338), CEP-9722, CEP-8983, INO-1001 (3-Aminobenzamida), PJ34, A966492 y/o AG-14361; y el inhibidor de AIFM1 es N-fenilmaleimida y ácido p-cloromercurifenilsulfónico (PCMBS).

20 En una realización preferida, el producto farmacéutico se formula como una crema, espuma, gel, loción, pomada, o se incluye en parches transdérmicos.

Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos:

25 • El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra "que comprende". Por lo tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.

• Por "que consiste en" se entiende incluyendo, y limitado a, lo que sigue a la frase "consistente en". Por lo tanto, la frase "consistente en" indica que los elementos enumerados son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.

• "Excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente en las composiciones de la invención y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.

5 • Por "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad que, cuando se administra como se describe aquí, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria de la piel. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el modo de administración y similares. Un experto en la materia puede determinar una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual utilizando
10 experimentación de rutina, en base a la información proporcionada en este documento.

• La expresión "valor de referencia" se refiere a los valores utilizados como "control". Un "valor de referencia" puede ser un valor umbral o un valor de corte. Típicamente, un "valor umbral" o "valor de corte" se puede determinar experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente en función de
15 las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería una persona con conocimientos ordinarios en la materia. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falso positivo y falso negativo). Preferiblemente, el experto en la materia puede comparar los niveles (o puntuaciones) de biomarcadores
20 obtenidos de acuerdo con el método de la invención con un valor umbral definido. Por lo general, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar utilizando una curva de Características operativas del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles de los biomarcadores en un grupo de referencia, se puede usar el análisis algorítmico para el tratamiento estadístico
25 de las concentraciones medidas de biomarcadores en las muestras biológicas a analizar, y así obtener un estándar de clasificación que tenga importancia para la clasificación de la muestra. El nombre completo de la curva ROC es curva característica del operador receptor, que también se conoce como curva característica de operación del receptor. Se utiliza principalmente para pruebas clínicas de diagnóstico bioquímico. La curva ROC es un
30 indicador integral que refleja las variables continuas de tasa positiva verdadera (sensibilidad) y tasa positiva falsa (especificidad 1). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Una serie de valores de corte diferentes (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados normales y anormales de la

prueba de diagnóstico) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego, la sensibilidad se usa como coordenada vertical y la especificidad se usa como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano a la esquina superior izquierda del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores de alta sensibilidad y alta especificidad. El valor de AUC de la curva ROC está entre 1.0 y 0.5. Cuando $AUC > 0.5$, el resultado del diagnóstico mejora cada vez más a medida que el AUC se acerca a 1. Cuando el AUC está entre 0.5 y 0.7, la precisión es baja. Cuando AUC está entre 0.7 y 0.9, la precisión es buena. Cuando AUC es superior a 0.9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con una computadora. El software o los sistemas existentes en la técnica pueden usarse para dibujar la curva ROC, tales como: software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. El tratamiento con NAD + altera el patrón de distribución de neutrófilos. Representación esquemática de una larva de pez cebra de 3 dpf. Los puntos rojos representan neutrófilos ubicados principalmente en tejido hematopoyético caudal (THC), resaltados con un cuadro verde (A). Cuantificación del porcentaje de neutrófilos fuera del THC en 3 dpf embriones tratados 48 horas con NAD (0.25, 0.5 y 1 mM), considerando el cuadro descrito en A como los límites del THC (B). Se muestran imágenes de fusión representativas (campo claro y canales rojos) de larvas de pez cebra dsRED de cada grupo (B'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 2. NAD+ y sus precursores inducen estrés oxidativo en la piel. Para la obtención de imágenes de H_2O_2 , los embriones de 72 hpf tratados 48 horas con metabolitos NAD+ se incubaron en una solución de 50 μ M de acetyl-pentafluorobencenosulfonil fluoresceína durante 1 hora. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia para la inducción mediada por NAD+ (A) y mediada por NAM/NMN (B) de H_2O_2 en la piel del pez cebra. Se muestran imágenes superpuestas representativas (campo claro y canales rojos) de larvas de pez cebra lyz:dsRED de cada grupo (A' y B'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey **** $p \leq 0,0001$.

Figura 3. Las altas concentraciones de FK-866 desencadenan la inflamación muscular.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en embriones de 3 dpf tratados 48 horas con dosis crecientes de FK-866 (1, 10 y 100 μ M) (A). Se muestran imágenes representativas (canal verde) de larvas de pez cebra NF-kB:eGFP de cada grupo (A') así como la media \pm S.E.M. para cada grupo. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey **** $p \leq 0,0001$.

Figura 4. NAD⁺ revierte la inducción de NFkB en el músculo por altas concentraciones de FK-866.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en embriones de 72 hpf tratados 48 horas con 1 mM NAD⁺ en presencia o ausencia de 100 μ M FK-866 (A). Se muestran imágenes superpuestas representativas (campo claro y canal verde) de larvas de pez cebra NF-kB:eGFP de cada grupo (A') así como la media \pm S.E.M. para cada grupo. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey **** $p \leq 0,0001$.

Figura 5. FK-866 reduce el estrés oxidativo en la piel.

Distribución de neutrófilos en embriones de pez cebra de 3 dpf tratados 48 horas con FK-866 (A), cuantificación de la producción de H₂O₂ en la piel (B) e imágenes superpuestas representativas (canal verde y rojo) de las larvas de pez cebra *lyz: dsRED* de cada grupo (C). La media \pm S.E.M. para cada grupo también se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$.

Figura 6. La inhibición farmacológica de Nampt disminuye el estrés oxidativo y la inflamación de la piel y restaura la integridad epitelial en el mutante *spint1a*.

Distribución de neutrófilos de embriones de pez cebra de 3 dpf tratados 48 horas con FK-866 (10, 50 y 100 μ M) (A), cuantificación de la producción de H₂O₂ en la piel (B) e imágenes de fusión representativas (campo claro y canal rojo) de *lyz: pez cebra dsRED*. Se muestran las larvas de cada grupo (C). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon usando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Figura 7. NAD⁺ intensifica el fenotipo mutante *spint1a* e interfiere con los efectos beneficiosos de FK-866 en la piel.

Distribución de neutrófilos de 3 dpf de embriones de pez cebra tratados 48 horas con 1 mM NAD⁺ en presencia o ausencia de 10 μ M de FK-866 (A). Se muestran imágenes superpuestas representativas (campo claro y canal rojo) de larvas *lyz: dsRED* de pez cebra de cada grupo (A') así como la media \pm S.E.M. para cada grupo. Los

valores de P se calcularon usando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 8. Los niveles totales de NAD⁺ y NADH fueron modulados eficientemente por tratamientos con FK-866 y NAD⁺. Se utilizaron embriones silvestres y mutantes *spint1a* de

5 72 hpf tratados durante 2 días con 10 μM FK-866 y 1 mM NAD⁺ para la determinación total de NAD⁺ y NADH por ELISA. La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey ** $p \leq 0.01$.

Figura 9. FK-866 rescata la alta actividad transcripcional de NF κ B en mutantes

10 ***spint1a*.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de embriones silvestres y mutantes *spint1a* de 72 hpf tratados durante 2 días con 10 μM de FK-866 (A). Se muestran imágenes representativas (canal verde) de larvas de pez cebra NF- κ B: eGFP de cada grupo (A'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 10. Los inhibidores farmacológicos de Parp1 reducen la dispersión de neutrófilos y la inflamación de la piel, y restablecen la integridad epitelial. Embriones silvestres y

15 mutantes *spint1a* de 72 hpf tratados durante 2 días con olaparib (A y B), veliparib o talazoparib (C). Cuantificación de la dispersión de neutrófilos fuera de la THC (A y C) y actividad transcripcional de NF κ B en la piel (B). Se muestran imágenes representativas (campo claro y canal rojo en A' & C'; canal verde en B') de larvas *lyz:dsRED* y NF- κ B:eGFP de cada grupo. La media \pm S.E.M. para cada grupo también se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 11. Los altos niveles de PAR en la piel del mutante *spint1a* son contrarrestados

25 **por FK-866 y olaparib.** Western blot representativo con anti-PAR y anti-Gapdh de lisados de aleta caudal (resaltados en rojo) de larvas de 3 dpf silvestres y mutantes *spint1a* tratados durante 48 horas con FK-866 10 μM u Olaparib 100 μM .

Figura 12. La inhibición farmacológica de Nampt o Parp1 reduce significativamente la hiperproliferación de queratinocitos en el mutante *spint1a*. Cuantificación de células

30 positivas para BrdU de 48 hpf embriones de pez cebra silvestres y mutantes *spint1a* tratados durante 24 horas con FK-866 10 μM u olaparib 100 μM (A). Se muestran imágenes superpuestas representativas de proyección de máxima intensidad de un barrido confocal en Z

de larvas de pez cebra de cada grupo (A'). Los WIHC con anti-BrdU (verde), anti-p63 (marcador de queratinocitos basal rojo) se tiñeron con DAPI (azul). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey **** $p \leq 0,0001$.

- 5 **Figura 13. El análisis de daños en el ADN revela una mayor susceptibilidad y un mayor número de lesiones en la piel de las larvas mutantes en spint1a.** Cuantificación de células γ H2Ax positivas de larvas de pez cebra de 48 hpf silvestres y mutantes spint1a tratados durante 24 horas con FK-866 10 μ M u olaparib 100 μ M (A). Del mismo modo, alrededor de 60 aletas caudales de larvas fueron amputados y desagregados para el análisis del ensayo de cometas en condiciones alcalinas (B). Se muestran imágenes de fusión representativas de la proyección de máxima intensidad de un barrido Z de las larvas de pez cebra de cada grupo (A'). WIHC con anti- γ H2Ax (verde), anti-p63 (marcador de queratinocitos basal, rojo) se tiñeron con DAPI (azul). La media \pm S.E.M. (A) y la mediana (B) para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey (A) y la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (B) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.
- 10
- 15

- Figura 14. La inhibición farmacológica de Parp1 o Nampt no induce apoptosis.** Cuantificación de células positivas para caspasa 3 activa de larvas de pez cebra de 48 hpf silvestres y mutantes spint1a tratados durante 24 horas con 10 μ M de FK-866 o 100 μ M de Olaparib (A). Se muestran imágenes de fusión representativas de la proyección de máxima intensidad de un barrido Z de las larvas de pez cebra de cada grupo (A'). WIHC con anti-casp3 activa (verde), anti-p63 (marcador de queratinocitos basales, rojo) y DAPI (azul) (A'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon usando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey.
- 20

- 25 **Figura 15. Olaparib bloquea la muerte celular en la piel de los mutantes spint1a.** Cuantificación de células TUNEL+ de larvas de 48 hpf silvestres y mutantes spint1a tratados durante 24 horas con 100 μ M de Olaparib (A). Se muestran imágenes representativas de larvas de pez cebra de cada grupo (A'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.
- 30

Figura 16. Los antioxidantes NAC, mito-TEMPO y tempol rescatan el reclutamiento de neutrófilos cutáneos y la morfología de la piel de larvas mutantes spint1a. Embriones

silvestres y mutantes *spint1a* de 72 hpf tratados durante 2 días con 100 μ M NAC (A), 100 μ M mito-TEMPO y 100 nM tempol (B y C). Cuantificación de la dispersión de neutrófilos fuera de la THC (A y B) y actividad transcripcional de NF κ B en la piel (C). Se muestran imágenes representativas (campo claro y canal rojo en A' & B'; canal verde en C') de larvas de pez cebra *lyz:dsRED* y *NF-kB:eGFP* 1 de cada grupo. La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon usando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey. ns, no significativo. **** $p \leq 0.0001$.

Figura 17. NMMA no altera la infiltración de neutrófilos en la piel en larvas mutantes *spint1a*. Medición de la distribución de neutrófilos de larvas de pez cebra de 3 dpf silvestres y mutantes *spint1a* tratados 48 horas con 1 mM NMMA (A). Se muestran imágenes superpuestas representativas (campo claro y canal rojo) de larvas de *lyz:dsRED* de pez cebra de cada grupo (A'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon usando ANOVA unidireccional y prueba de rango múltiple de Tukey. ns, no significativo, **** $p \leq 0,0001$.

Figura 18. La inhibición farmacológica de la translocación de *Aifm1* reduce la infiltración de neutrófilos y mejora la morfología de la piel. Medición de la distribución de neutrófilos de larvas de 3 dpf mutantes *spint1a* tratados 48 horas con 10 nM NP (A). Se muestran imágenes superpuestas representativas (campo claro y canal rojo) de larvas de *lyz:dsRED* de pez cebra de cada grupo (A'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey **** $p \leq 0,0001$.

Figura 19. FK-866 y olaparib mejoran la integridad epitelial de la piel en mutantes *psoriasis*. Determinación del fenotipo de la piel de embriones de pez cebra de 2.5 dpf tratados 1.5 días con FK-866 50 μ M u olaparib 100 μ M (A). Se muestran imágenes representativas de campo claro de larvas de pez cebra de cada grupo (A'). La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 20. Perfiles de expresión diferencial de genes que codifican enzimas metabólicas clave NAD⁺ en dermatitis atópica y psoriasis. Datos transcriptómicos de muestras de psoriasis humana (GDS4602) (A) y dermatitis atópica (GSE57225) (B) de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO). (C) Diagrama de Venn que muestra la expresión génica común y específica en la piel lesionada. La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los

valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey (A) y la prueba t (B). ns, no significativo. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Indoleamina 2,3-dioxigenasa, IDO1; NA fosforibosiltransferasa, NAPRT; NAD + sintetasa, NADSYN1; NR quinasa 1/2, NRK1 / 2; Purina nucleósido fosforilasa, PNP; 5 Quinolinato fosforibosiltransferasa, QPRT; Triptófano 2,3-dioxigenasa, TDO2.

Figura 21. La expresión de genes que codifican enzimas metabólicas clave NAD+ se correlacionan con las de marcadores genéticos inflamatorios específicos de psoriasis y dermatitis atópica. Los datos transcriptómicos en la piel lesionada de psoriasis humana (GDS4602) (A) y muestras de dermatitis atópica (GSE57225) (B) de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) se emplearon para estudiar su correlación con la expresión de genes marcadores inflamatorios. Se muestra la regresión lineal para cada grupo. Los valores de P se calcularon utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 22. Perfil de expresión génica diferencial de componentes de parthanatos e hidrolasas PAR en psoriasis y dermatitis atópica. Datos transcriptómicos de muestras de psoriasis humana (GDS4602) (A) y dermatitis atópica (GSE57225) (B) de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO). (C) Diagrama de Venn que muestra la expresión génica común y específica en la piel lesionada. La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon utilizando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey (A) y la prueba t (B). ns, no significativo. * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$. ADP-ribosilhidrolasa 3, ARH3; Proteína de hipercolesterolemia autosómica recesiva, ARH1; Ectonucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa 1, ENPP; Mono-ADP ribosilhidrolasa 1, MACROD1; Mono-ADP ribosilhidrolasa 2, MACROD2; Nudix Hydrolase 16, NUDT16; Terminal ADP-Ribosa Protein Glycohydrolase 1, TARG1.

Figura 23. Correlación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de parthanatos y PAR con marcadores genéticos inflamatorios específicos de psoriasis y dermatitis atópica. Se emplearon datos transcriptómicos en la piel lesionada de psoriasis humana (GDS4602) (A) y muestras de dermatitis atópica (GSE57225) (B) de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) para estudiar su correlación con los niveles de expresión de marcadores de genes inflamatorios. Se muestra la regresión lineal para cada grupo. Los valores de P se calcularon utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 24. Recuperación de niveles reducidos de NAD⁺ y SAM en suero de pacientes con psoriasis tratados con PUVA. Medición por HPLC-MS de metabolitos séricos de pacientes con psoriasis antes y después de recibir un tratamiento de fototerapia. La media \pm S.E.M. para cada grupo se muestra. Los valores de P se calcularon usando ANOVA unidireccional y la prueba de rango múltiple de Tukey * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Figura 25. NAMPT (A) y PAR (B) se sobreexpresan en lesiones psoriásicas humanas. Imágenes representativas de secciones de biopsias de piel sanas y psoriásicas que se han inmunoteñido con un anticuerpo monoclonal anti-NAMPT (sc-166946) o un anticuerpo monoclonal anti-poli (ADP-ribosa) (ALX-804-220) y luego ligeramente teñido con hematoxilina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

Ejemplo 1.1. Animales.

Las líneas AB, TL y WIK de pez cebra silvestres (*Danio rerio*) obtenidas del Centro Internacional de Recursos de Pez Cebra (ZIRC) se usaron y manejaron de acuerdo con el manual del pez cebra (Westerfield, 2000). La línea transgénica de pez cebra Tg (lyz:dsRED2) contiene las regiones reguladoras genómicas del gen de la lisozima C de pez cebra, promotor específico de neutrófilos, que controla la expresión de la proteína fluorescente roja DsRED2, y Tg(NF κ B-RE: eGFP) fueron proporcionados por Profs. Phil Crosier y Stephen A. Renshaw, respectivamente. Las líneas mutantes de pez cebra *spint1a* (alelo mutante *hi2217*) y el *atp11a* (alelo mutante *m14*) se aislaron de screenings de mutagénesis inducida por etil metanosulfonato, respectivamente. Ambas líneas fueron proporcionadas por el Prof. Matthias Hammerschmidt. Los experimentos realizados cumplen con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (Directiva 2010/63 / UE) y el RD 53/2013 español. Los experimentos y procedimientos se realizaron según lo aprobado por los Comités de Bioética de la Universidad de Murcia (números de aprobación # 75/2014, # 216/2014 y 395/2017) y el Comité de Investigación Clínica Ética del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (número de aprobación # 8/13).

Ejemplo 1.2. Tratamientos químicos.

Los embriones de pez cebra se descorionaron manualmente a 24 hpf. Las larvas fueron tratadas de 24 hpf a 48 hpf o 72 hpf por inmersión química en baño a 28 °C. La incubación se

llevó a cabo en una placa de 6 pocillos que contenía 20-25 larvas / pocillo en agua de huevos (incluidas sales marinas de 60 µg / ml en agua destilada) suplementado con sulfóxido de dimetilo al 1% (DMSO).

Ejemplo 1.3. Imágenes de larvas de pez cebra.

5 Se obtuvieron imágenes de 72 hpf de larvas empleando tricaína tamponada (200 µg / ml) disuelta en agua de huevos. Las imágenes se capturaron con un microscopio estereoscópico LEICA MZ16FA de epifluorescencia configurado con filtros fluorescentes verdes y rojos. Todas las imágenes se adquirieron con la cámara integrada en el microscopio estereoscópico y se analizaron para determinar el número de leucocitos (lyz:dsRED) y su distribución en las
 10 larvas. La actividad transcripcional de NF-κB se visualizó y midió con la línea de pez cebra NFκB-RE:eGFP.

Las imágenes de H₂O₂ se cuantificaron empleando el sustrato fluorogénico de células vivas acetilo-pentafluorobencenosulfonilo de fluoresceína (Cayman Chemical). Brevemente, se enjuagaron aproximadamente 20 embriones de 72 hpf con agua de huevos y se recogieron en
 15 un pocillo de una placa de 24 pocillos con 50 µM del sustrato en DMSO al 1% durante 1 hora.

Se utilizó el software ImageJ para determinar la fluorescencia de intensidad media de una región de interés común (ROI) colocada en la piel dorsal para la cuantificación de la producción de H₂O₂. De manera similar, se utilizó un ROI localizado en el músculo o la piel
 20 para obtener fluorescencia de intensidad media de la línea transgénica nfkb:eGFP.

Ejemplo 1.4. Inmunohistoquímica de montaje completo (WIHC).

Se usó el ensayo de incorporación de BrdU para determinar la proliferación celular. Los embriones de 48 hpf se incubaron en 10 mM de BrdU disuelto en agua de huevos durante 3 horas a 28 °C, seguido de un lavado de una hora con agua de huevo y fijación en PFA al 4%
 25 durante la noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente (RT). Para el resto de las técnicas de inmunofluorescencia, los embriones / larvas se fijaron directamente en paraformaldehído al 4% (PFA), como se indicó anteriormente. Los embriones / larvas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con tween-20 al 0,1% (PBST) 3 veces durante 5 minutos. Con el fin de deshidratar la muestra progresivamente, se emplearon 25% / 75% de metanol
 30 (MeOH) / PBST, 50% / 50% de MeOH / PBST y 75% / 25% de MeOH / PBST y 100% de

MeOH durante 5 minutos. En este punto, los embriones se almacenaron a -20 °C hasta la inmunofluorescencia.

Para proceder con la inmunofluorescencia, las muestras se rehidrataron en soluciones decrecientes de MeOH / PBST, como se describió previamente, y luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBST. Para la tinción con BrdU, el siguiente paso consiste en aplicar durante 30 minutos una solución de HCl 2 N en PBS suplementado con 0,5% de Triton X-100 (PBSTriton), seguido de 3 lavados con PBSTriton durante 15 minutos. La etapa de bloqueo se llevó a cabo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente con una solución PBSTriton suplementada con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y DMSO al 0,1%. La incubación primaria de anticuerpos en la solución de bloqueo se realizó durante la noche a 4 °C o 3-4 horas a temperatura ambiente. Después de eso, las larvas se lavaron 6 veces durante 5 minutos. La incubación en anticuerpo secundario en solución de bloqueo se realizó durante 2-3 horas en la oscuridad. A partir de entonces, el protocolo siguió en la oscuridad. Para eliminar el anticuerpo secundario no unido, los embriones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBT. En este paso, la muestra estaba lista para la tinción con 2-(4-amidinofenilo) -6-indolcarbamidina (DAPI, 1: 1000) en PBT durante 20 minutos seguido de un paso de lavado de 3 veces durante 10 minutos con PBT Finalmente, los embriones se transfirieron a 80% de glicerol / 20% de PBST y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta la obtención de imágenes.

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: conejo anti-BrdU (Abcam, ab152095, 1: 200), ratón anti-p63 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7255, 1: 200), conejo Anti-Caspase-3 activa (Bd Bioscience, # 559565, 1: 250) y anti-H2AX.XS139ph de conejo (phospho Ser139) (GeneTex, GTX127342, 1: 200). Los anticuerpos secundarios fueron cabra anti-conejo Alexa Fluor-488 (sondas moleculares, CAT # A11008, 1: 1000) y cabra anti-ratón Cyanine 3 (tecnologías de la vida, A10521, 1: 1000). Las imágenes para la tinción de BrdU se tomaron usando un Zeiss Confocal (LSM710 META), las otras manchas fueron adquiridas por ZEISS Apotome.2. Todas las imágenes fueron procesadas usando el software ImageJ.

