



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS**

**FARMACOBIOLOGICAS**

TÍTULO DEL TRABAJO

**Uso de inhibidores de histona deacetilasas como compuestos angiogénicos en el tratamiento de úlceras de pie diabético**

TESIS QUE PRESENTA

**QFB. Alan Orlando Santos Mena**

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**CO-DIRECCION:**

**Dr. Bruno Rivas-Santiago.**

**Dra. Diana Patricia Portales-Pérez.**

**ASESOR:**

**Dr. Fidel Martínez-Gutiérrez**

---

2020

## Créditos institucionales

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003382 y con el apoyo del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con el número 930503. Esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social.



Uso de inhibidores de histona deacetilasa como compuestos angiogénicos en el tratamiento de úlceras de pie diabético por Santos Mena, Alan Orlando se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS**

**FARMACOBIOLOGÍAS**

TÍTULO DEL TRABAJO

**Uso de inhibidores de histona deacetilasas como compuestos angiogénicos en el tratamiento de úlceras de pie diabético**

TESIS QUE PRESENTA

**QFB. Alan Orlando Santos Mena**

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGÍAS

**Jurado**

**Director:** Dr. Bruno Rivas-Santiago. \_\_\_\_\_

**Co-director:** Dra. Diana Patricia Portales-Pérez. \_\_\_\_\_

**Asesor:** Dr. Fidel Martínez-Gutiérrez. \_\_\_\_\_

Zacatecas, Zac.

Agosto 05, 2020

**Comité Académico del  
Posgrado En Ciencias  
Farmacobiológicas  
Facultad de Ciencias Químicas /  
UASLPPresente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de Maestría QFB. Alan Orlando Santos Mena, titulada “Uso de inhibidores de histona deacetilasas como compuestos angiogénicos en el tratamiento de úlceras de pie diabético” ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 7 de agosto del 2020 a las 13hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dr. Bruno T. Rivas Santiago  
Director de Tesis

---

Dra. Diana Patricia Portales Pérez  
Co-Director

---

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez  
Asesor

---

## **Abstract**

The diabetic foot ulcer and the lack of vascularization in low extremities, increase the risk of amputation in patients with *diabetes mellitus* type 2. The present study focused on the search of angiogenesis inducers, based on the pathway of the histone deacetylase inhibitors (HDACi). These compounds are capable to activate the hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ,) the main angiogenesis activator and this activity is reduced in the diabetic foot. Based on these inhibitors, it was performed a drug repositioning on FDA approved molecules to reduce the cytotoxic effects of the HDACi. The docking analysis suggested 3 candidate molecules with the same functional group of the inhibitors previously reported by Ottosson and collaborators. We developed an ex-vivo model of mouse aortic rings to measure the angiogenesis obtaining positive results in 2 of the 3 tested molecules, the 2-aminoacetanilide and the N-boc-1,2-phenylendiamne are capable to increase the proliferation in the aortic rings, the third molecule 1,3-diphenylurea doesn't showed the same effect maybe because their physicochemical properties prevented the interaction with the matrix. Our results suggest that although the candidate molecules have not a reported activity against the histone deacetylase, they can be repositioning like an HDACi promoting angiogenesis.

**Keywords:** Angiogenesis; iHDAC; diabetic foot ulcers; STAT3; HIF-1 $\alpha$

## **Resumen**

Las úlceras de pie diabético y la poca vascularización en extremidades inferiores, aumentan el riesgo de amputaciones en pacientes con *diabetes mellitus* tipo 2. Por esto, buscamos inductores de la angiogénesis usando la señalización de los inhibidores de histona deacetilasa (iHDAC) capaces de activar al factor inducible por hipoxia-alfa (HIF-1 $\alpha$ ), principal activador de angiogénesis. Se reposicionaron compuestos aprobados por la FDA para disminuir posibles efectos citotóxicos, obteniendo 3 moléculas con el mismo grupo funcional que el inhibidor previamente reportado por Ottosson. Se desarrolló un modelo ex vivo de anillos aórticos de ratón para medir la angiogénesis obteniendo resultados positivos en 2 moléculas. La 2-aminoacetanilida y N-boc-1,2-fenilendiamina incrementaron la proliferación en los anillos aórticos siendo candidatos al reposicionamiento como iHDAC.