Ejemplo 1.5. Ensayo TUNEL.

Los embriones / larvas se fijaron y se deshidrataron como se describió anteriormente. Posteriormente, los embriones / larvas se enjuagaron con acetona 100% pre-enfriada (-20 °C)

y luego se incubaron acetona al 100% a -20 °C durante 10 minutos. Luego, las muestras se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBST y se incubaron en una solución de TritonX-100 al 0,1% y citrato de sodio al 0,1% (10%) en PBS durante 15 minutos para permeabilizar aún más los embriones / larvas. El siguiente paso consistió en enjuagar las muestras 2 veces durante 5 minutos en PBST. Después de eliminar completamente el PBST de las muestras, se agregaron 50 µL de mezcla de reacción TUNEL fresca compuesta por 5 µL de solución enzimática mezclada con 45 µL de solución de etiquetado (kit de detección de muerte celular in situ, POD, ROCHE, versión 15.0) durante 1 hora a 37 °C, seguido de 5 lavados con PBST durante 5 minutos. La etapa de bloqueo se llevó a cabo durante al menos 1 hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo. Para proceder con el ensayo TUNEL, se eliminó el tampón de bloqueo y se añadieron 50 µL de POD (anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C en un balancín. Los embriones se enjuagaron 4 veces durante 30 minutos en PBST y se incubaron en 1 ml de solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) durante 30 minutos en la oscuridad y se transfirieron a una placa de 24 pocillos. A partir de entonces, el protocolo siguió en la oscuridad. Se agregaron 2 µL de una solución fresca de H₂O₂ al 0,3% para iniciar la reacción de peroxidasa que se monitoreó 10-20 minutos seguido de enjuague y un paso de lavado de 2 veces durante 5 minutos con PBST. Finalmente, los embriones se transfirieron a 80% de glicerol / 20% de PBST y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta la obtención de imágenes. Las imágenes fueron adquiridas por ZEISS Apotome.2 y procesadas con el software ImageJ.

Ejemplo 1.6. Ensayo de cometa.

Los embriones de pez cebra a 48 hpf se anestesiaron en triclaína (200 µg / ml) disueltos en agua de huevos y se amputó el extremo del pliegue de la aleta con un bisturí. Los tejidos recogidos de alrededor de 60 embriones se agruparon, luego se centrifugaron y se re-suspendieron en 1 ml de PBS. Se añadió Liberase a 1: 65 / volumen de PBS (Roche, cat # 05401119001) y los tejidos se incubaron a 28 °C durante 35 minutos, pipeteando hacia arriba y hacia abajo cada 5 minutos. Para detener la reacción, se añadió FBS a una concentración final de 5% en PBS. A partir de ahora, las muestras se mantuvieron en hielo. Los pliegues de las aletas desagregados se filtraron a través de un filtro de 40 µM y se lavaron usando PBS + 5% de FBS. La suspensión celular se centrifugó a 650xg durante 5 minutos y se re-suspendió en 50 µl de PBS + 5% de FBS. Para determinar el número de células, se aplicó suspensión

celular tratada con azul de tripano a la cámara de Neubauer y se contaron las células en un microscopio invertido. Se emplearon alrededor de 15,000 células para realizar el ensayo de cometa alcalina de acuerdo con el protocolo del fabricante (Trevigen). Brevemente, se agregaron células en agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C en una proporción de 1:10 (v/v) y luego se colocaron en portaobjetos de microscopio. Después de la adhesión a 4 °C durante 30 minutos en oscuridad, los portaobjetos se sumergieron en tampón de lisis (preenfriado a 4 °C) durante la noche a 4 °C. A continuación, el ADN se desenrolló en una solución de electroforesis alcalina pH>13 (NaOH 200 mM, EDTA 1 mM) a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad, seguido de una electroforesis en el mismo tampón a 25 V (ajustando la corriente a 300 mA) para 30 minutos. Los portaobjetos se lavaron dos veces en agua destilada durante 5 minutos y en etanol al 70% durante 5 minutos, luego se secaron a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente, el ADN fue teñido con SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Invitrogen) y las imágenes fueron tomadas usando un microscopio Nikon Eclipse TS2 con lente objetivo 10x. El análisis cuantitativo del momento de la cola (producto de la longitud de la cola y el porcentaje de ADN de la cola) se obtuvo utilizando el software CASPLAB. Se cuantificaron más de 100 células seleccionadas al azar por muestra. Los valores se representaron como la mediana del momento de la cola de las células tratadas en relación con la mediana del momento de la cola de las células no tratadas.

Ejemplo 1.7. Western blot.

Los embriones de pez cebra a 72 hpf se anestesiaron en triclaína (200 µg / ml) disueltos en agua de huevo y el extremo del pliegue de la aleta se amputó con un bisturí. Los tejidos recogidos de alrededor de 120 embriones se agruparon, luego se centrifugaron y se volvieron a suspender en 80 µl de Tris 10 mM pH 7,4 + 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS). Luego, las muestras se incubaron a 95 oC durante 5 minutos con agitación de 1400 rpm, seguido de una centrifugación a velocidad máxima durante 5 minutos. Los sobrenadantes se congelaron a - 20 oC hasta proceder. Se usó el kit BCA para cuantificar la proteína usando BSA como estándar. Los lisados de aleta (10 µg) en tampón de muestra SDS se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron durante 1 h 30 min con TTBS que contenía leche desnatada en polvo desnatada al 5% (p / v) y se inmunoblotó en el mismo tampón 16 ha 4 oC con el anticuerpo monoclonal de ratón para poli (ADP-ribosa) humana (1 / 400, ALX-804-220, Enzo). Luego se lavó la transferencia con TTBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido 2500 veces en leche

desnatada al 5% (p / v) en TTBS. Después de repetidos lavados, la señal se detectó con el reactivo de quimioluminiscencia mejorado y ChemiDoc XRS Biorad.

Ejemplo 1.8. Determinación total de NAD⁺ y NADH.

Los embriones de pez cebra a 72 hpf se anestesiaron en triclaína (200 µg / ml) y las colas se amputaron en PBS frío al final con un bisturí. Los tejidos de alrededor de 120 embriones se agruparon y se recogieron en tampón de lisis proporcionado por el kit (Total NAD y NADH Assay Kit, ab186032) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Abcam). Los tejidos se homogeneizaron y se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a la velocidad máxima durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se emplearon para la cuantificación de proteínas con el kit BCA utilizando BSA como estándar. Para proceder con la determinación de NAD total y NADH, se emplearon 50 µg de proteína.

Ejemplo 1.9. Base de datos Ómnibus de expresión génica (GEO).

La psoriasis humana (número de acceso: GSD4602) y la dermatitis atópica (número de acceso: GSE57225) pueden utilizar datos transcriptómicos recopilados en la base de datos GEO para analizar la expresión diferencial de genes y el análisis de correlación.

Ejemplo 1.10. Inmunohistoquímica en muestras de piel humana.

Las biopsias de piel de donantes sanos (n = 5) y pacientes con psoriasis (n = 6) se fijaron en PFA al 4%, se incluyeron en Paraplast Plus y se seccionaron con un grosor de 5 µm. Después de ser desparafinados y rehidratados, las secciones se incubaron en tampón de citrato 10 mM (pH 6) a 95 °C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 20 minutos para exponer el antígeno. Posteriormente, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena y la unión no específica. Luego, las secciones se inmunotñieron con una dilución 1 1/100 de anticuerpos monoclonales de ratón contra NAMPT (sc-166946, Santa Cruz Biotechnology) o contra poli (ADP-ribosa) (ALX-804-220; Enzo Life Sciences) seguido de 1/100 dilución del anticuerpo secundario biotinilado seguido por el Sistema de tinción ABC de cabra ImmunoCruz® (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Finalmente, después de agregar la solución de tinción DAB, las secciones se deshidrataron y se montaron en Neo-Mount. No se observó tinción cuando se omitió el anticuerpo primario. Finalmente, las secciones se examinaron bajo un microscopio Leica

equipado con una cámara digital Leica DFC 280, y las fotografías se procesaron con el software Leica QWin Pro.

Ejemplo 1.11. HPLC-MS.

Las muestras de suero humano se filtraron con filtros AMICON™ ULTRA de 0,5 ml de corte de 3 KDa (UFC500396; EMD Millipore) y se suplementaron con N-acetil-glutamina a 1 mM como patrón interno. Las muestras fueron inyectadas en un sistema HPLC Agilent 1290 Infinity II equipado con especificación de masa híbrida Agilent Q-TOF 6550 con JetStream electrospray + i-Funnel. Los metabolitos se analizaron en polaridad positiva y negativa con una fragmentación de exploración de 150 V.

10 Ejemplo 1.12. Análisis estadístico.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos con distribución de datos gaussiana. Los datos no paramétricos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las diferencias entre dos muestras se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Los gráficos de contingencia se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado (y la exacta de Fisher) y los estudios de correlación con el coeficiente de correlación de Pearson.

Ejemplo 2. Resultados.

Ejemplo 2.1. NAD⁺ y sus precursores contribuyen a la inflamación de la piel.

20 En ausencia de estímulos de reclutamiento, la mayoría de los neutrófilos de 72 hpf de embriones de pez cebra se ubicaron entre la aorta dorsal y la vena axial, una región denominada tejido hematopoyético caudal (THC) (Figura 1A).

Para determinar si el metabolismo de NAD⁺ tiene un papel en la regulación de la inflamación de la piel, decidimos realizar experimentos funcionales en la línea transgénica de pez cebra lyz:dsRED. Las larvas de lyz:dsRED descorionadas manualmente se trataron por inmersión en baño con diferentes concentraciones de NAD⁺ de 24 hpf a 72 hpf. La incubación dio como resultado una dispersión de neutrófilos aumentada estadísticamente significativa en comparación con el control (Figura 1B). A pesar del patrón alterado de distribución de neutrófilos, algunos de los cuales estaban presentes en la piel, tanto la integridad de la piel como su morfología no se vieron afectadas (Figura 1B').

Dado el papel del H_2O_2 en impulsar la movilización de neutrófilos hacia lesiones agudas y crónicas, utilizamos una sonda fluorescente específica de H_2O_2 para saber si esta molécula estaba implicada en el fenotipo observado. La sonda fluorescente indicó que el tratamiento con NAD^+ fue capaz de mejorar la producción de H_2O_2 por los queratinocitos de la piel de una manera dependiente de la dosis, en comparación con el grupo control. Se obtuvieron resultados similares con NAM, un precursor de NAD^+ . Sin embargo, mientras que el precursor NMN no pudo aumentar el estrés oxidativo de la piel por sí solo, la combinación de NAM y NMN induce sinérgicamente el mismo efecto que NAM solo (Figura 2B). Sin embargo, no se observaron diferencias en la redistribución de neutrófilos (Figura 2A' y B'). Estos resultados pueden sugerir que los niveles de NAD^+ podrían regular el estrés oxidativo en la piel.

Ejemplo 2.2. La inhibición farmacológica de Nampt induce inflamación muscular.

Una vez que se demostró la influencia de NAD^+ en la regulación del estrés oxidativo de la piel y la dispersión de neutrófilos, nos preguntamos si el agotamiento de NAD^+ celular mediado por el bien caracterizado inhibidor de NAMPT FK-866 también podría tener un impacto en estos parámetros. Para estudiar la inflamación en las larvas de pez cebra, utilizamos la línea transgénica NF- κ B:eGFP, que informa con precisión la actividad transcripcional de NF κ B mediante la expresión de GFP (Figura 3A'). Sorprendentemente, el tratamiento con FK-866 a 100 μ M durante 48 horas promovió una inflamación muscular considerable en comparación con el grupo control, probablemente causada por la interrupción de la bioenergética celular (Figura 3A y A').

A pesar de la inducción de NAD^+ del estrés oxidativo de la piel, no se observaron diferencias con respecto a la actividad transcripcional de NF κ B en ningún tejido. Como se esperaba, NAD^+ restauró efectivamente la homeostasis muscular cuando los embriones se incubaron conjuntamente con FK-866 (Figura 4A y A'). Este resultado demuestra claramente el efecto específico del inhibidor.

Teniendo en cuenta la actividad transcripcional de NF κ B aumentada en el músculo y su papel que impulsa la respuesta inflamatoria, quisimos determinar si la distribución de neutrófilos se vio afectada en esa condición. Los experimentos en la línea de pez cebra lyz:dsRED con inhibidor FK-866 revelaron una infiltración robusta de neutrófilos en el tejido inflamado tratado con 100 μ M, en comparación con embriones no tratados o expuestos a concentraciones más bajas (Figura 5A). A la concentración de inhibidor más alta probada, los

neutrófilos se distribuyeron regularmente en el músculo (Figura 5C). La producción de H₂O₂ por los queratinocitos de la piel cambió drásticamente con el tratamiento con inhibidores (Figura 5B). Es de destacar que la concentración más baja de FK-866 fue capaz de provocar una abolición casi completa de la liberación de H₂O₂.

- 5 En conjunto, estos resultados sugieren que no solo los niveles de NAD⁺ regulan in vivo el estrés oxidativo en la piel y la distribución del patrón de neutrófilos, sino que también niveles críticamente bajos de NAD⁺ desencadenan la inflamación muscular.

Ejemplo 2.3. La inhibición farmacológica de Nampt disminuye el estrés oxidativo y la inflamación de la piel y restaura la integridad epitelial en un modelo de psoriasis de pez cebra.

10

Recientemente, se han descrito varios mutantes de pez cebra en genes clave que codifican o regulan estructuras de anclaje interconectadas que median una asociación estable de dermis y epidermis. Estos mutantes con integridad epitelial cutánea defectuosa muestran infiltración persistente de leucocitos en la piel, un sello distintivo de la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias de la piel.

15

La influencia del metabolismo NAD⁺ sobre el estrés oxidativo y la inflamación en el pez cebra silvestre, nos animó a estudiar su efecto sobre el modelo de psoriasis del pez cebra con una mutación hipomórfica de *spint1a* (alelo *hi2217*), que codifica el inhibidor de la serina proteasa, tipo kunitz, 1a. Para estudiar la distribución de neutrófilos en este mutante, utilizamos la línea transgénica *lyz:dsRED*.

20

Los estudios en *spint1a* mutante demostraron una mayor liberación de H₂O₂ en la piel en comparación con los animales control (Figura 6A), lo que sugiere una supuesta contribución del estrés oxidativo al fenotipo mutante. Como se describió anteriormente para los embriones silvestres, la inhibición farmacológica de Nampt disminuyó notablemente la producción de H₂O₂ de una manera dependiente de la dosis (Figura 6A). Sorprendentemente, los niveles de H₂O₂ en las larvas tratadas fueron mucho más bajos que en los animales no tratados, lo que demuestra la importancia del metabolismo de NAD⁺ en la producción de H₂O₂ y un probable papel fisiológico para el H₂O₂ en la piel en condiciones de estado estacionario.

25

Las larvas deficientes en *Spint1a* muestran infiltración de neutrófilos en la piel. Observamos que el 40% de los neutrófilos estaban fuera del THC en los mutantes en comparación con el 10% en los embriones silvestres (Figura 6B). Los embriones mutantes tratados con el

30

inhibidor FK-866 a 10 y 50 μM mostraron una fuerte reducción de la dispersión de neutrófilos (Figura 6B y C). Sin embargo, a 100 μM de FK-866 resultó en la infiltración de neutrófilos en el músculo, como se observó en animales silvestres (Figura 6B y C). Más importante aún, la integridad epitelial se restauró casi por completo en las larvas mutantes tratadas con 10 μM de FK-866 (Figura 6C).

Experimentos adicionales en las larvas *spint1a* mutantes *lyz: dsRED* confirmaron que la suplementación con NAD^+ ejerció un efecto negativo. Por un lado, NAD^+ agrava el fenotipo mutante, causando más alteraciones de la morfología de la piel y el patrón de dispersión de neutrófilos en comparación con el control (Figuras 7A y 7A'). Vale la pena mencionar que el mutante *spint1a* era más susceptible a NAD^+ que los embriones silvestres (Figura 7A). Además, el tratamiento con NAD^+ neutralizó los efectos beneficiosos de FK-866 sobre el mutante *spint1a*, empeorando el fenotipo (Figura 7A y A'). Por lo tanto, este resultado respalda que los efectos beneficiosos de FK-866 en la piel fueron mediados por la reducción de la disponibilidad de NAD^+ en la piel.

En este punto, nos preguntamos si estábamos manipulando los niveles de NAD^+ en las larvas como se esperaba por los tratamientos aplicados a los embriones de pez cebra. Para ese fin, cuantificamos por ELISA los niveles totales de NAD^+ y NADH . Los resultados indicaron que la suplementación con FK-866 y NAD^+ disminuyó y aumentó los niveles de NAD^+ y NADH , respectivamente, como se esperaba. Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los embriones silvestres y mutantes *spint1a* (Figura 8).

Para estudiar la actividad transcripcional de NF κ B en el mutante *spint1a*, utilizamos la línea chivata NF- κ B:eGFP. De acuerdo con estudios previos en los que se encontró un aumento de la actividad transcripcional de NF κ B (regulación positiva de *il1b* y *mmp9*, entre otros genes diana de NF κ B) en larvas mutantes de *spint1a*, demostramos que esta vía fue inducida en la piel de mutantes en comparación con los silvestres (Figura 9A y A'). Es importante destacar que los embriones mutantes tratados con el inhibidor de FK-866 a 10 μM mostraron una reducción estadísticamente significativa en la activación de esta vía de señalización (Figura 9A y A').

En conclusión, se ha demostrado que el metabolismo de NAD^+ influye notablemente en el fenotipo mutante *spint1a*. Mientras que la suplementación con NAD^+ exacerbó el fenotipo mutante, el agotamiento de NAD^+ mediado por FK-866 contrarresta el aumento del estrés

oxidativo y la actividad transcripcional de NFkB en la piel y la infiltración de neutrófilos, característica del mutante *spint1a*. Más importante aún, el tratamiento con FK-866 mejora dramáticamente la integridad epitelial de la piel.

5 **Ejemplo 2.4. La inhibición de la actividad de Parp1 rescata la inflamación de la piel de las larvas mutantes de *spint1a*.**

Debido a las funciones pleiotrópicas de la molécula de NAD⁺ que participa en más de 500 reacciones enzimáticas y regula varios procesos celulares, analizamos las principales enzimas cuya actividad podría verse afectada por el agotamiento de NAD⁺. Dado que CD38 realiza
10 una influencia importante en los niveles de NAD⁺ en el organismo, decidimos inhibir su actividad enzimática mediante un inhibidor específico llamado 78c. Del mismo modo, estábamos interesados en la inhibición de la actividad de sirtuinas, ya que las sirtuinas son enzimas que consumen NAD⁺. Para ese propósito, empleamos un inhibidor selectivo de SIRT1 sobre SIRT2 y SIRT3, llamado EX 527. Sin embargo, con diferentes concentraciones
15 y condiciones experimentales probados, encontramos que ni la inhibición de la actividad enzimática *cd38* ni la sirtuina pudieron rescatar la inflamación de la piel del mutante *spint1a*.

A continuación, estudiamos otra familia de proteínas que consumen NAD⁺, las polimerasas de poli (ADP-ribosa) (PARP). Sorprendentemente, la inhibición de Parp1 mediada por
20 *olaparib* bloqueó eficientemente el fenotipo mutante *spint1a* (Figura 10). El tratamiento con *Olaparib* a 100 μM durante 48 horas disminuyó la dispersión de neutrófilos (Figura 10A y 10A'), inflamación de la piel (Figura 10B y B') y restableció la integridad epitelial en comparación con los animales de control (Figura 10A'). Consistentemente, experimentos adicionales usando los inhibidores de Parp1 *veliparib* y *talazoparib* mostraron resultados
25 similares (Figura 10C y 10C'). Los inhibidores de Parp1 muestran diferentes inhibiciones catalíticas y eficiencia de atrapamiento de PARP. Aunque el *talazoparib* y el *olaparib* muestran una potencia de inhibición de la actividad enzimática similar, el *talazoparib* es casi 100 veces más efectivo para atrapar PARP1 con ADN. En el caso de *veliparib*, este inhibidor es el menos potente en ambas actividades. Esta observación podría ser racional para las
30 diferentes concentraciones capaces de rescatar la inflamación de la piel en larvas mutantes de *spint1a*: *veliparib* 500 μM > *olaparib* 100 μM > *talazoparib* 1 μM.

Para determinar la actividad de Parp en la piel y el efecto de los inhibidores, los niveles de PAR se determinaron mediante Western blot en el extremo del pliegue de la aleta (muestra

enriquecida en piel). Los resultados indicaron que el mutante *spint1a* mostró niveles incrementados de PAR en comparación con los animales tratados con control o con inhibidores. Tanto FK-866 como olaparib pudieron reducir los niveles de PAR en la piel de los mutantes de *spint1a* (Figura 11).

5

Ejemplo 2.5. FK-866 y olaparib bloquean la hiperproliferación de queratinocitos en larvas mutantes de *spint1a*.

El fenotipo mutante *Spint1a* comienza con la agregación de queratinocitos basales, la adquisición de propiedades de tipo mesenquimatoso y la muerte celular, lo que finalmente conduce a una proliferación incontrolada. Todos juntos conducen a la interrupción de la integridad de los epitelios de la piel. Dado que la inhibición de Nampt o Parp1 en los embriones mutantes de *spint1a* alivió el fenotipo, es tentador especular que interfieren con estas alteraciones.

15 Dado que la proliferación en el mutante *spint1a* ocurre a las 48 hpf, decidimos llevar a cabo un ensayo de incorporación de BrdU a esa edad. Como se ha descrito en la caracterización del mutante, el mutante *spint1a* mostró una mayor proliferación de queratinocitos en comparación con los silvestres (Figura 12A y A'). Sorprendentemente, ya a las 24 horas de tratamiento, la inhibición farmacológica de Nampt o Parp1 redujo significativamente la proliferación de queratinocitos (Figura 12A y A').

20

Ejemplo 2.6. Los mutantes de *Spint1a* muestran un daño mayor en el ADN, que es inducido por la inhibición de Parp1 mientras que se reduce por la inhibición de Nampt.

La función biológica principal de PARP1 es orquestrar la reparación espacio-temporal del daño en el ADN, siendo indispensable para SSBR y participando en recombinación homóloga (HR). Los inhibidores de PARP que atrapan y acumulan PARP1 inactivo en el ADN desencadenan la formación de dsBs durante la replicación.

25

Para estudiar el daño del ADN, tomamos dos enfoques diferentes. Un enfoque consiste en analizar la presencia de la histona fosforilada variante H2AX (γ H2Ax), que etiqueta dsBs. Esta marca epigenética está mediada por la activación de proteínas relacionadas con la HR, independientemente de PARP1. El otro enfoque fue el ensayo del cometa, que en condiciones alcalinas puede detectar tanto ssBs como dsBs, lo que permite un análisis más profundo.

30

Sorprendentemente, los resultados indicaron que los mutantes de *spint1a* exhibieron un daño mayor en el ADN, analizado por tinción con γ H2Ax (Figura 13A y A') o por ensayo de cometa (Figura 13B). En línea con estudios previos, el inhibidor de Parp1 olaparib indujo
 5 daño en el ADN en mutantes de *spint1a* y en silvestres (Figura 13). Sorprendentemente, las lesiones de ADN inducidas por olaparib fueron mayores en el mutante *spint1a*, lo que sugiere una mayor susceptibilidad a este compuesto (Figura 13A). Otro resultado interesante fue la tinción reducida de γ H2Ax mediada por el tratamiento con FK-866 (Figura 13A). En conjunto, los resultados del análisis de daños en el ADN sugieren que los mutantes de *spint1a*
 10 acumulan rupturas de ADN, lo que probablemente aumenta su susceptibilidad a los factores estresantes del ADN. La reducción en el daño del ADN mediado por el tratamiento con FK-866 podría explicarse por la inhibición indirecta de la actividad de Parp y el posterior rescate del fenotipo mutante *spint1a*.

15 **Ejemplo 2.7. Los tratamientos con FK-866 y olaparib no desencadenan la apoptosis en la piel de los mutantes de *spint1a***

Independientemente de los fenómenos de letalidad sintética causados por los inhibidores de PARP cuando se obstaculiza la vía de la RH, también se ha descrito que los inhibidores de PARP inducen la apoptosis en las células en proliferación. Los factores apoptóticos regulados
 20 por p53 desencadenan la liberación de citocromo c de las mitocondrias y la posterior activación de la cascada de caspasas, que finalmente activa la caspasa 3, entre otras dianas.

Los estudios iniciales de mutantes de *spint1a*, aunque encontraron la muerte celular de los queratinocitos, no fueron capaces de bloquearla dirigiéndose a caspasas o factores
 25 proapoptóticos, lo que sugiere una muerte celular programada no identificada. De manera similar, la tinción de caspasa 3 activa en embriones mutantes *spint1a* de 2 dpf o larvas silvestres fue negativa (Figura 14A y A'). Además, los mutantes de *spint1a* tratados con FK-866 o olaparib no mostraron apoptosis de queratinocitos (Figura 14A y A'), incluso a 3 dpf tras 48 horas de tratamiento (datos no mostrados).

30

Ejemplo 2.8. La inhibición farmacológica de Parp1 reduce la muerte celular en la piel de las larvas mutantes en *spint1a*.

Dado que la inhibición de Parp1 conduce a la acumulación de lesiones de ADN, eventualmente se espera que induzca la muerte celular. La técnica del TUNEL fue un segundo enfoque para estudiar la muerte celular; Esta técnica consiste en el etiquetado de los extremos 3'OH expuestos de fragmentos de ADN. Por lo tanto, TUNEL etiqueta ssBs y dsBs.

5 Aunque no se detectó apoptosis, incluso en los agregados celulares, el mismo escenario experimental para la tinción de TUNEL indicó que la muerte celular se produjo en el borde de la aleta caudal de los embriones silvestres y mutantes durante esta fase de desarrollo (Figura 15A'). Sin embargo, las larvas mutantes en *spint1a* mostraron un mayor número de células TUNEL+, mientras que el tratamiento con olaparib disminuyó significativamente la
 10 muerte celular (Figura 15A). De alguna manera, este resultado inesperado podría señalar a Parp1 como responsable de la muerte celular en el mutante *spint1a*.

Ejemplo 2.9. Las moléculas que eliminan ROS rescatan la inflamación de la piel de las larvas mutantes en *spint1a*.

15 Los resultados mencionados anteriormente mostraron niveles más altos de ROS en la piel de los mutantes *spint1a*, lo que, junto con la acumulación de lesiones de ADN, sugiere que el estrés oxidativo podría estar jugando un papel importante en el desarrollo del fenotipo. Es importante destacar que se ha planteado la hipótesis de que la muerte celular podría ser responsable del reclutamiento de células inmunes en mutantes *spint1a*.

20

En primer lugar, decidimos inhibir el H₂O₂ derivado de Duox1. La inhibición de esta enzima por el inhibidor de la NADPH oxidasa cloruro de dibenziodolium (DPI) disminuye con éxito el estrés oxidativo de la piel y rescata un modelo inflamatorio crónico de piel de pez cebra. Sin embargo, con diferentes concentraciones y ajustes experimentales probados para este
 25 inhibidor, concluimos que Duox1 no contribuye al fenotipo de piel mutante *spint1a*. De manera similar, la inactivación genética de Duox1 en los queratinocitos de la piel al sobreexpresar una forma negativa dominante de Duox1, tampoco logró rescatar la inflamación de la piel en mutantes de *spint1a* (datos no mostrados).

30 Luego, probamos el efecto de moléculas secuestradoras de ROS. En primer lugar, empleamos N-acetilcisteína (NAC), un precursor de glutatión reducido (GSH), la principal molécula antioxidante celular. Los embriones mutantes tratados de 1 dpf a 3 dpf con NAC 100 μM mostraron una reducción estadísticamente significativa en la dispersión de neutrófilos de las larvas mutantes *spint1a* (Figura 16A), junto con una mejora en la morfología de la piel en

comparación con los embriones mutantes no tratados (Figura 16A'). Los efectos beneficiosos del NAC nos estimularon a analizar la efectividad de otros antioxidantes. Luego probamos mito-TEMPO, que es un antioxidante que se acumula específicamente en las mitocondrias imitando la actividad superóxido dismutasa contra el superóxido y el radical alquilo. El mito-TEMPO 100 μ M aplicado durante 48 horas a los embriones mutantes de Spint1a disminuyó la dispersión de neutrófilos (Figura 16B) y restableció la integridad epitelial (Figura 16B'). Finalmente, analizamos un último eliminador de ROS llamado tempol, un antioxidante nítrido que actúa contra los compuestos de descomposición de peroxinitrito, dióxido de nitrógeno y anión radical superóxido. De forma similar, para NAC y mito-TEMPO, concentraciones tan bajas como 100 nM de tempol redujeron la infiltración de neutrófilos en la piel (Figura 16B) y restauraron la integridad de la piel (Figura 16B'). La actividad transcripcional de NF κ B del mutante spint1a tratado con mito-TEMPO y tempol mostró que aunque el tempol mostró una reducción estadísticamente significativa en la activación de la vía, sorprendentemente, mito-TEMPO no rescató esta característica del fenotipo mutante spint1a (Figura 16C y C'). Colectivamente, estos resultados sugieren fuertemente que Duox1 u otras NADPH-oxidasas susceptibles de ser inhibidas por DPI no contribuyen al fenotipo mutante spint1a. Sin embargo, el eliminador general de ROS NAC y mito-TEMPO y tempol que se dirigen al anión superóxido, entre otros ROS, demostraron la influencia del estrés oxidativo en el fenotipo mutante spint1a.

20

Ejemplo 2.10. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico no afecta la inflamación de la piel de las larvas mutantes en spint1a.

Estimulados por los excelentes resultados con respecto a los eliminadores de ROS, queríamos investigar si la especie de nitrógeno reactivo, el óxido nítrico (NO), también puede contribuir a la patología mutante. NO se sintetiza a partir de L-arginina y NADPH por óxido nítrico sintetasa (NOS endotelial, neuronal o inducible / inflamatorio) y, si está presente, reacciona rápidamente con anión superóxido a peroxinitrito. NG-monometil-L-arginina (NMMA) es un inhibidor de las 3 isoformas de NOS. Inesperadamente, el tratamiento con NMMA a 1 mM durante 48 horas no logró disminuir la infiltración de neutrófilos en la piel o la integridad epitelial en comparación con los animales control (Figuras 17A y 17A').

30

Ejemplo 2.11. La inhibición de la muerte celular Parthanatos rescata la inflamación de la piel de las larvas mutantes de spint1a

Según este trabajo y los datos publicados, el fenotipo mutante de pez cebra *spint1a* se caracteriza por el estrés oxidativo de la piel (que implica H_2O_2), inflamación de la piel, agregación de queratinocitos, hiperproliferación y posterior muerte celular (no identificada) y daño en el ADN.

5

Por un lado, con respecto al estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con metales produciendo radicales hidroxilo ($\bullet OH$). El peroxinitrito y el radical hidroxilo se reconocen como inductores del daño del ADN, provocando sSB. Los eliminadores de ROS analizados pudieron rescatar la inflamación de la piel de los mutantes. Del mismo modo, FK-
10 866 disminuyó fuertemente la producción de H_2O_2 en la piel. Estos resultados, por lo tanto, indican un papel crucial para ROS en el desarrollo del fenotipo.

Por otro lado, la inhibición de *Parp1* también mejoró el fenotipo mutante en relación con la integridad epitelial, la actividad transcripcional de NF κ B de la piel, la infiltración de
15 neutrófilos, la proliferación de queratinocitos y, lo que es más importante, redujo la actividad de PAR y la muerte celular. Estos últimos resultados, junto con la muerte celular de queratinocitos no caracterizada, nos llevaron a plantear la hipótesis de que los parthanatos serían responsables de la muerte celular de queratinocitos en mutantes *spint1a*. Parthanatos es una muerte celular dependiente de PARP1 en la cual un daño extenso en el ADN induce una
20 sobreactivación de PARP1. La acumulación de polímeros PAR y proteínas PARiladas alcanzan las mitocondrias causando la despolarización del potencial de membrana y la liberación del factor inductor de apoptosis (AIFM1). AIFM1 se libera en el citosol, donde recluta el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) al núcleo. En el núcleo, la actividad de nucleasa AIFM1-MIF ejecuta una fragmentación de ADN a gran escala que
25 produce la muerte celular.

Para probar esta hipótesis, empleamos un inhibidor químico de la translocación AIFM1, llamado N-fenilmaleimida (NP). Los embriones mutantes tratados de 1 dpf a 3 dpf con 10 nM NP mostraron una reducción estadísticamente significativa en la dispersión de neutrófilos
30 (Figura 18A), además de una restauración de la integridad de la piel en comparación con los embriones mutantes no tratados (Figura 18A').

Ejemplo 2.12. La inhibición farmacológica de *Parp1* o *Nampt* rescata l inflamción en piel del mutante *psoriasis* de pez cebra.

Una vez demostrada la efectividad de FK-866 y olaparib en el mutante *spint1a*, decidimos usar otro mutante que presentara un fenotipo inflamatorio similar en la piel. Nuestra primera elección fue *clint1a* mutante. De manera similar al mutante *spint1a*, a 48 hpf los mutantes *clint1a* mostraron hiperproliferación y agregados de queratinocitos, muerte celular y reclutamiento de leucocitos en la piel. Sin embargo, en varios intentos, encontramos que FK-866 y olaparib no pudieron restaurar la homeostasis de la piel en las larvas mutantes *clint1a*.

A continuación, utilizamos el mutante de psoriasis de pez cebra, cuyas características de fenotipo se comparten con los mutantes *spint1a* y *clint1a*; es decir, agregación de queratinocitos e hiperproliferación a partir de 2.5 dpf, muerte celular dentro o cerca de agregados epidérmicos, e infiltración de células inmunes al epitelio cutáneo alterado. Desafortunadamente, no teníamos psoriasis mutante en el fondo *lyz:dsRED*. Por lo tanto, aplicamos un método de evaluación de fenotipos para determinar diferentes resultados para el tratamiento con inhibidores. Consistentemente con resultados mutantes de *spint1a*, FK-866 50 μ M y olaparib 100 μ M aplicados durante 1.5 días a los embriones de pez cebra mejoraron significativamente la integridad epitelial de la piel (Figura 19A y 19A'). Este resultado podría sugerir que, aunque el fenotipo mutante *spint1a* y la psoriasis es causado por mutaciones que afectan a diferentes genes, aparentemente con una función biológica muy diferente, desarrollan un fenotipo similar que comparte vías metabólicas alteradas similares.

Ejemplo 2.13. Perfil de expresión alterado de genes que codifican enzimas metabólicas clave NAD⁺ en dermatitis atópica y psoriasis.

La psoriasis y la dermatitis atópica, o eccema, son dos enfermedades inflamatorias crónicas cutáneas no contagiosas. Aunque los factores ambientales actúan como desencadenantes de las patologías, la psoriasis y la dermatitis atópica tienen un fuerte componente genético que afecta la susceptibilidad individual. Para estudiar si el metabolismo de NAD⁺ se ve afectado en la psoriasis y la dermatitis atópica, probablemente desempeñando un papel en las patologías, analizamos los datos transcriptómicos de las enzimas implicadas en el metabolismo de NAD⁺.

Principalmente, estudiamos la vía de recuperación de NAD⁺ (realizada por NAMPT y NMNAT1-3), generalmente utilizada para mantener los niveles intracelulares de NAD⁺ en una gran variedad de tejidos. Esta ruta está impulsada por la vía Preiss-Handler (NAPRT y NADSYN participantes), la vía de novo (mediada por IDO1, TDO2 y QPRT, entre otros) y la

conversión de ribosido de nicotinamida (NR) (catalizada por PNP y NRK1 / 2). Además, estábamos interesados en CD38, debido a su actividad de NADasa que influye en los niveles de NAD⁺ en el organismo y la enzima nicotinamida-N-metiltransferasa (NNMT) que consume NAM, que cataliza la reacción entre NAM y S-adenosilmetionina (SAM) para producir N -metilnicotinamida (1-MNA) y S-adenosilhomocisteína (SAH).

En este trabajo, empleamos datos transcriptómicos disponibles de psoriasis humana en los que se comparó la piel de sujetos sanos y pacientes con psoriasis (piel no lesionada y lesionada) (Figura 20A). El análisis reveló un importante perfil de expresión diferencial de genes que codifican enzimas metabólicas NAD⁺. En general, en las lesiones psoriásicas, los niveles de transcripción se incrementaron en comparación con la piel psoriásica sin lesión y las muestras sanas. Es importante destacar que los niveles de ARNm del gen que codifica NAMPT, la enzima limitante de la velocidad en la ruta de salvamento de NAD⁺, aumentaron, en contraste con la reducción en los niveles de NMNAT3. Curiosamente, los niveles de transcripción NRK2 también aumentaron en la piel lesionada, al mismo nivel que la piel no lesionada, en comparación con el grupo control. La vía Preiss-Handler parecía mostrar una actividad intensificada, debido a la regulación al alza de los niveles de ARNm de los genes que codifican sus componentes NAPRT y NADSYN en la piel lesionada por psoriasis en comparación con el epitelio sano. Finalmente, los genes que codifican las enzimas biosintéticas de NAD⁺ involucradas en la vía *de novo* también se alteraron: mientras que IDO1 y TDO2 fueron fuertemente inducidos, QPRT disminuyó ligeramente en comparación con la piel sana (Figura 22A).

También analizamos datos transcriptómicos de un estudio de dermatitis atópica. Este estudio comparó la piel de donantes sanos con biopsias por punción en la piel de lesiones de pacientes que padecen dermatitis atópica. El tejido de dermatitis atópica reveló niveles inducidos de ARNm de NAMPT y niveles reducidos de NMNAT3 en comparación con una piel sana, lo que probablemente indica una variación en la vía de recuperación de NAD⁺. Sin embargo, los genes relacionados con la vía Preiss-Handler no mostraron un perfil de expresión distintivo al grupo control. Finalmente, IDO1 y TDO2, involucrados en la biosíntesis de NAD⁺ *de novo*, exhibieron mayores niveles de transcripción en comparación con una piel sana (Figura 22B).

En conjunto, los datos de la expresión del gen de la psoriasis y la dermatitis atópica podrían indicar una mayor actividad de la vía de recuperación de NAD⁺ con una reducción común de la expresión de NMNAT3, que se encarga de controlar los niveles de NAD⁺ en las mitocondrias. Además, la biosíntesis *de novo* de NAD⁺ también podría mejorarse en ambas enfermedades, en aquellos tejidos en los que está activo. Curiosamente, la vía Preiss-Handler solo se altera en la psoriasis, mientras que no se encontraron diferencias en el análisis de dermatitis atópica. Por el contrario, el perfil de expresión de NNMT mostró una inducción específicamente en dermatitis atópica y ambos compartieron altos niveles de transcripción de CD38 (Figura 22C).

10

Ejemplo 2.14. El perfil de expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo del NAD⁺ se correlaciona con marcadores genéticos inflamatorios.

Una vez que se demostró que en los genes de dermatitis atópica y psoriasis que codifican algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de NAD⁺, especialmente aquellos involucrados en la vía de rescate NAD⁺ y la biosíntesis de NAD⁺ *de novo*, se desregularon, nos preguntamos si su expresión podría correlacionarse con marcadores genéticos inflamatorios. Se emplearon marcadores genéticos inflamatorios específicos de cada enfermedad para llevar a cabo el análisis de correlación. Para la psoriasis, nos centramos en la respuesta inmune TH17, que sintetiza IL17A e IL23A. Además, incluimos TNFA e IL1B. En el caso de la dermatitis atópica, utilizamos citocinas relacionadas con las respuestas inmunes TH2 (IL4, IL10 e IL13) y TH12 (IL22), además de IL6 y TNFA.

15
20

En relación con la psoriasis, NAMPT y PNP correlacionaron sólidamente su expresión con IL1B e IL17A, de manera similar a la expresión de IDO1 y TDO2, pero con menor nivel de significancia (Figura 21A). Además, la expresión de NRK1 se correlacionó ligeramente con IL23A y, lo que es más importante, NAPRT mostró una correlación inversa con la expresión de esta citocina (Figura 21A). En dermatitis atópica, NAMPT se correlacionó con IL4 e IL6; IDO1 y TDO2 también se vincularon con los niveles de transcripción de IL6 y otras citocinas (Figura 21B). Sorprendentemente, los niveles de ARNm de NNMT y CD38 mostraron una asociación muy importante con los de los genes que codifican varias citocinas, lo que podría significar una correlación relevante con la gravedad de la enfermedad. Por el contrario, los niveles de transcripción de NMNAT3 mostraron una correlación inversa con numerosos genes que codifican las citocinas inflamatorias, probablemente señalando la expresión de NMNAT3 como un factor protector (Figura 21B).

25
30

Ejemplo 2.15. Perfil de expresión alterado de genes que codifican enzimas relacionadas con parthanatos en dermatitis atópica y psoriasis.

En este trabajo se demostró que la inhibición de Parp rescata la inflamación de la piel en las larvas mutantes *spint1a* y *psoriasis*, reduciendo la actividad de PAR y la muerte celular. Además, la inhibición química de la translocación de *Aifm1* proporcionó una mejora en el fenotipo mutante *spint1a*. Todos estos resultados juntos respaldan la idea de que la muerte celular de los queratinocitos que tiene lugar en estos modelos animales y en los trastornos inflamatorios crónicos de la piel humana está mediada por la sobreactivación de PARP. Con el fin de determinar si los componentes de parthanatos y otras proteínas relacionadas están alteradas en las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, empleamos experimentos de datos transcriptómicos mencionados anteriormente.

Nos centramos principalmente en PARP1, AIFM1 y MIF, tres componentes indispensables de parthanatos. Además, analizamos la expresión de genes que codifican diferentes hidrolasas PAR que regulan la PARilación de proteínas y, en consecuencia, controlan los niveles de PAR y PAR libres unidos a proteínas, mediadores clave de la despolarización del potencial de membrana de las mitocondrias y la posterior liberación de AIFM1.

Los datos transcriptómicos de la psoriasis revelaron un fuerte aumento de los niveles de ARNm de PARP1, AIFM1 y MIF en el tejido lesional en comparación con la piel sana y la piel psoriásica no lesionada (Figura 22A). Además, se observó una leve disminución y aumento de los niveles de AIFM1 y MIF, respectivamente, en la piel no lesionada de pacientes con psoriasis (Figura 22A).

En el caso de muestras de dermatitis atópica, los niveles de transcripción de PARP1 y AIFM1 aumentaron levemente en comparación con el grupo control (Figura 22B). Sin embargo, no se encontraron niveles de transcripción MIF diferenciales (Figura 22B).

Aunque no se encontró ninguna alteración en el perfil de expresión del gen que codifica PARG en la psoriasis o la dermatitis atópica, ambos trastornos exhibieron una disminución en los niveles de ARNm de MACROD1, MACROD2 y TARG1 (Figura 22C). Estos genes codifican proteínas que se encargan de escindir el enlace proteína-ADP-ribosa, liberando cadenas PAR. Además, en la piel con lesión psoriásica, los niveles de ARH3 (actividad

enzimática de exoglucosilasa) aumentaron, mientras que los de NUDT16 y ENPP1 disminuyeron (Figura 22C). Estos dos genes codifican dos proteínas que escinden la cadena PAR de las proteínas diana, dejándolas monoPARiladas. Además, ambas enfermedades compartieron niveles incrementados de transcripción de ARH1, cuyo producto escinde el enlace terminal pero solo para los objetivos PARILADOS en la arginina (Figura 22C).

En conclusión, los resultados indican que ambas enfermedades, más pronunciadas en la psoriasis, muestran una capacidad reducida para eliminar la PARilación de las proteínas, debido a la baja expresión de las hidrolasas de PAR, lo que en ciertas condiciones podría facilitar parthanatos.

Ejemplo 2.16. La expresión de genes que codifican componentes clave involucrados en el metabolismo de parthanatos y PAR se correlaciona con marcadores genéticos inflamatorios de psoriasis y dermatitis atópica.

Después de confirmar que los genes que codifican los componentes de parthanatos y otros factores implicados en el metabolismo de PAR están desregulados en la dermatitis atópica y la psoriasis, quisimos determinar si su expresión podría correlacionarse con genes marcadores inflamatorios. En la misma línea que el metabolismo de NAD⁺ analizado previamente, tomamos los mismos genes marcadores de genes inflamatorios específicos para llevar a cabo el análisis de correlación.