**Palabras clave: Angiogénesis; iHDAC; úlceras de pie diabético; STAT3; HIF-1 $\alpha$**

# Índice

1. <b>Introducción</b>	8
2. <b>Justificación</b>	12
3. <b>Hipótesis</b>	13
4. <b>Objetivo general</b>	13
5. <b>Objetivos particulares</b>	13
6. <b>Materiales y métodos</b>	13
○ <b>Reposicionamiento y ensamblaje molecular</b>	13
○ <b>Preparación de las moléculas seleccionadas</b>	14
○ <b>Ensayo de angiogénesis en anillos aórticos de ratón</b>	15
○ <b>Análisis estadístico</b>	16
7. <b>Resultados</b>	16
○ <b>Estandarización del ensayo de angiogénesis en aortas de ratón</b>	16
○ <b>Docking de la base de datos Zinc15</b>	19
○ <b>Angiogénesis en anillos aórticos de ratón con inhibidores de histonas deacetilasa</b>	21
8. <b>Discusión</b>	24
9. <b>Conclusión</b>	30
10. <b>Referencias</b>	30

## 1.- Introducción

La *diabetes mellitus* (DM) es una enfermedad caracterizada por la alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas resultantes de una desregulación en la secreción de insulina o una resistencia a la misma, de esta manera se divide la enfermedad en 3 tipos de diabetes siendo la más predominante la *diabetes mellitus* tipo 2, donde se encuentra el 90% de los casos diagnosticados. En México, hay aproximadamente 12.8 millones de personas con diabetes ocupando el sexto lugar en el mundo y se estima que hay otros 4.9 millones sin diagnosticar [1]. La severidad de la DM se deriva de las complicaciones que la hiperglicemia causa en las células, en condiciones fisiológicas la glucosa es absorbida por diversos tejidos, mediante receptores de insulina (IR) los cuales captan la insulina liberada por el páncreas, al entrar en contacto con el receptor se libera el sustrato del receptor de insulina (IRS) ayudando en la translocación de GLUT4 a la membrana permitiendo la entrada de glucosa extracelular al espacio a la célula, ocasionando una disminución de los niveles de glucosa en sangre[2, 3].

El proceso patológico de la enfermedad se debe en parte a la desregulación en la captación de glucosa ocasiona que haya una acumulación en sangre llevando al organismo en un estado de hiperglicemia. Normalmente el organismo es capaz de manejar altos niveles de glucosa de forma aguda que a diferencia de una hiperglicemia crónica la cual puede ocasionar daño celular [4]. La activación de vías de señalización derivadas de la hiperglicemia como la vía de polioles transformando la glucosa en fructosa generando especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales causan estrés y daño celular o la vía de PKC por el aumento de gliceraldehído-3-fosfato que ocasiona el aumento de expresión de endotelina-1 en células vasculares y macrófagos incrementando el riesgo a formar placas ateroscleróticas [5-8] ocasionando isquemia en el organismo.

Las complicaciones más comunes en la *diabetes mellitus* son las nefropatías diabéticas donde a nivel mundial el 80% de las personas con nefropatía terminal se

deriva de la diabetes [9], la neuropatía periférica la cual la prevalencia relacionada con diabetes oscila entre el 16% y el 87% ya que suele aumentar en personas mayores de 50 años [1, 10] y las angiopatías como la enfermedad arterial periférica las cuales presentan cifras del 20%-30%, estas cifras se pueden encontrar disminuidas ya que, al ser una enfermedad asintomática, suele ser diagnosticada hasta que se forma algún evento no cicatrizante en las extremidades inferiores de la persona afectada con DM2 [11]. Las heridas no cicatrizantes es otro tipo de complicaciones evolutivas en pacientes diabéticos y son denominadas como úlceras de pie diabético (UPD), las cuales destacan por ser una complicación derivada principalmente de la neuropatía y la enfermedad arterial periférica. La neuropatía periférica ocasiona anhidrosis en las extremidades inferiores, volviéndola más frágil, además de ocasionar deformidades motoras arqueando el pie y aumentando el estrés mecánico, los traumas menores usualmente terminan con la aparición de una úlcera [12-14]. Si una úlcera se encuentra en una extremidad afectada por la enfermedad arterial periférica, la isquemia resultante disminuye su cicatrización [15]. Se estima que hasta un 30% de los pacientes diabéticos tendrá la aparición de una úlcera en las extremidades inferiores en el transcurso de la enfermedad, de las cuales, del 7-20% requerirá de una amputación [16], también se ha observado que en el 40% de pacientes con úlceras curadas tienden a formarse nuevas ulceraciones en el año que se estuvo tratando la primera [17]. La aparición de infecciones es otro factor que reduce la cicatrización de las úlceras de pie diabético, aunque todas son susceptibles, aproximadamente el 50-80% se infectará, lo que incrementa el riesgo de amputación en otro 50% comparándolo en aquellos pacientes que no presentan una infección [18, 19]. En México, el 69% de las úlceras se encuentran infectadas por cocos Gram-positivos, de los cuales el 30% es *S. aureus* y otro 33% de *S. aureus* es resistente a meticilina (MRSA), que de no ser tratados de forma correcta, es común que las infecciones se agraven y causen osteomielitis en el pie, la cual se encuentra en el 50-60% de los pacientes hospitalizados a causa de una UPD [19, 20]. Una vez que se establece la infección con *S. aureus* es más fácil para otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* colonizar la herida y formar rápidamente