El análisis de correlación con datos transcriptómicos de psoriasis indicó una fuerte correlación entre los niveles de ARNm de AIFM1 y los de los genes inflamatorios IL1B e IL17A (Figura 23A). Además, la expresión de ARH1 se correlacionó ligeramente con IL1B, IL17A y TNFA (Figura 23A). En contraste, MACROD1 y MACROD2 se correlacionaron inversamente con IL1B e IL17A e IL1B e IL23A, respectivamente (Figura 23A). En la dermatitis atópica, PARP1 y AIFM1 correlacionaron positivamente su expresión con IL13. De manera similar, MIF y ARH3 se correlacionaron con IL6 y TNFA (Figura 23B). Sorprendentemente, los niveles de transcripción MACROD1 mostraron una asociación inversa robusta con los de varios genes de citocinas (Figura 23B). Por lo tanto, en ambas enfermedades, los componentes de parthanatos y otros genes relacionados con el metabolismo de PAR mostraron una expresión asociada con los genes que codifican las citocinas específicas de cada enfermedad. Por el contrario, MACROD1 y MACROD2

mostraron una correlación inversa con los genes marcadores inflamatorios, lo que probablemente podría indicar un papel protector contra las patologías.

Ejemplo 2.17. Los niveles séricos humanos de NAD⁺ y SAM están alterados en pacientes con psoriasis

5

Hemos demostrado que el metabolismo de NAD⁺ juega un papel fundamental en la regulación del estrés oxidativo y la inflamación de la piel en un modelo preclínico de pez cebra de psoriasis. Además, los datos transcriptómicos mostraron un perfil de expresión alterado de genes que codifican enzimas metabólicas clave NAD⁺ en dermatitis atópica y psoriasis. Por lo tanto, nos propusimos investigar si los niveles séricos de metabolitos en relación con el metabolismo de NAD⁺ podrían alterarse en pacientes con psoriasis. Para este propósito, analizamos mediante muestras de suero de cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas (HPLC-MS) de pacientes con psoriasis antes y después de ser tratados con fototerapia. El tratamiento de fototerapia consiste en medicamentos con psoraleno combinados con exposición a la luz UVA (PUVA).

15

La determinación de metabolitos por HPLC-MS indicó que aquellos pacientes que respondieron adecuadamente al tratamiento exhiben niveles reducidos de NAD⁺ y SAM antes del tratamiento, en comparación con sujetos sanos y muestras de pacientes que no mejoraron con fototerapia. Sorprendentemente, las cantidades de NAD⁺ y SAM se normalizaron al grupo control después del tratamiento (Figura 24). Vale la pena mencionar que los niveles de NADH de los pacientes que respondieron antes y después de la fototerapia tendieron a mejorar ligeramente en comparación con una muestra sana, sin embargo, no fue estadísticamente significativa (Figura 24). Sin embargo, la relación entre los niveles de NAD⁺ y NADH mostró claramente un desequilibrio entre ellos, siguiendo el mismo patrón de recuperación descrito para NAD⁺ y SAM después del tratamiento (Figura 24).

20

25

La reducción en los niveles de NAD⁺ junto con SAM, podría sugerir una mayor actividad de NNMT, que cataliza la reacción entre NAM y SAM para producir 1-MNA y SAH. La eliminación de NAM por NNMT puede afectar negativamente el conjunto de NAD⁺ del camino de salvamento. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de NAM y SAH o 1-MNA antes o después del tratamiento. NAD⁺, NAD⁺ NADH y/o SAM podrían ser biomarcadores séricos potenciales para predecir la respuesta de los pacientes con psoriasis a la fototerapia.

30

Ejemplo 2.18. NAMPT y PAR se sobreexpresan en el núcleo de los queratinocitos humanos de las lesiones psoriásicas.

Alentados por los datos transcriptómicos de las lesiones de psoriasis que indican la
5 sobreexpresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de NAD⁺ y
PAR, decidimos verificar si estas alteraciones podrían detectarse a nivel de proteína en la piel
lesionada de pacientes con psoriasis.

El análisis inmunohistoquímico de muestras de piel sana y lesiones de psoriasis usando un
anticuerpo para NAMPT humano, demostró claramente que NAMPT se expresaba
10 débilmente en la epidermis sana. Sin embargo, NAMPT se sobreexpresó ampliamente en la
capa espinosa y en algunos queratinocitos basales y células dérmicas en la piel lesionada por
psoriasis. Curiosamente, la sobreexpresión drástica de NAMPT en la epidermis de la
psoriasis estuvo presente principalmente en el núcleo de los queratinocitos, pero también se
detectó en el citoplasma (Figura 25A).

15 Por otro lado, la inmunohistoquímica para la detección de PAR en muestras de piel de sujetos
sanos y lesiones de psoriasis indicó que en el grupo de control PAR estaba naturalmente
presente en la epidermis y menos pronunciadamente en la dermis. Sorprendentemente, PAR
mostró un patrón aparentemente aleatorio en la capa espinosa y la dermis de la piel de la
psoriasis, donde no todas las células de esta capa mostraron mayores niveles de PAR, que se
20 acumuló en el núcleo (Figura 25B). La tinción nuclear de los queratinocitos es consistente
con la ubicación subcelular de los PARP.

Estos resultados sugieren fuertemente un papel para NAMPT y PARP en la psoriasis. Más
estudios serían necesarios para demostrarlos definitivamente como posibles estrategias
terapéuticas para tratar la psoriasis y probablemente la dermatitis atópica u otras
25 enfermedades inflamatorias crónicas de la piel.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de la muerte celular Parthanatos seleccionado del grupo que comprende: inhibidor de NAMPT, inhibidor de PARP o inhibidor de AIFM1, para ser usado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.
- 5 2. Inhibidor de la muerte celular parthanatos para ser usado, según la reivindicación 1, en el que la enfermedad inflamatoria de la piel es psoriasis o dermatitis atópica.
3. Inhibidor de la muerte celular Parthanatos para ser usado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los inhibidores se administran mediante una administración local o sistémica, preferiblemente administración tópica.
- 10 4. Inhibidor de la muerte celular Parthanatos para ser usado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de NAMPT se selecciona de la lista que comprende: FK-866 (APO866 o daporinad), STF-118804, KPT-9274, GMX1778 (CHS828) y / o nicotinamida (NAM); en donde el inhibidor de PARP se selecciona de la lista que comprende: olaparib (AZD2281, KU0059436), AZD2461, talazoparib
15 (BMN 673), veliparib (ABT-288), niraparib, iniparib (INN, BSI 201), rucaparib (AG-014699, PF -01367338), CEP-9722, CEP-8983, INO-1001 (3-Aminobenzamida), PJ34, A966492 y / o AG-14361; y en donde el inhibidor de AIFM1 es N-fenilmaleimida y ácido p-cloromercurifenilsulfónico (PCMBS).
5. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la muerte celular
20 parthanatos seleccionado del grupo que comprende: inhibidor de NAMPT, inhibidor de PARP o inhibidor de AIFM1 y, opcionalmente, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, para ser usada en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.
6. Composición farmacéutica para ser usada, según la reivindicación 5, en la que la
25 enfermedad inflamatoria de la piel es psoriasis o dermatitis atópica.
7. Composición farmacéutica para ser usada, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizada porque está formulada como una crema, espuma, gel, loción, pomada o está incluida en parches transdérmicos.
8. Composición farmacéutica para ser usada, según cualquiera de las reivindicaciones 5
30 a 7, en la que el inhibidor de NAMPT se selecciona de la lista que comprende: FK-866 (APO866 o daporinad), STF-118804, KPT-9274, GMX1778 (CHS828) y / o nicotinamida (NAM); en donde el inhibidor de PARP se selecciona de la lista que comprende: olaparib (AZD2281, KU0059436), AZD2461, talazoparib (BMN 673),

veliparib (ABT-288), niraparib, iniparib (INN, BSI 201), rucaparib (AG-014699, PF - 01367338), CEP-9722, CEP-8983, INO-1001 (3-Aminobenzamida), PJ34, A966492 y / o AG-14361; y en donde el inhibidor de AIFM1 es N-fenilmaleimida y PCMBMS.

- 5 9. Método *in vitro* para identificar y producir compuestos candidatos útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel que comprende: (a) Determinar si la muerte celular parthanatos se ha inhibido midiendo al menos la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en una muestra biológica aislada del paciente después de la administración del compuesto candidato; (b) en el que si
- 10 después de la administración del compuesto candidato se determina que la muerte celular parthanatos se ha inhibido debido a la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y / o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 son estadísticamente inferiores en comparación con la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM,
- 15 SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 antes de la administración del compuesto candidato, esto es indicativo de que el compuesto candidato es eficaz en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel.
10. Método *in vitro* para determinar la eficacia o la respuesta a un tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel que comprende: (a) Determinar si la muerte celular parthanatos se ha inhibido midiendo al menos la actividad enzimática de
- 20 NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en una muestra biológica aislada del paciente después de la administración del tratamiento; (b) en donde si después de la administración del tratamiento se determina que la muerte celular parthanatos se ha inhibido debido a la
- 25 actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 son estadísticamente inferiores en comparación con la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 antes de la administración del tratamiento, esto es indicativo de que el
- 30 tratamiento es efectivo.
11. Método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de la piel y/o para seleccionar pacientes que padecen enfermedades inflamatorias de la piel para un tratamiento con inhibidores de la muerte celular parthanatos que comprende: (a) Determinar si la muerte celular parthanatos se ha activado midiendo al menos

- actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en una muestra biológica aislada del paciente; (b) en el que si se determina que la muerte celular parthanatos se ha activado debido a la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 son estadísticamente mayores en comparación con la actividad enzimática de NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1 en pacientes sanos control, esto es indicativo de que el paciente padece una enfermedad inflamatoria de la piel y se puede recomendar un tratamiento con inhibidores de la muerte celular parthanatos.
- 5
- 10
12. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la enfermedad inflamatoria de la piel es psoriasis o dermatitis atópica.
13. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la muestra biológica es biopsia de piel, sangre, suero, plasma u orina.
- 15
14. Uso *in vitro* de NAMPT, NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH, AIFM1, PARP y/o PAR para determinar si la muerte celular parthanatos se activa o inhibe y, en consecuencia, para identificar y producir compuestos candidatos útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, para determinar la eficacia o la respuesta a un tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel o para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de la piel.
- 20
15. Kit adaptado para identificar y producir compuestos candidatos útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, para determinar la eficacia o respuesta a un tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel o para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de la piel que comprende:
- 25
- a. Herramientas para obtener una muestra biológica del paciente, y
 - b. Herramientas o reactivos para determinar si la muerte celular parthanatos se activa o inhibe, midiendo al menos la actividad enzimática NAMPT y PARP; la cantidad de NADH, NAD⁺, NAM, NMN, SAM, SAH y/o PAR; y/o la proteólisis de AIFM1.
- 30

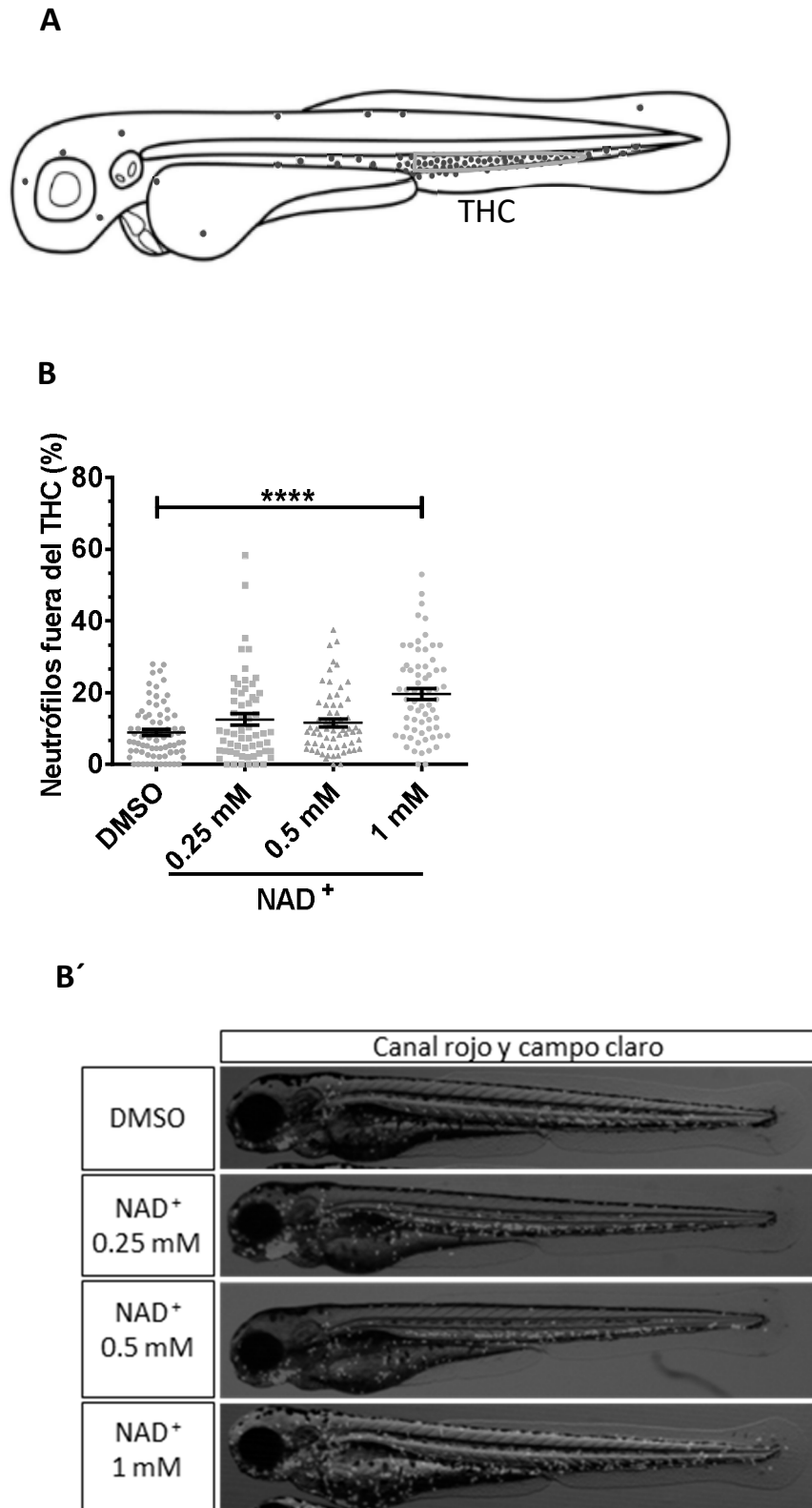
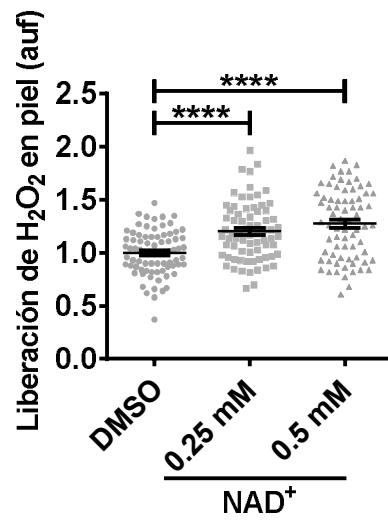


FIG 1

A



A'

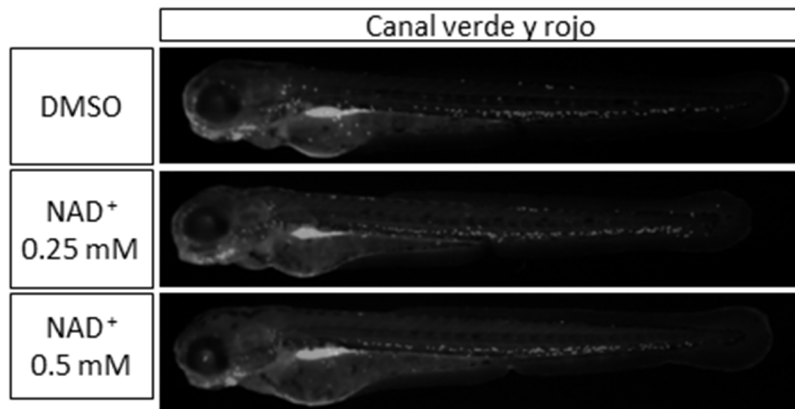
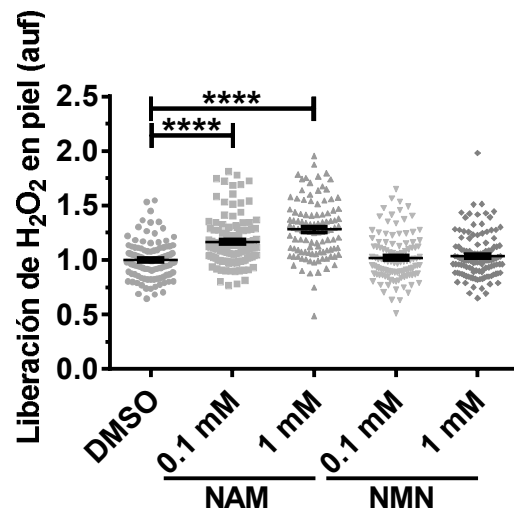


FIG 2

B



B'

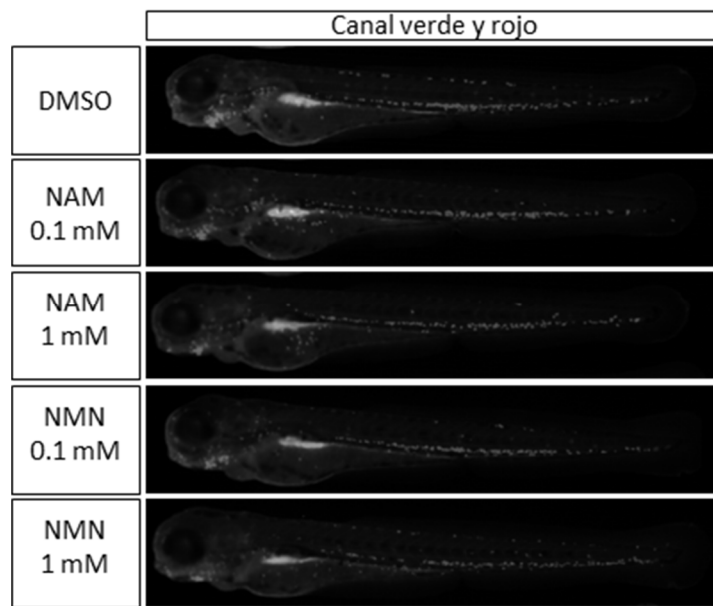
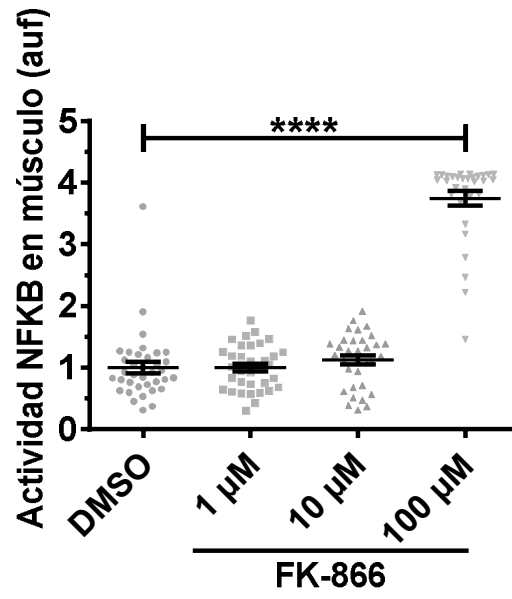


FIG 2 (cont.)

A



A'

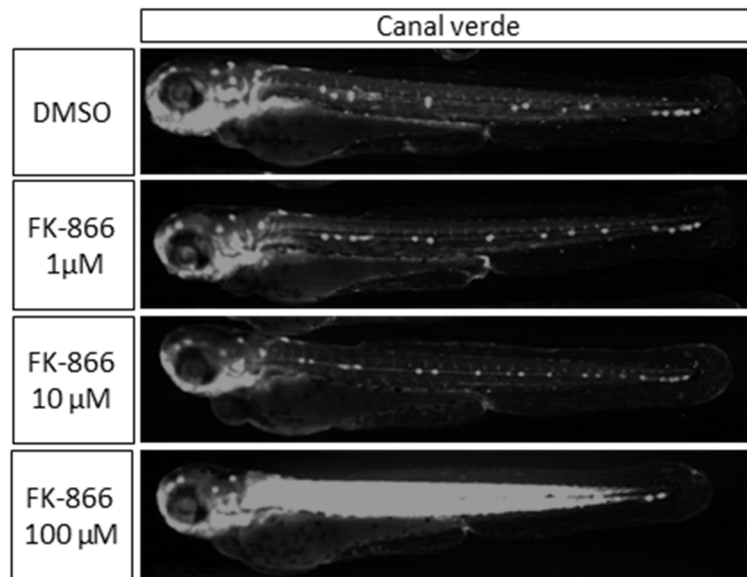
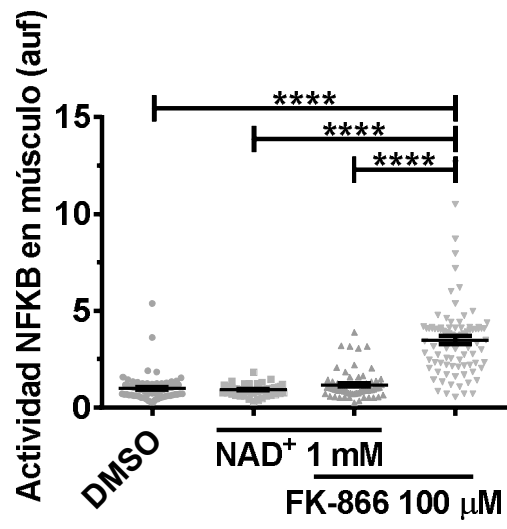


FIG 3

A



A'

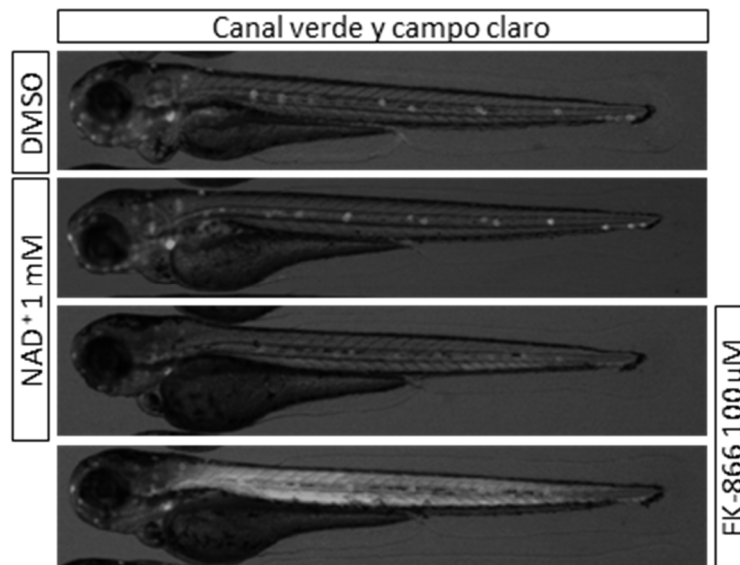
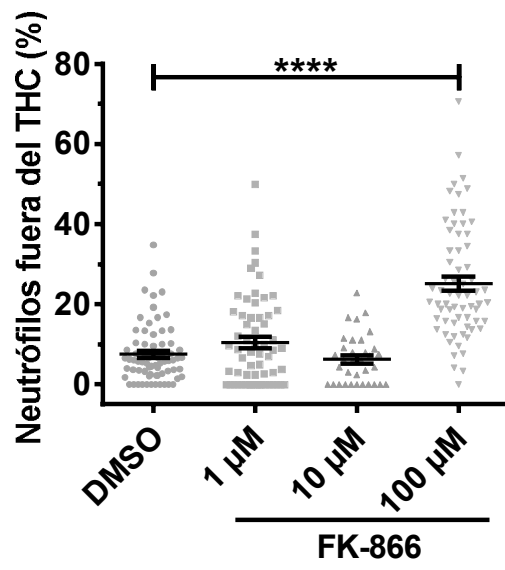


FIG 4

A



B

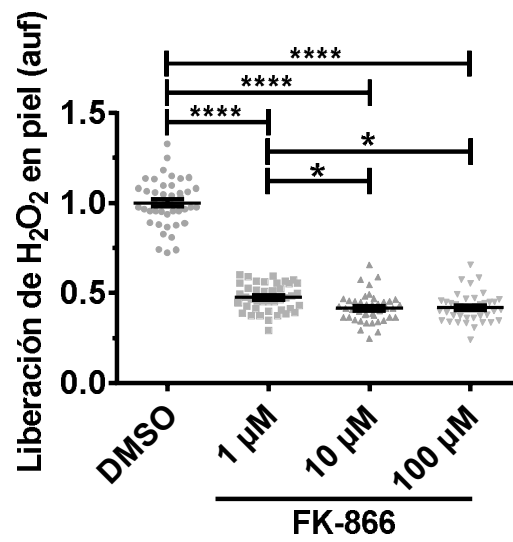


FIG 5

C

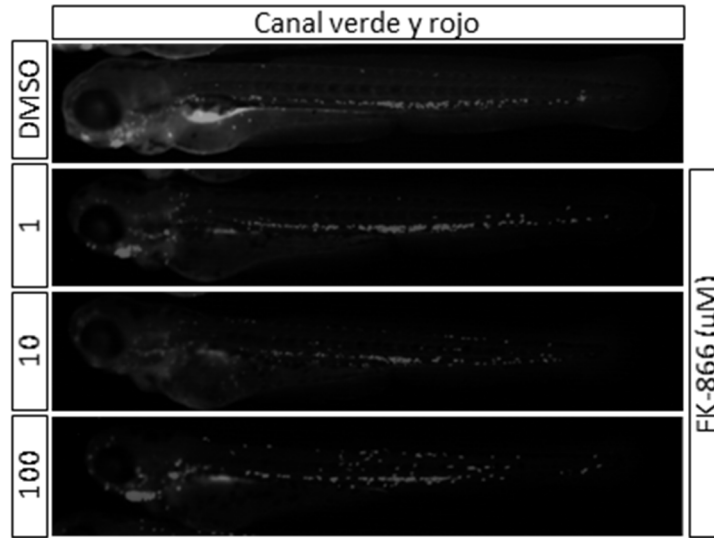


FIG 5 (cont.)

A

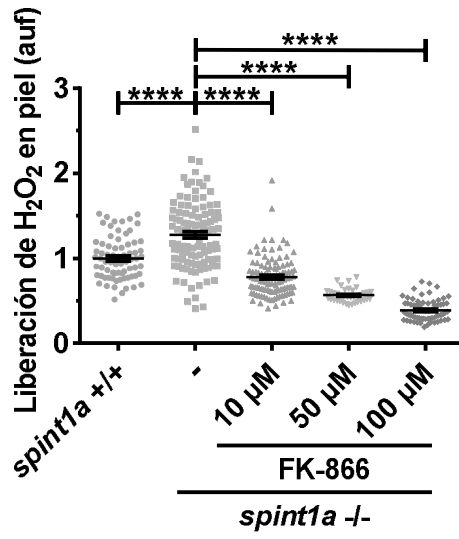
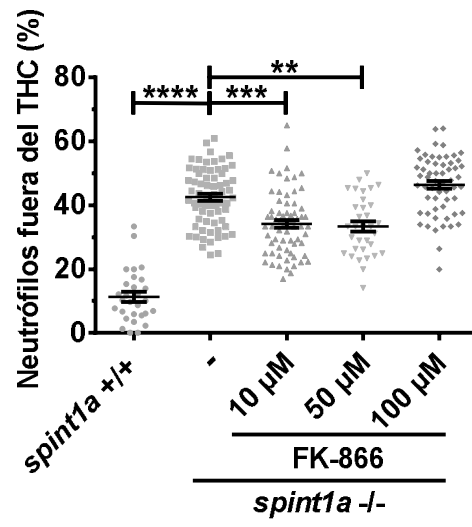


FIG 6

B



C

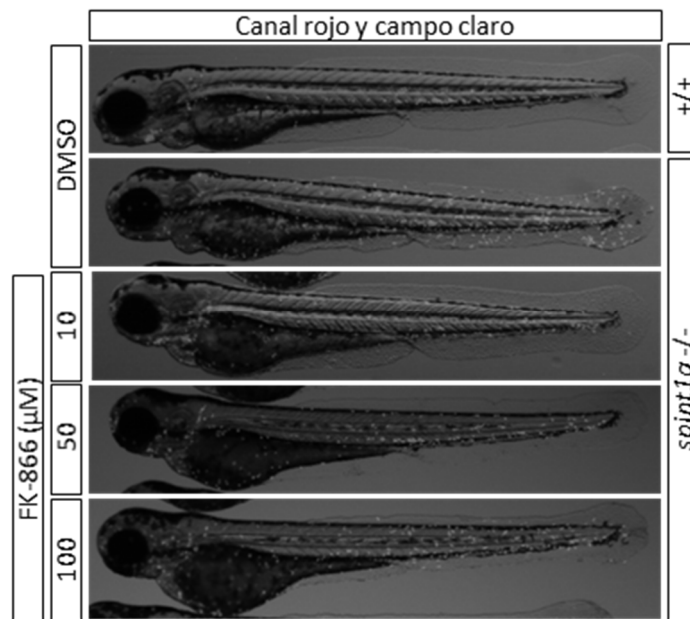
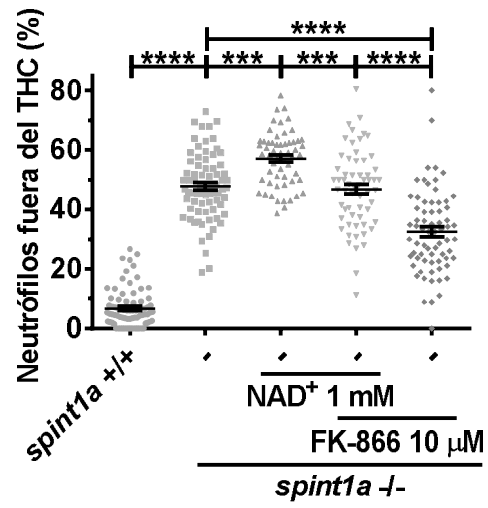


FIG 6 (cont.)

A



A'

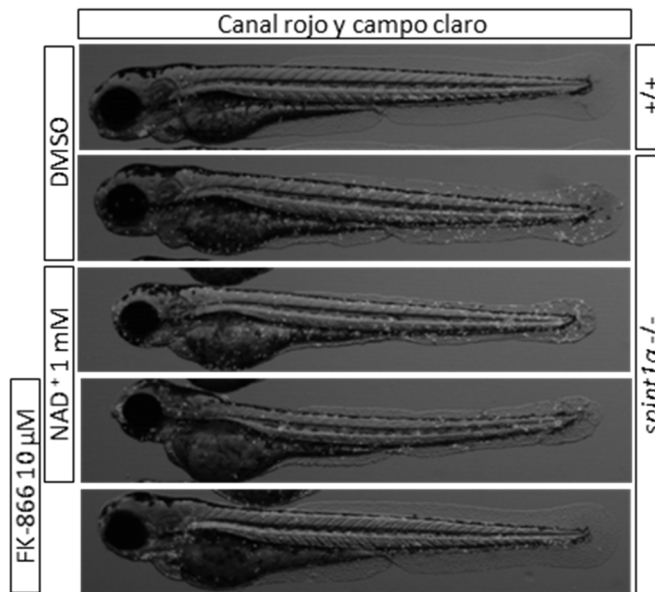


FIG 7

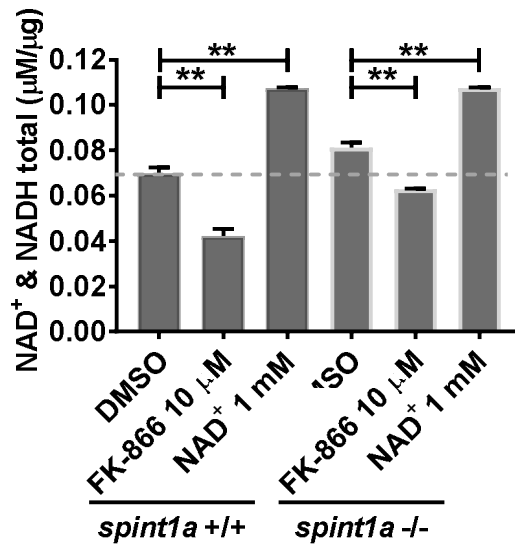


FIG 8

A

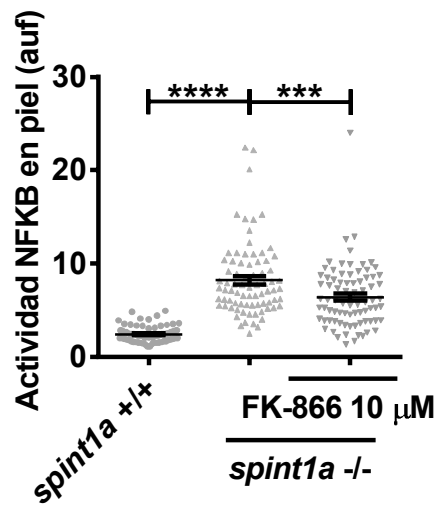


FIG 9

A'

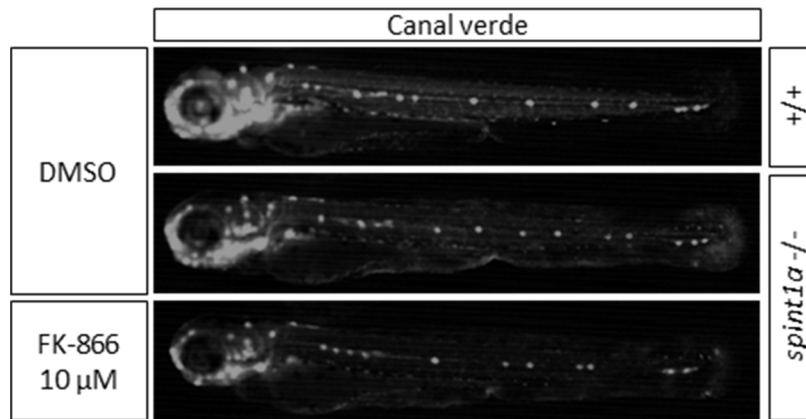


FIG 9 (cont.)

A

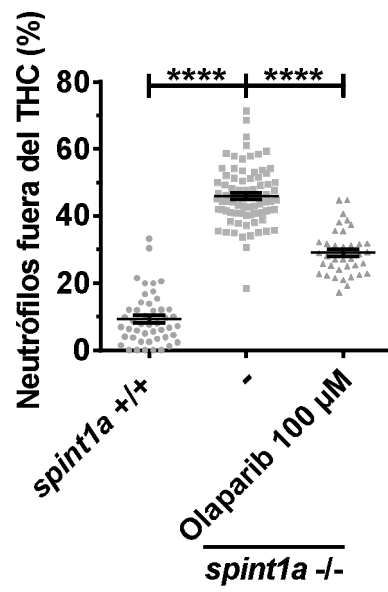
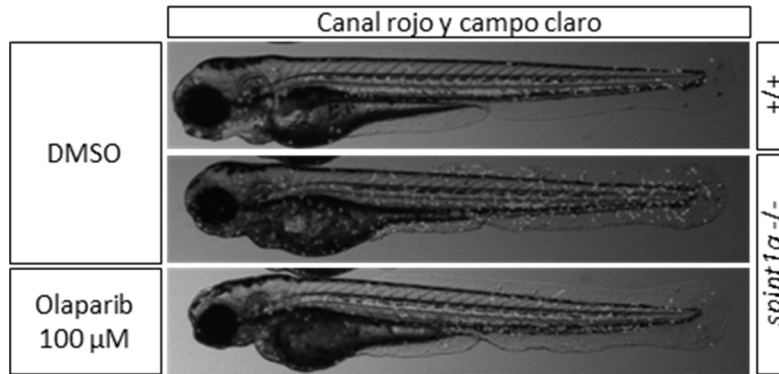
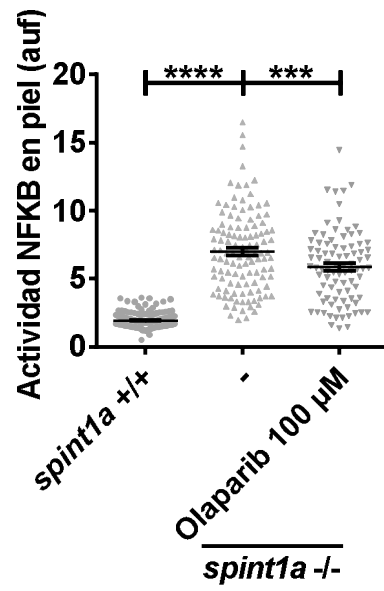


FIG 10

A'



B



B'

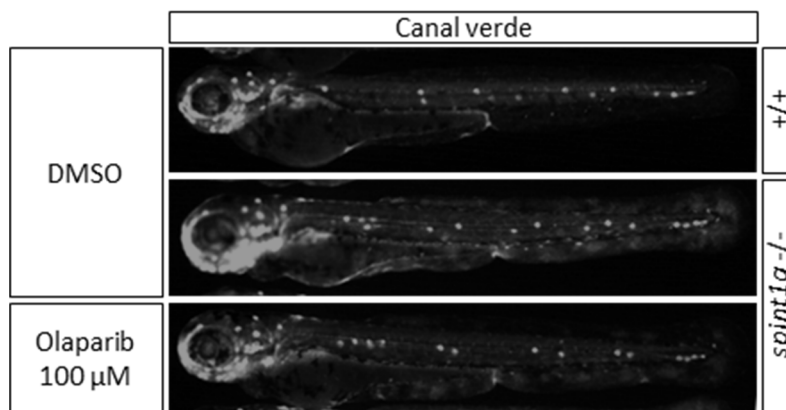
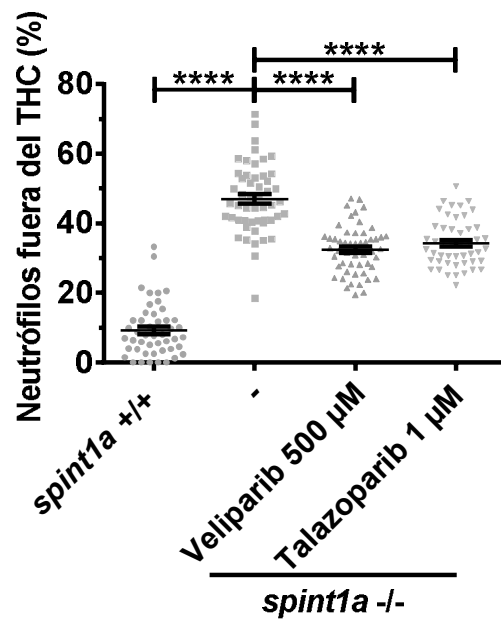


FIG 10 (cont.)

C



C'

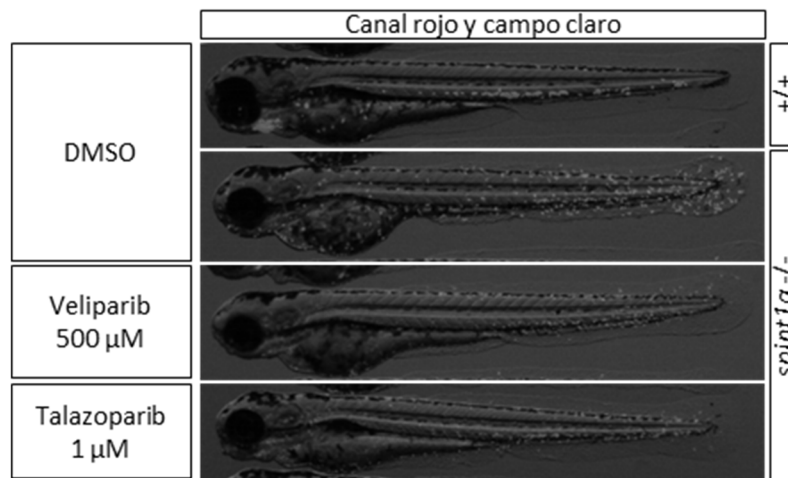


FIG 10 (cont.)

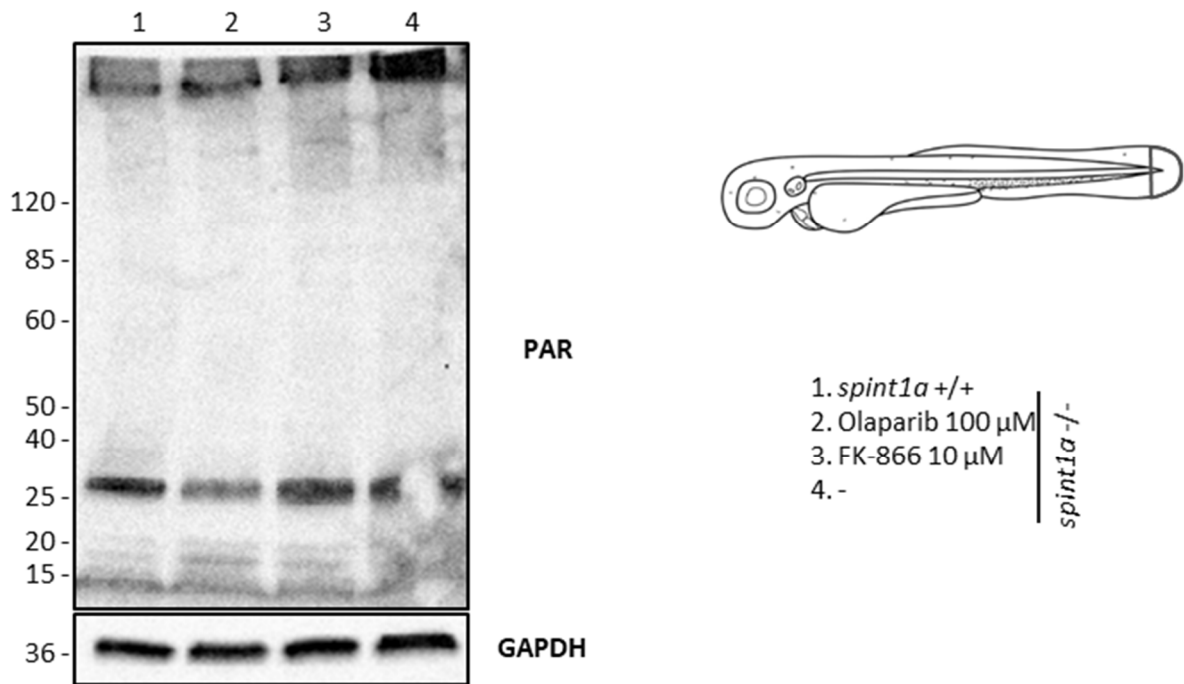


FIG 11

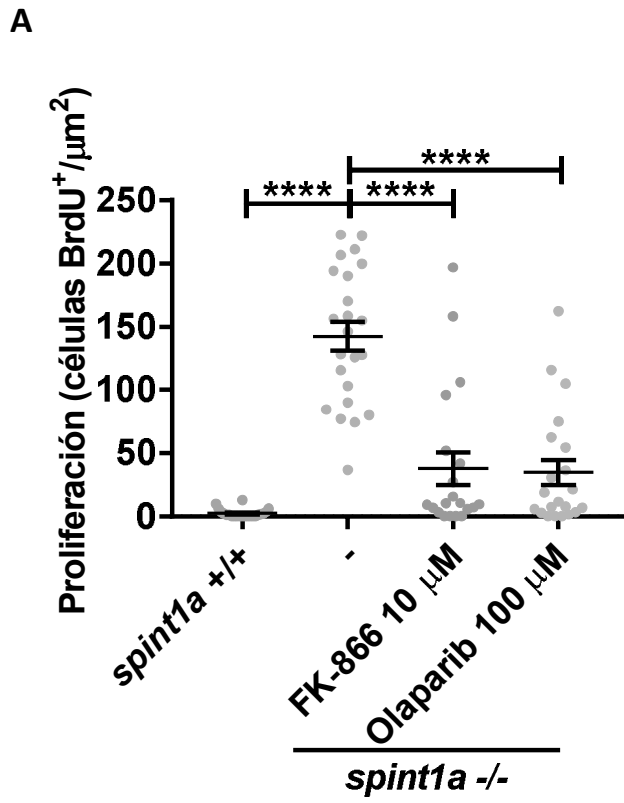


FIG 12

A'