una biopelícula que dificulta la fagocitosis de los polimorfonucleares, además de inactivar a la fracción C3b del complemento [21, 22].

El tratamiento recomendado que se debe dar a un paciente con una úlcera de pie diabético en instituciones de salud gubernamentales consta principalmente de analgésicos si es que existe dolor en la herida, el uso de *bypass* para aumentar la circulación y el uso de vendajes para cubrir la herida y aumentar la reabsorción del exudado. La úlcera cómo tal, recibe debridaciones para eliminar el tejido necrótico acompañado de un lavado exhaustivo para limpiar la zona de contaminantes [23]. Para la administración de antibióticos se recomienda tener en cuenta la severidad, la adquisición y la condición del paciente, dependiendo de la severidad se administra vía oral dicloxacilina, cefalexina o amoxicilina, o vancomicina+piperacilina, meropenem o imipenem en infecciones moderadas o severas respectivamente [24]. Generalmente, en México sólo se recurre al cuidado básico de la úlcera con debridaciones y antibióticos, que, en caso de ser una ulceración que comprometa la integridad del paciente se recurre a una amputación de la extremidad afectada [16, 25]. Se ha observado que el tratamiento con antibióticos es esencial para la recuperación de una úlcera de pie diabético lo que conlleva a otro problema en la actualidad ya que la baja vascularización impide que el tratamiento oral de estos antibióticos actúe de forma correcta aumentando la resistencia de las bacterias ante estos antimicrobianos [26, 27]. Se han propuesto diversos tratamientos adyuvantes para mejorar la cicatrización del pie diabético, tales como el uso de larvas, factores de crecimiento o péptidos de defensa del huésped, que, a pesar de ser efectivos no son accesibles para todos los pacientes por su elevado costo[28, 29].

Las HDAC se dividen en 4 clases, las de clase 1, 2 y 4 dependen del Zinc<sup>2+</sup> para llevar a cabo el proceso de deacetilación, las enzimas pertenecientes a las clases 1 y 2 se encuentran en su mayoría expresadas en todas las células por lo que se consideran blancos terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer[30]. Aunque la estructura de las enzimas sea similar poseen sitios específicos de unión dirigiéndose hacia regiones específicas del genoma humano, la estructura clásica de un iHDAC va dirigida hacia

estas regiones las cuales se dividen en 3, la zona de bloqueo la cual tiene afinidad hacia grupos fenilo, la región de unión hacia cadenas de carbohidratos de más de 4 carbonos y la región de unión a zinc tiene afinidad hacia grupos amino[31]. Los inhibidores más potentes van dirigidos sobre estas 3 partes de la enzima, aunque se ha observado que si una molécula posee sólo el grupo de unión a zinc conformado por una benzamida se puede inhibir a las HDAC, lo que los convierte en terapias dirigidas al huésped[32, 33]. Recientemente, se ha observado que los inhibidores de histonas deacetilasa (iHDAC) con un grupo funcional benzamídico pueden aumentar la expresión de péptidos de defensa del huésped en una vía de señalización dependiente de STAT3 y HIF-1 $\alpha$ , estos factores de transcripción están altamente implicados en la angiogénesis [34, 35]. El efecto que tienen los iHDAC sobre la histona deacetilasa (HDAC) puede ser dependiente de la quelación de Zinc<sup>2+</sup> o al bloqueo del bolsillo de inhibición con al menos cadenas de 4 carbonos de longitud, el grupo funcional encargado de la quelación son los anillos benzamídicos denominados también como fenilendiaminas aroiladas (APD) y se ha observado una restauración del epitelio intestinal en modelos de conejos atribuida a la inducción de los péptidos de defensa del huésped. STAT3 y HIF-1 $\alpha$  son vías altamente expresadas en procesos tumorales aumentando la angiogénesis hacia el tumor y son responsables de promover la proliferación y supervivencia de las células cancerígenas, aunque en úlceras de pie diabético son factores de transcripción que de ser activados pueden promover la cicatrización [33-39].