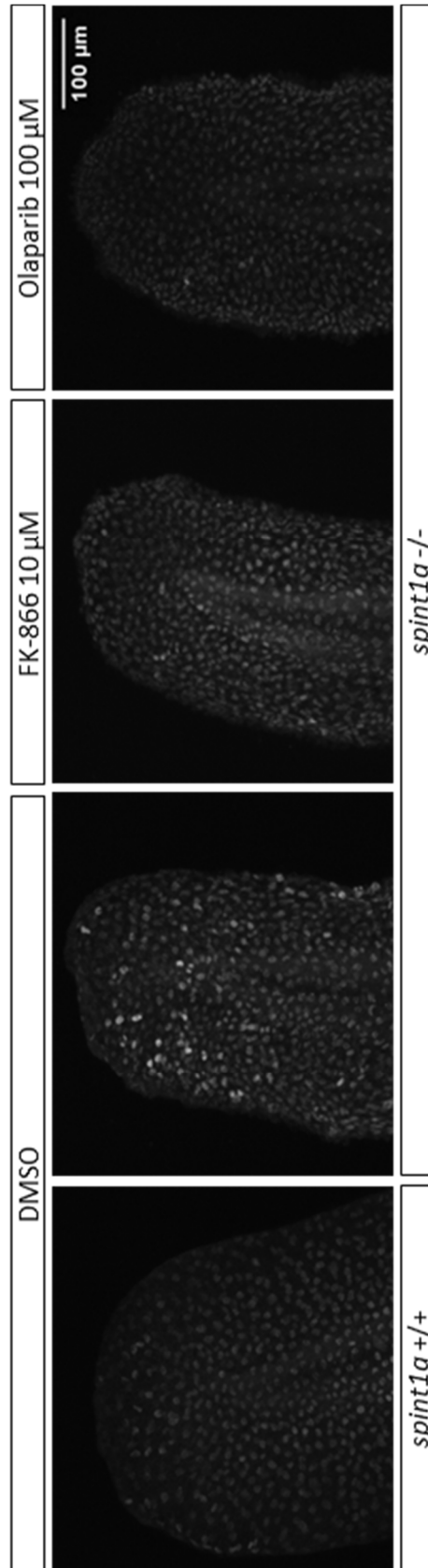
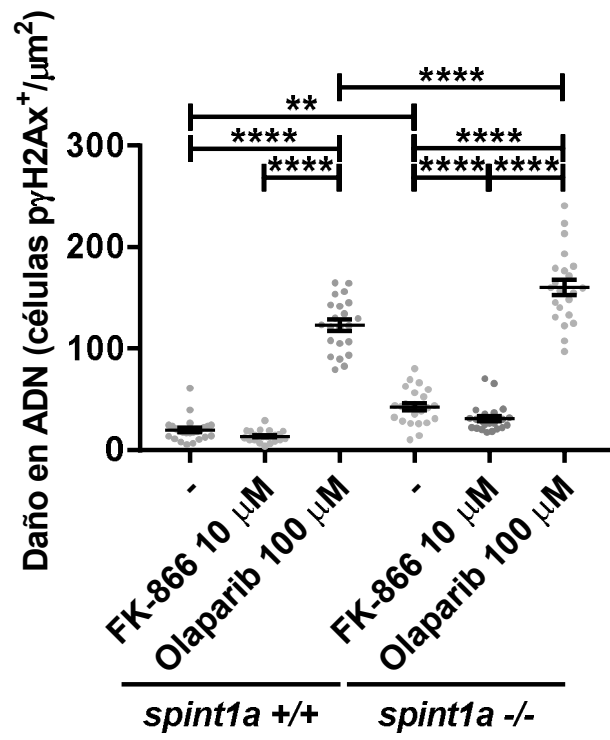


FIG 12 (cont.)

A



B

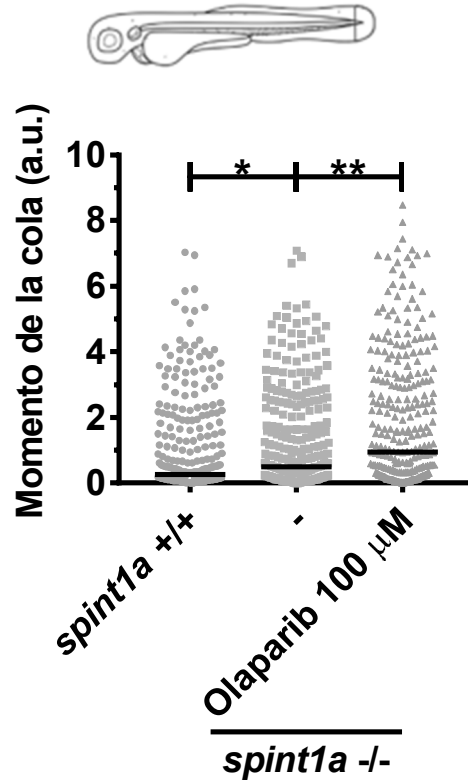


FIG 13

A'

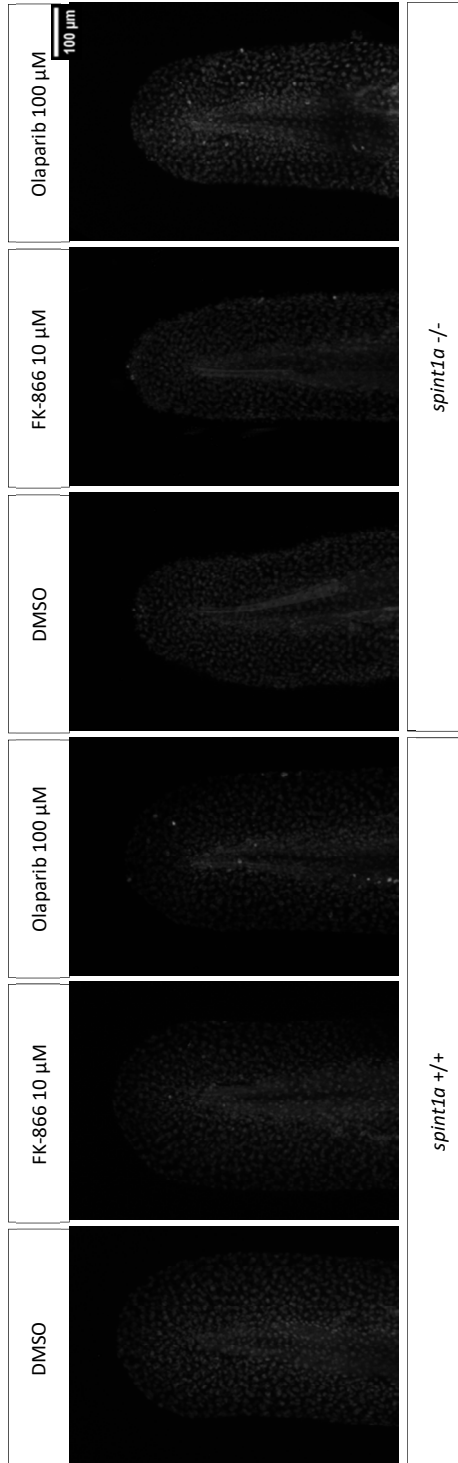


FIG 13 (cont.)

A

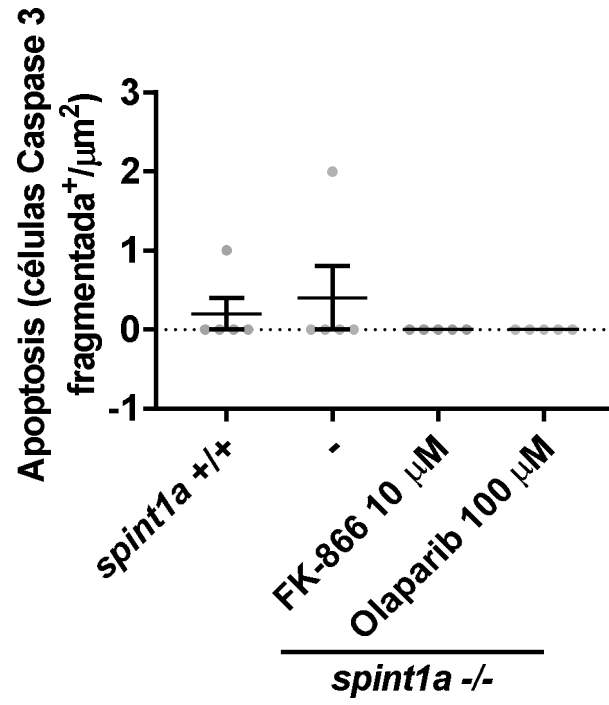


FIG 14

A'

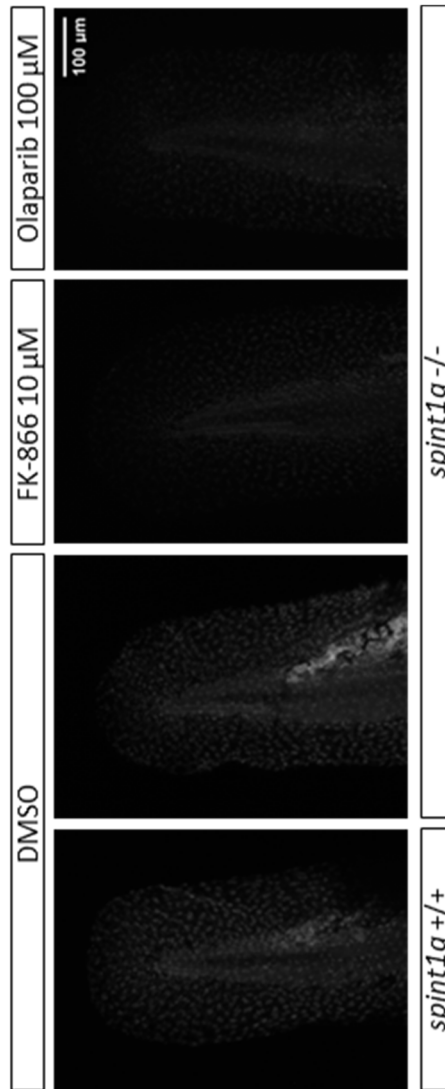
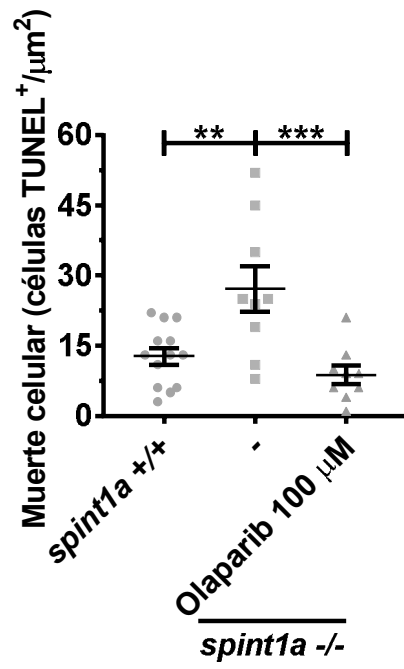


FIG 14 (cont.)

A



A'

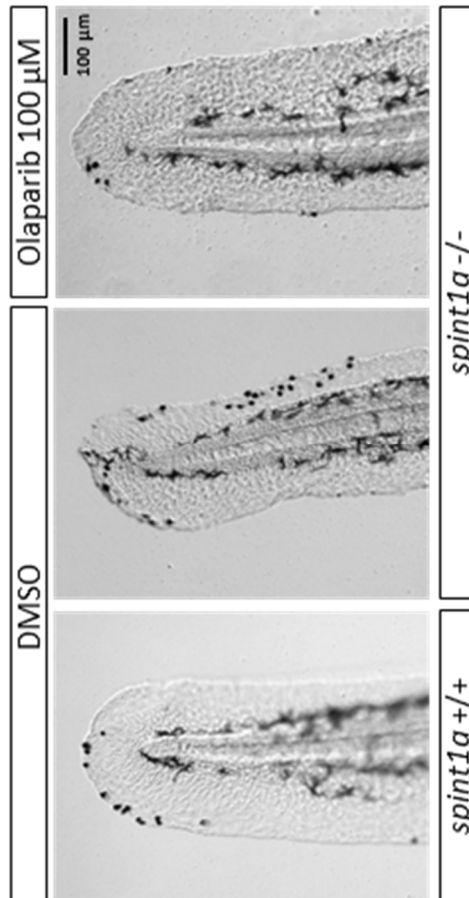
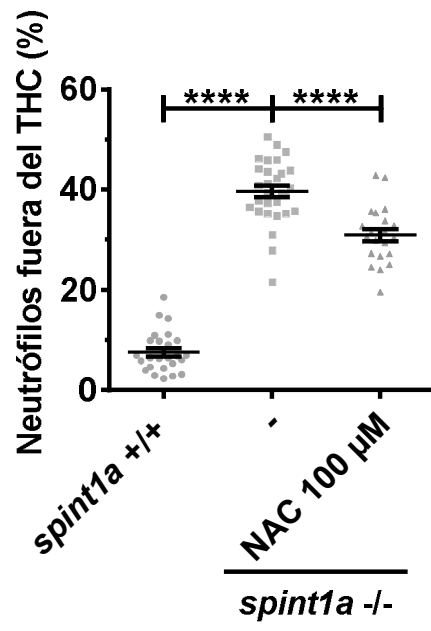


FIG 15

A



A'

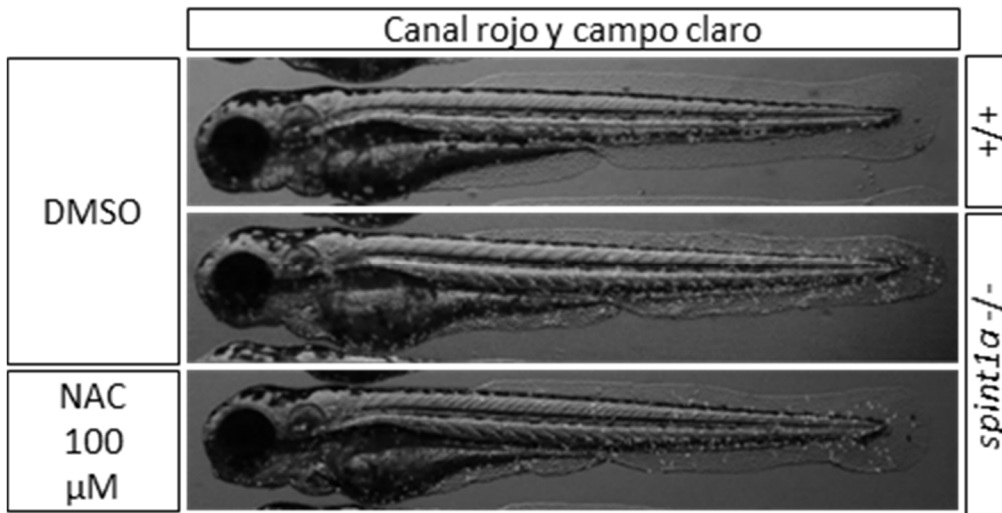
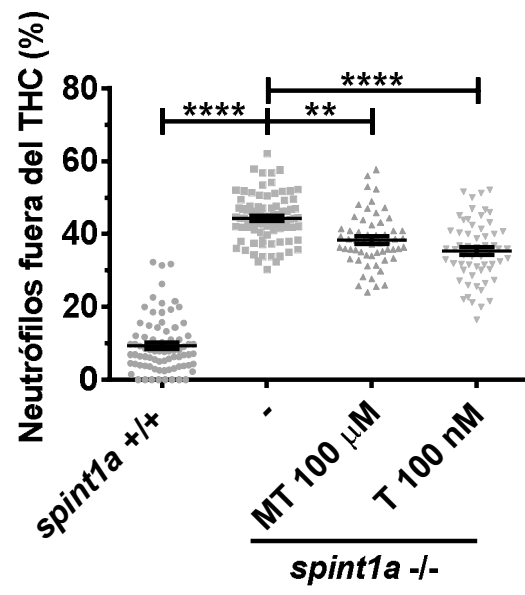


FIG 16

B



B'

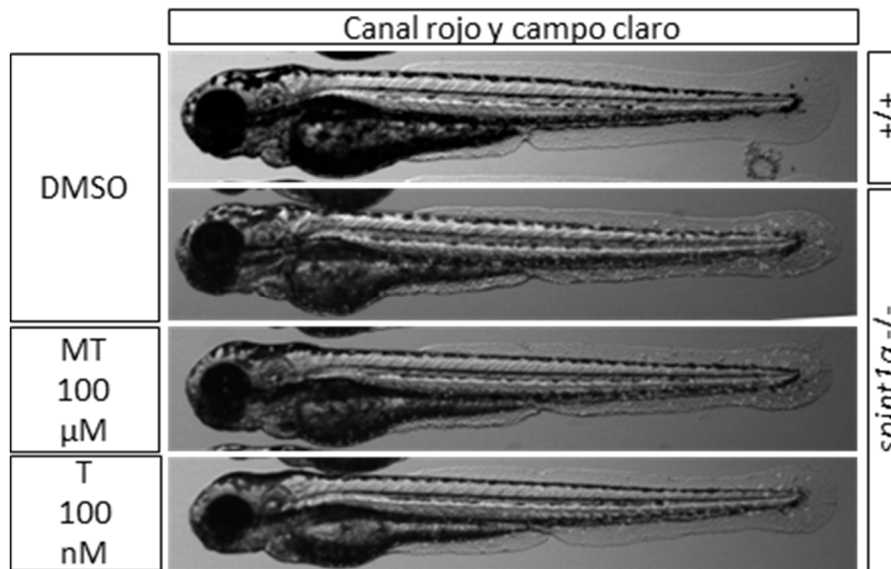
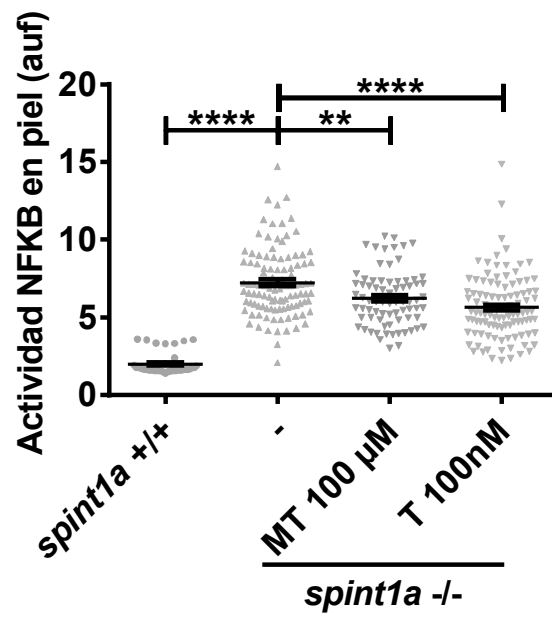


FIG 16 (cont.)

c



c'

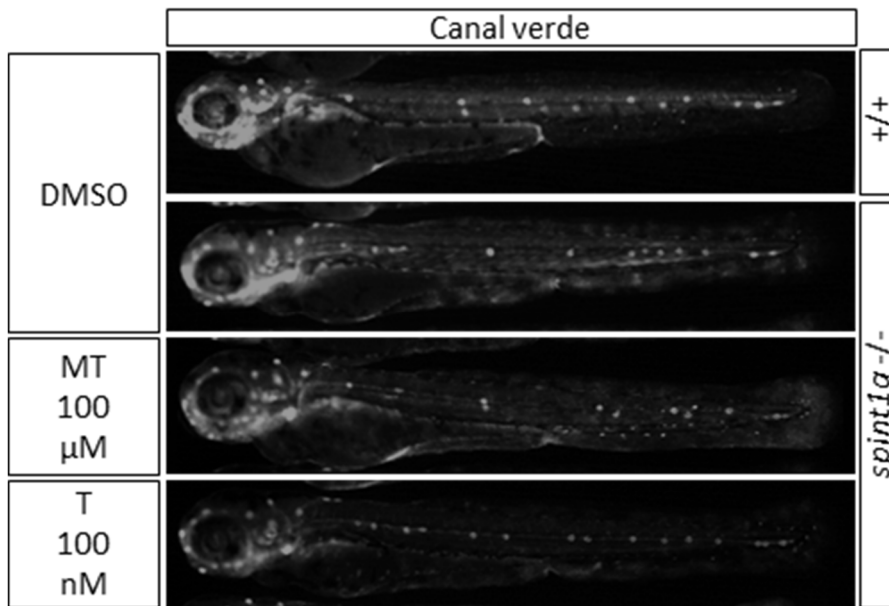
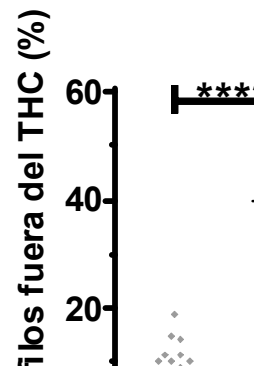


FIG 16 (cont.)

A



A'

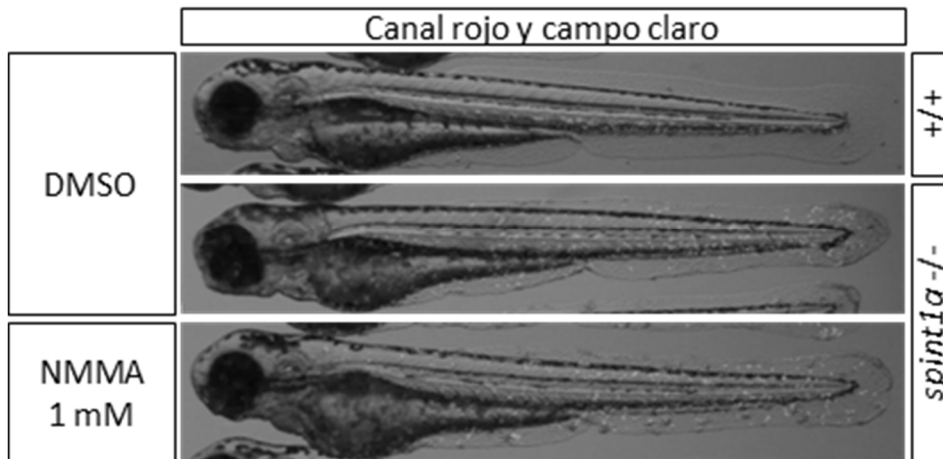
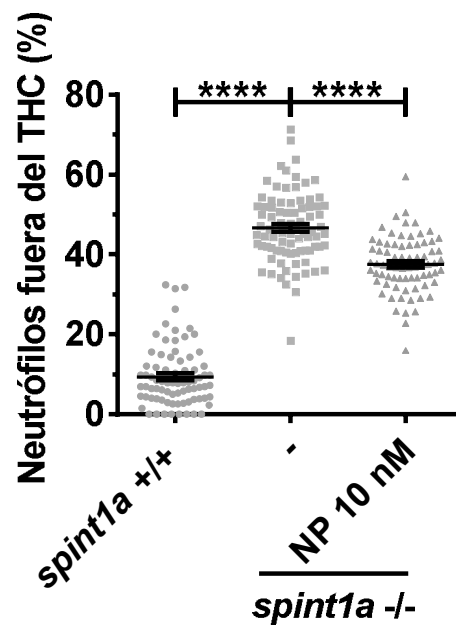


FIG 17

A



A'

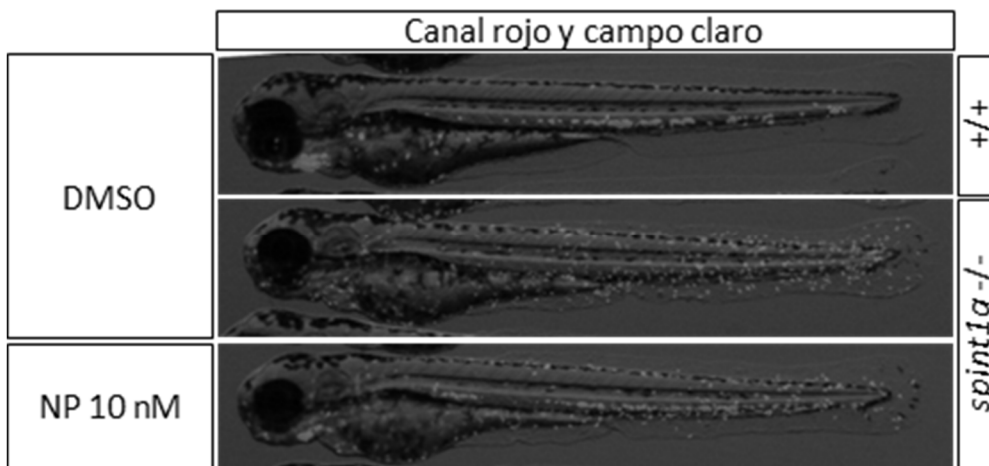
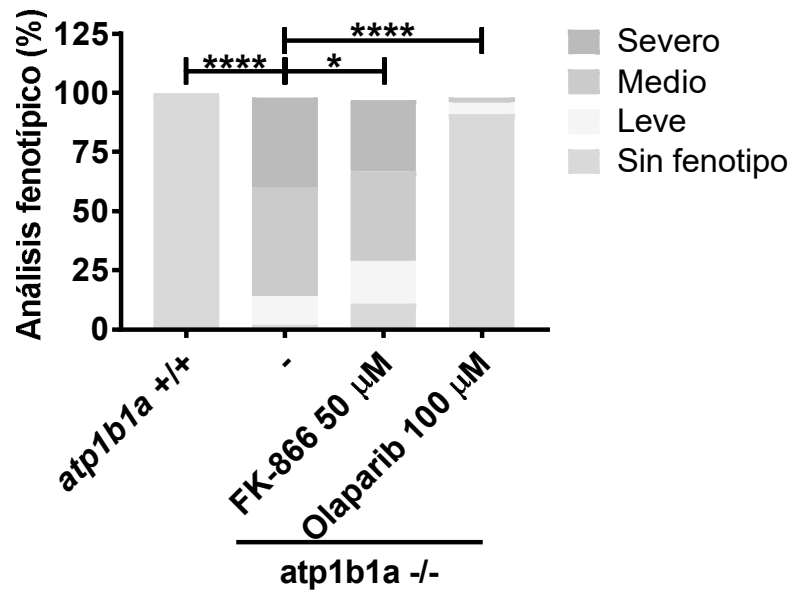


FIG 18

A



A'

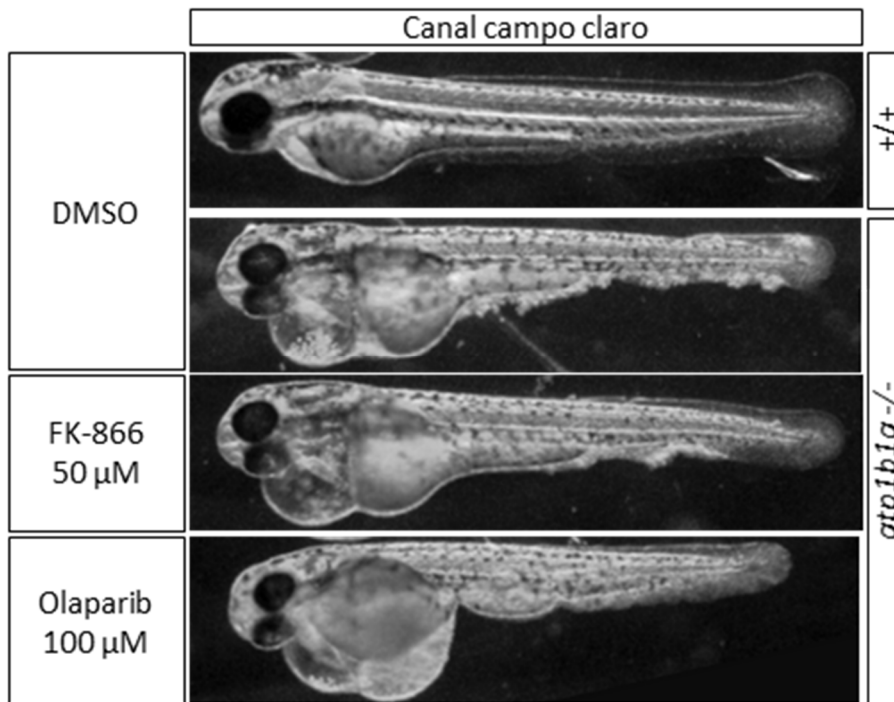


FIG 19

A

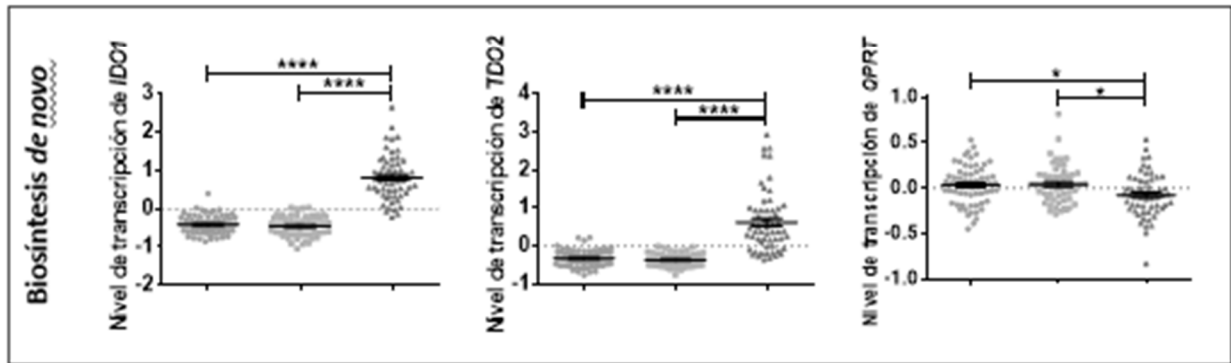
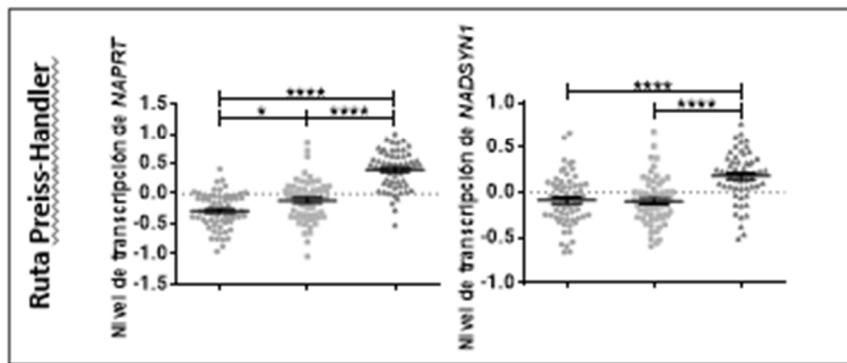
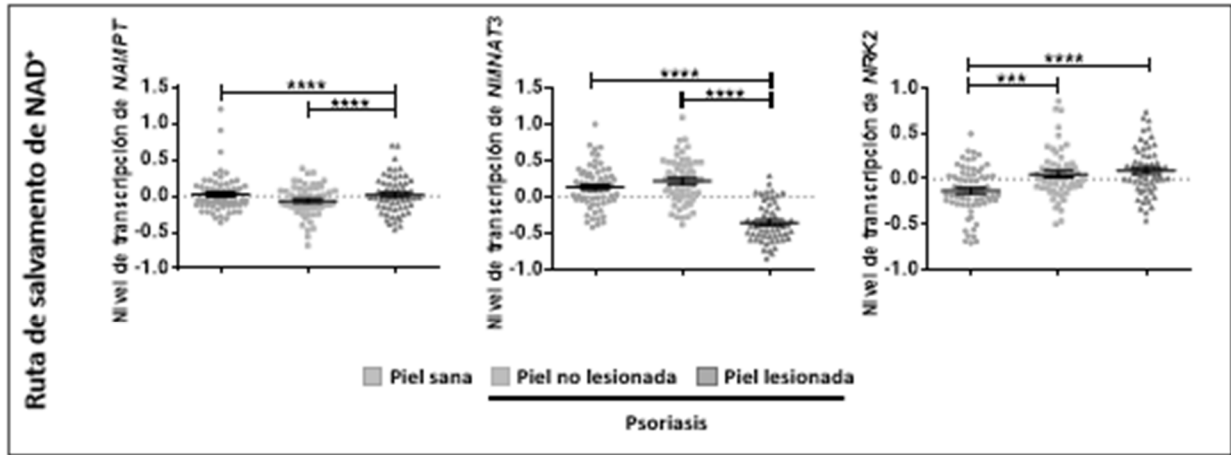


FIG 20

B

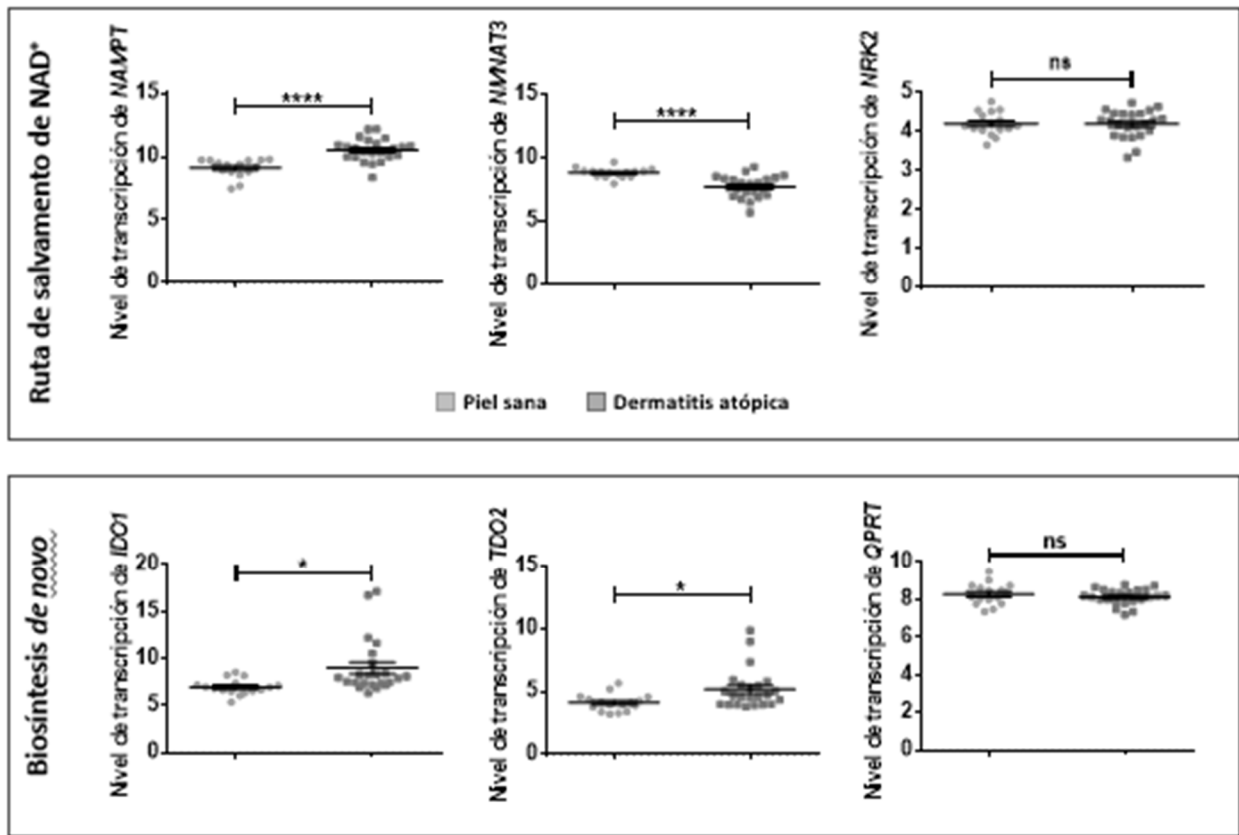


FIG 20 (Cont.)

C

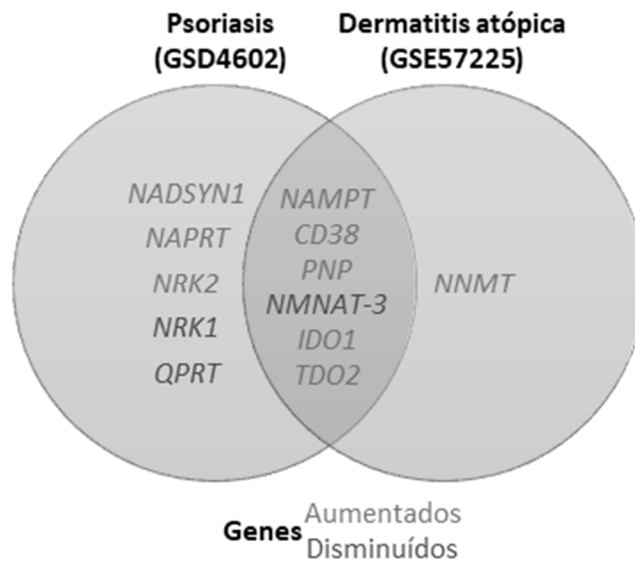


FIG 20 (Cont.)

A

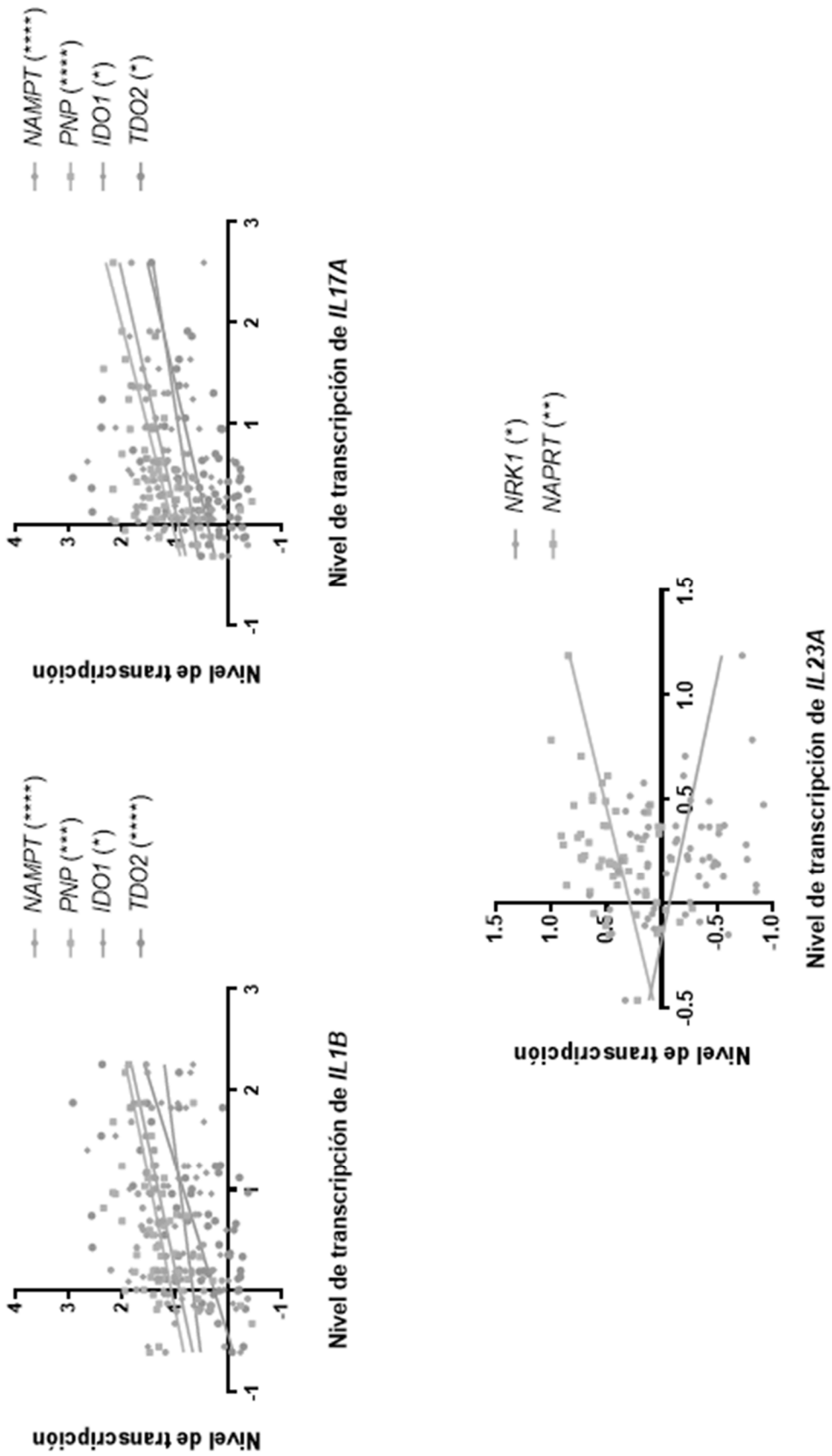


FIG 21

B

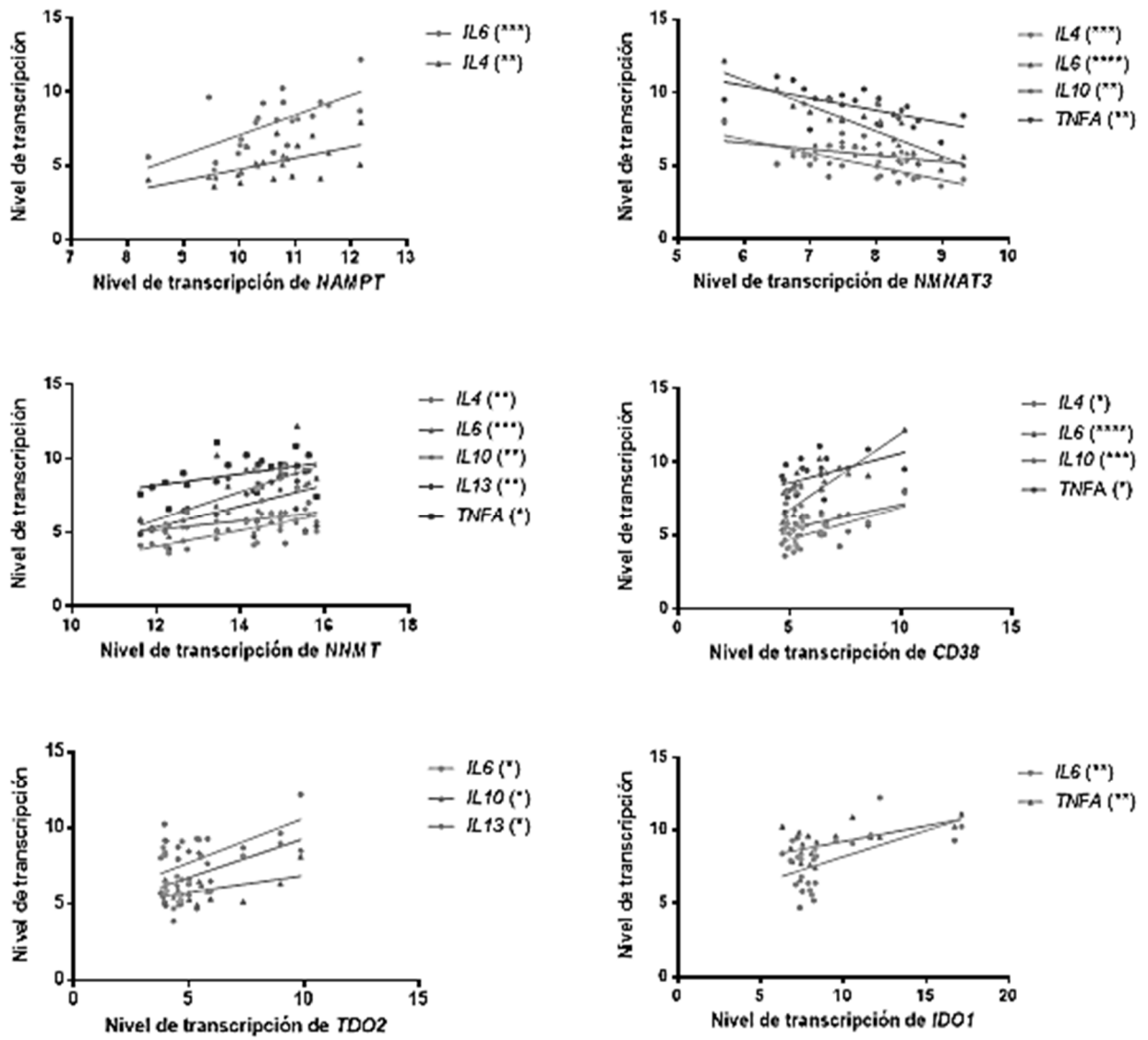
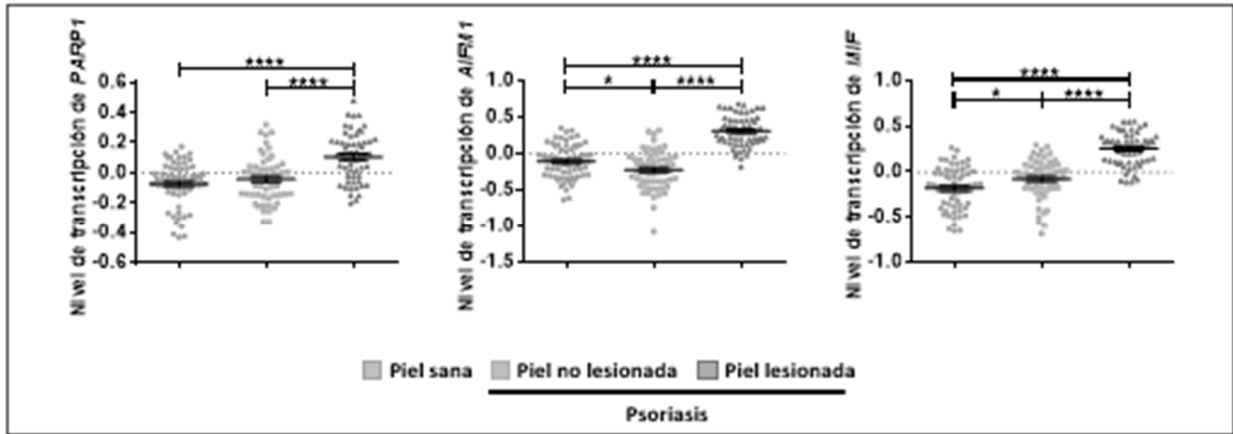
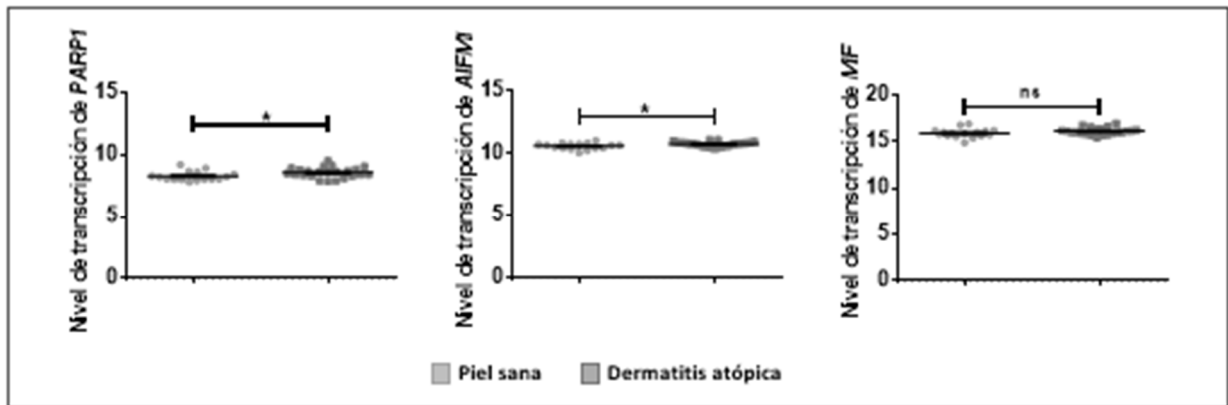


FIG 21 (cont.)