Los iHDAC poseen diversos efectos adversos dentro el organismo, la inhibición de la deacetilación causa en células tumorales el arresto del ciclo celular, además de la expresión de proteínas apoptóticas, aunque en células sanas no se observan los mismos efectos se desconoce sobre los efectos que puedan tener sobre el paciente afectado por una úlcera de pie diabético. Las vías de señalización que involucradas al usar un iHDAC resultan ser convenientes en como alternativa a tratamiento en estas heridas no cicatrizantes ya que involucra la expresión de factores de transcripción asociados procesos angiogénicos, de proliferación y supervivencia celular, dichos

procesos se encuentran estancados en una herida crónica, la inflamación crónica lleva a los fibroblastos a un estado de senescencia y a los queratinocitos en una proliferación estancada, además de que los factores de transcripción como HIF-1 $\alpha$  se encuentran disminuidos en personas con diabetes y en las úlceras de pie diabético[40, 41]. Gracias a las herramientas bioinformáticas como el acoplamiento molecular, se pueden encontrar moléculas con efectos similares y con la probabilidad de tener menos o ningún efecto adverso, la cantidad de pasos que se exentan al reposicionar una molécula disminuye el tiempo de aprobación del fármaco reposicionado ya que se exentan diversos experimentos de rutina para permitir que la formulación salga al mercado recibiendo la aprobación por administraciones de salud como la *Food and Drug Administration* (FDA)[40, 42, 43].

En el presente estudio se determinó si los compuestos reposicionados como inhibidores de histonas deacetilasas son capaces de inducir la angiogénesis en anillos aórticos de ratón mediante la vía de señalización de entinostat propuesta por Ottosson y colaboradores para ser propuestas en el tratamiento de las úlceras de pie diabético.

## **2.- Justificación**

Las úlceras de pie diabético son un grave problema de salud pública en México y en el mundo que afecta la integridad física y psicológica de quien las padece al igual que a los insumos de las instituciones de salud que las atienden, la falta de vascularización ocasionada por la alteración de mecanismos intracelulares a causa de la hiperglicemia crónica es la disminución de HIF-1 $\alpha$  y su restablecimiento ayudaría a cerrar la herida. Recientemente se han descrito inductores de la

respuesta innata que tienen como intermediario de la señalización intracelular el incremento de la expresión de HIF-1 $\alpha$ , el problema de estos inductores es el elevado precio en el mercado y sus diversos efectos adversos. Por esto, se optó por llevar a cabo un análisis de reposicionamiento molecular de estos inductores para encontrar moléculas con las mismas propiedades y los mismos efectos reduciendo el costo y los efectos adversos que las moléculas inicialmente descritas.

### **3.- Hipótesis**

Moléculas repocionadas como inhibidores de histona deacetilasas (iHDAC) pueden aumentar la angiogénesis mediante la vía descrita de HIF-1 $\alpha$  y STAT3

### **4.- Objetivo general**

Usar bases de datos de libre acceso para reposicionar compuestos que sean capaces de inhibir a las histonas deacetilasas (HDAC) para inducir la angiogénesis en el modelo de anillos aórticos de ratón.

### **5.- Objetivos particulares**

- Usar bases de datos de libre acceso como ZINC15 y SEA para encontrar en base a la molécula líder posibles iHDAC mediante acomplamiento molecular.

Medir la angiogénesis en un modelo ex-vivo de anillos aórticos de ratón bajo estímulos con iHDAC.

### **6.- Materiales y métodos**

#### **Reposicionamiento y ensamblaje molecular**

Para la búsqueda de compuestos capaces de inhibir a las histona deacetilasa se usó la base de datos ZINC15 (<https://zinc15.docking.org>), donde se introdujo el SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) del grupo funcional fenilendiamina aroilada (CC(=O)Nc1ccccc1N), se aplicó un filtro para buscar moléculas dentro del

registro de la Food and Drug Administration (FDA) y se realizó la búsqueda en la base de datos, se obtuvieron las moléculas filtradas y se determinó su posible actividad contra las Histonas Deacetilasas (HDAC) el dominio de libre acceso *Similarity ensemble approach* o SEA (<http://sea.bkslab.org>) y se corroboró *in silico* con el software *AutoDock Vina* para calcular la fuerza de unión al ligando o su  $\Delta G$ . La estructura y las coordenadas del sitio de unión se calcularon obteniendo el área cuadrículada del inhibidor de la HDAC1 los cuales se tomaron de la *Protein Data Bank* o PDB (<https://www.rcsb.org/>) con el código de acceso 5icn, las coordenadas y el área se obtuvieron en Ångströms (Å) con el siguiente tamaño de la caja: x= -40.551 Å y= 21.595 Å y z= -3.474 Å y fueron localizadas en modelos tridimensionales con ayuda del software de diseño molecular PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC*).

### **Preparación de las moléculas seleccionadas**

Las moléculas que se seleccionaron se disolvieron en diferentes matrices según los insertos de solubilidad proporcionados por los proveedores y con la ayuda del buscador de información química del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) o PubChem y con la información proporcionada de la base de datos ZINC15. El compuesto 2-aminoacetanilida (Sigma, St. Louis, USA) al tener un coeficiente de partición de 1.2 fue disuelto en PBS (BioWest Therapeutics Inc. Nuaille, France) dejando una solución 1 molar. El compuesto N-boc-1,2-fenilendiamina (Sigma, St. Louis, USA) con un coeficiente de partición de 1.8 se solubilizó en PBS a menor concentración por tener menos enlaces de hidrógeno disponibles, preparando una solución de 0.1 molar. El último compuesto seleccionado 1,3-difenilurea (Sigma, St. Louis, USA) al tener un coeficiente de partición de 3 se solubilizó en una matriz de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1 molar y se fue diluyendo, aumentando 10% la concentración de PBS en cada dilución, teniendo como resultado una preparación final al 0.01 molar en una matriz de DMSO 30% y PBS 70%.

## Ensayo de angiogénesis en anillos aórticos de ratón

Para el ensayo de angiogénesis de anillos aórticos se utilizó como fundamento la metodología descrita por Laetitia Devy et al. del 2002 con algunas modificaciones[44] en aortas provenientes de ratones BALB/c de 6 meses de edad. Fueron diseccionadas y segmentadas las aortas en anillos de no más de 1mm de espesor para ser lavados con PBS, luego de eliminar los eritrocitos remanentes de los anillos aórticos se colocaron en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Manassas,VA). Posteriormente se usó la matriz basal celular de *Corning Matrigel Growth Factor Reduced* (Corning, NY, USA) compuesta por laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicano de heparan sulfato para mantener los anillos aórticos fijos en placas de cultivo celular de 24 pozos (Corning, NY, USA), la gota de la matriz se colocó centro de cada pozo y posteriormente se embebieron los anillos aórticos en la matriz aún en estado líquido, la placa se incubó durante 1 hora a 37°C permitiendo que el proteoglicano de heparan sulfato se polimerizara y se solidificara junto al anillo aórtico, después de este tiempo se agregó 1 mL de medio DMEM con 10% de Suero Fetal Bovino (BioWest Therapeutics Inc. Nuaille, France) suplementado con 100 U.I./mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina quedando un 1% de esta solución en el medio, luego se incubaron durante 3 días a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasados los 3 días los anillos aórticos se observaron en el microscopio Leica MC120 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Wetzlar, Germany) y sólo fueron seleccionadas para su estímulo aquellos anillos donde se observara un crecimiento notable de células en su periferia, en este momento se llevó a cabo el estímulo de los compuestos disueltos en 500µL de medio DMEM con 100 U.I./mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina a una concentración de 25µM, los controles negativos sólo se les agregaron 500µL de medio DMEM con 100 U.I./mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y con mitomicina C (Sigma, St. Louis MO, USA) a 3.5 µg/mL se usaron VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 25ng/ml [45] (Sigma, St. Louis , USA), EGF (Epidermal Growth Factor) 10ng/mL (Thermo Fisher, Waltham, MA USA ) [46] y Vitamina D 1x10<sup>-7</sup> molar (Sigma, St. Louis , USA) [47] como controles positivos. Todos los experimentos se realizaron

por duplicado utilizando los estímulos y fueron fotodocumentados con el microscopio Leica MC120 en los días 0 y 2 de cultivo. Los resultados se reportaron como % de área de crecimiento usando las imágenes obtenidas anteriormente y con la ayuda del software ImageJ 1.52a (Wayne Rasband NIH, USA), el programa reporta el área de la imagen seleccionada en cantidad de pixeles, donde se realizaron 2 mediciones en la primer medición del día 0, la primera sobre el área del anillo aórtico (AA) y la segunda sobre su crecimiento celular adyacente total del día 0(AT), en el día 2 post-estimulo sólo se realizó la medición del crecimiento celular adyacente total del día 2 (AT2). De los 3 datos obtenidos se usó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje angiogénesis como se reporta en la referencia [48]:

$$\% \text{ Angiogénesis} = \frac{(AT2 - AT)}{AA} * 100$$

### **Análisis estadístico**