A



B



C

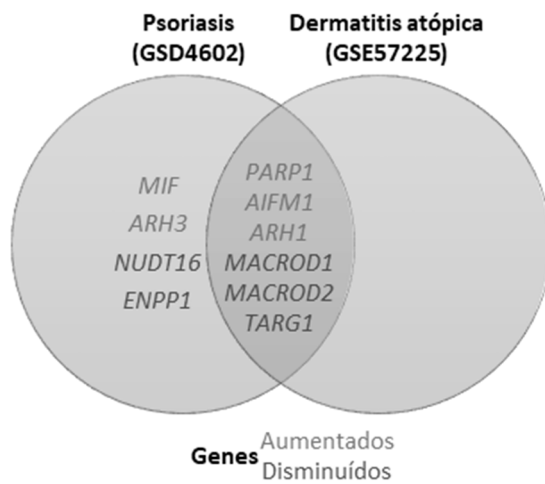


FIG 22

A

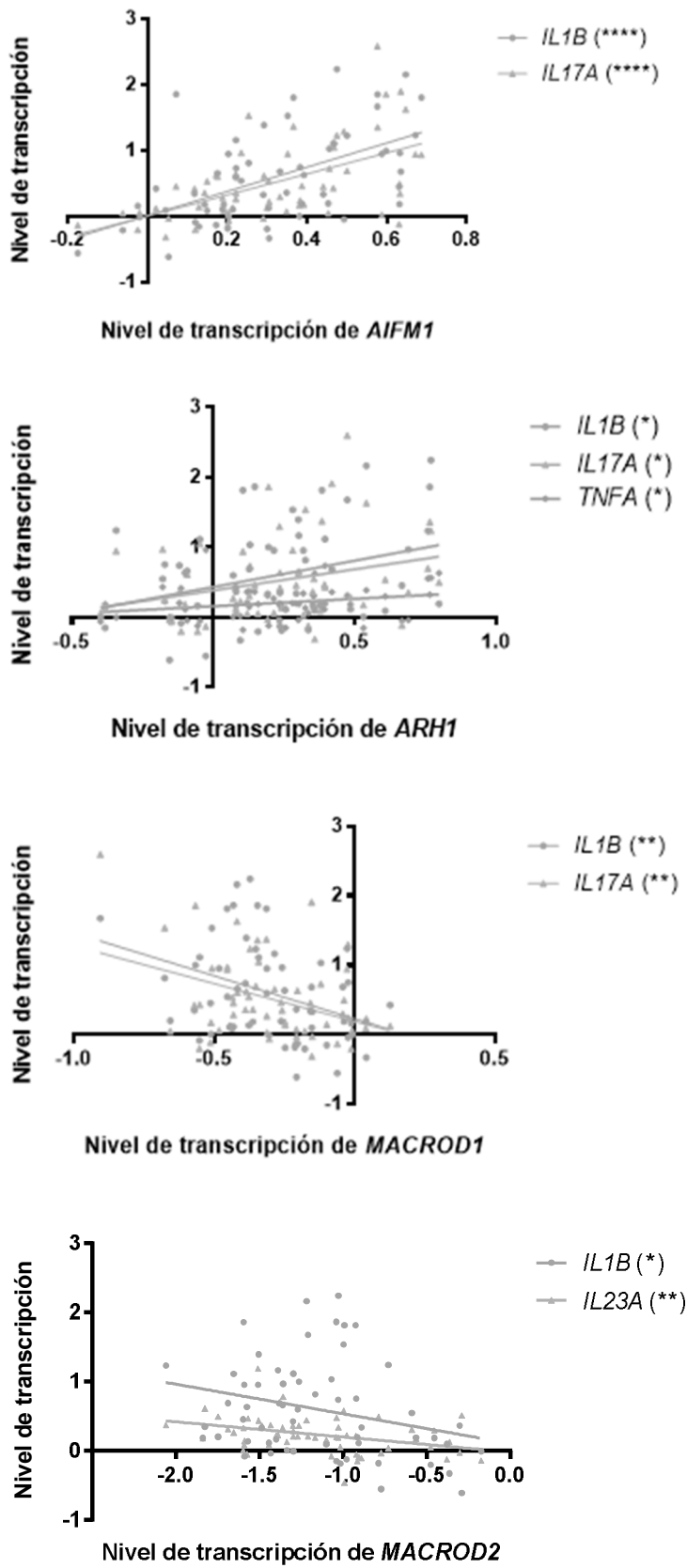


FIG 23

B

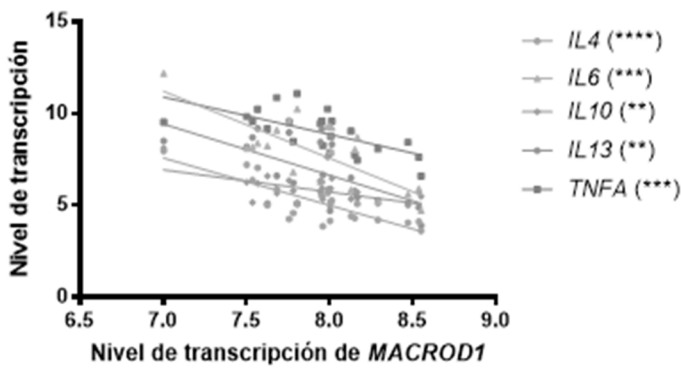
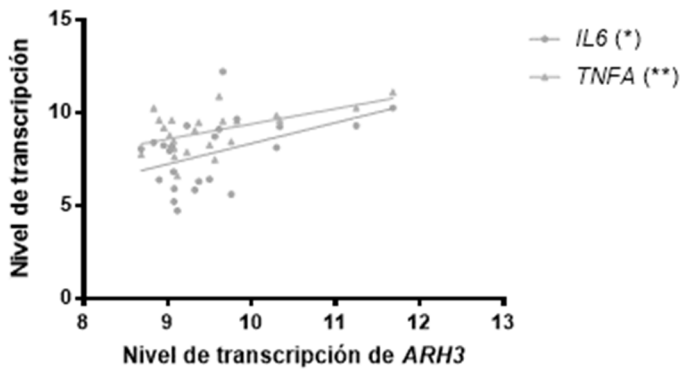
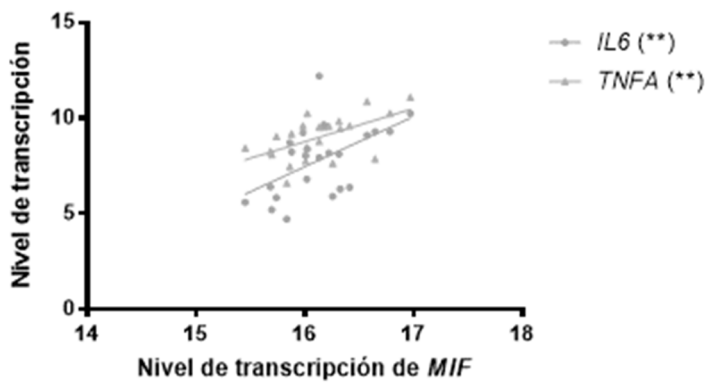
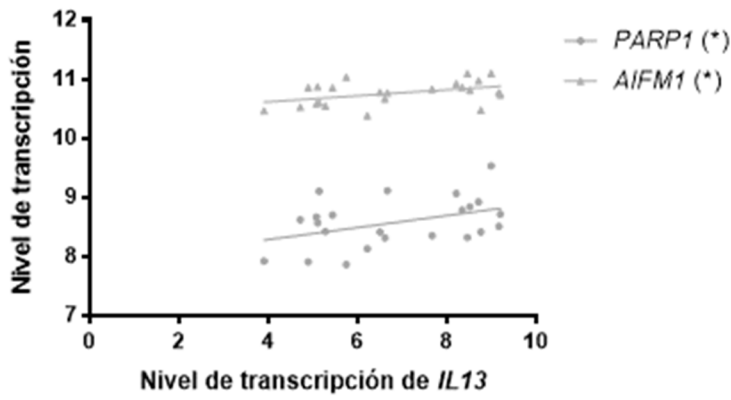


FIG 23 (cont.)

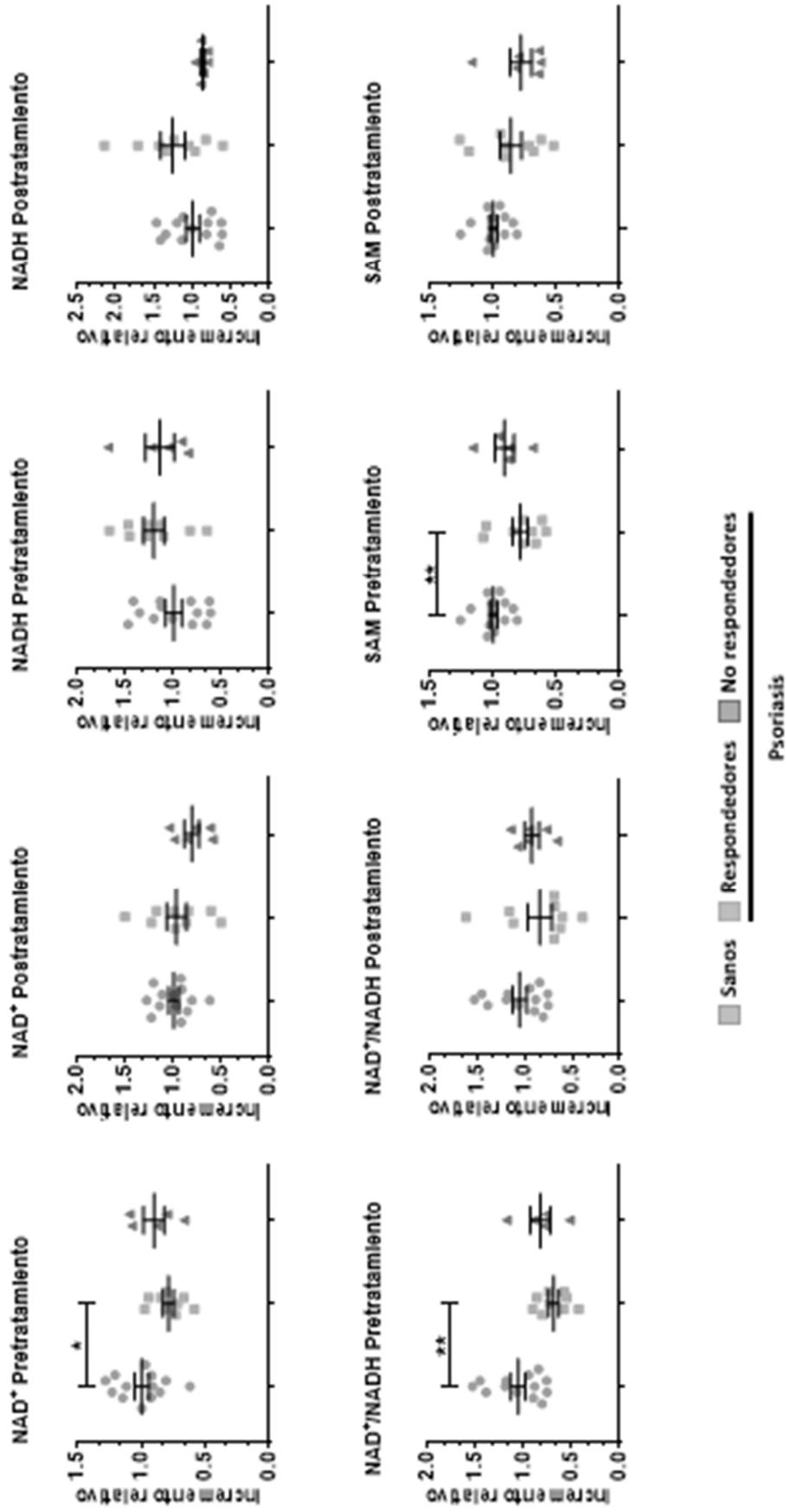
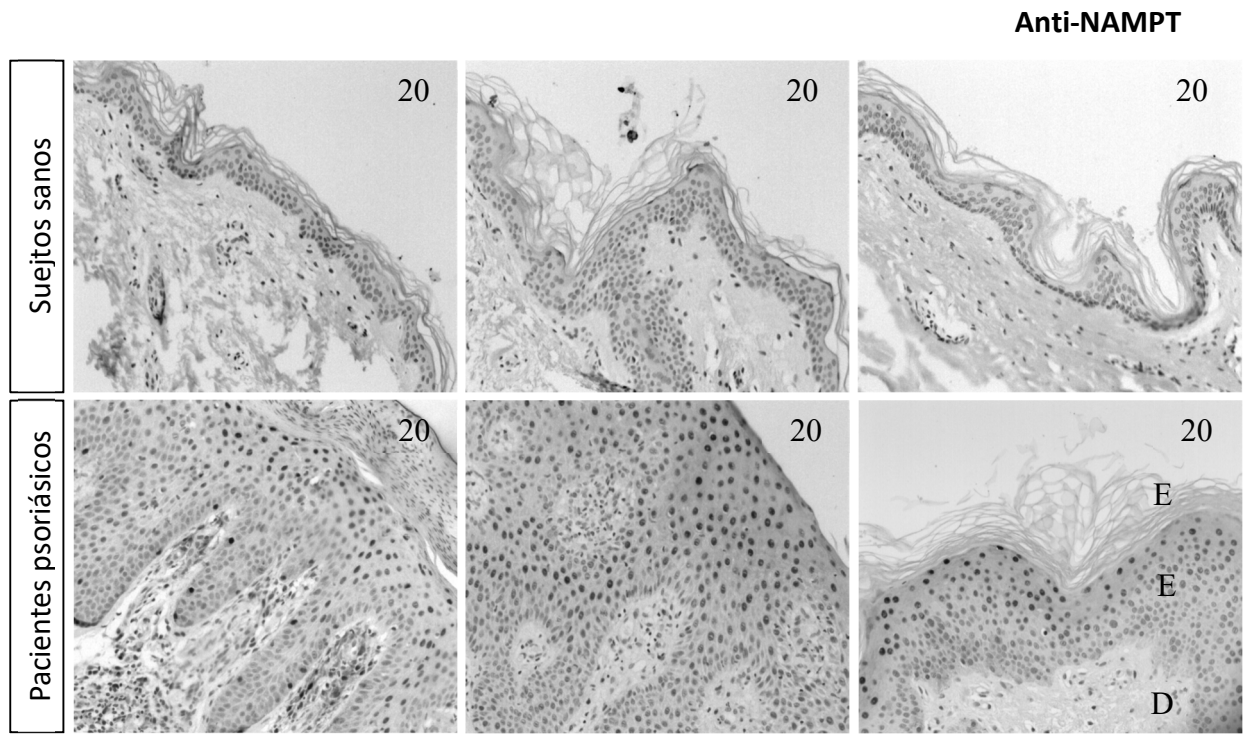


FIG 24

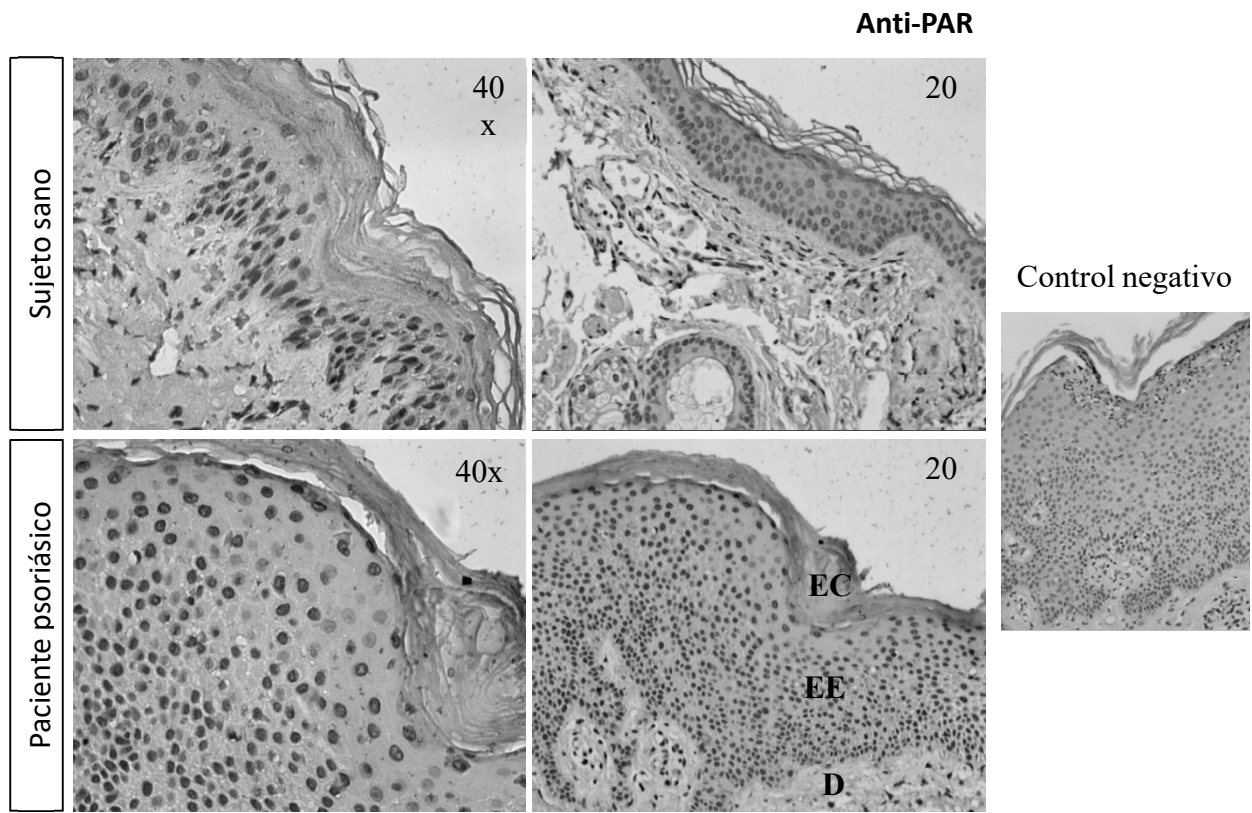
A



EC, Estrato córneo; EE, Estrato espinoso; D,

FIG 25

B



EC, Estrato córneo; EE, Estrato espinoso; D, Dermis

FIG 25 (cont.)



②¹ N.º solicitud: 201931043

②² Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2019

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2012031196 A1 (FORMA THERAPEUTICS INC [US]; GENENTECH INC [US]) 08/03/2012, todo el documento	1-8
Y	XIE S. et al. Comparisons of gene expression in normal, lesional, and non-lesional psoriatic skin using DNA microarray techniques. International Journal of Dermatology, 2014, Vol. 53, Páginas 1213-1220, todo el documento	1-8
Y	HASMANN M. et al. FK866, a Highly Specific Noncompetitive Inhibitor of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Represents a Novel Mechanism for Induction of Tumor Cell Apoptosis.. CANCER RESEARCH, 01/11/2003, Vol. 63, Páginas 7436-7442, todo el documento	1-8
A	TAN C. L. et al. Nicotinamide metabolism controls the proliferation/differentiation balance in human primary keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology, 01/05/2018, Vol. 138, Páginas S110, todo el documento	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-8

<p>Fecha de realización del informe 14.07.2020</p>	<p>Examinador M. Cumbreño Galindo</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D213/04 (2006.01)

A61K31/4545 (2006.01)

A61P17/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS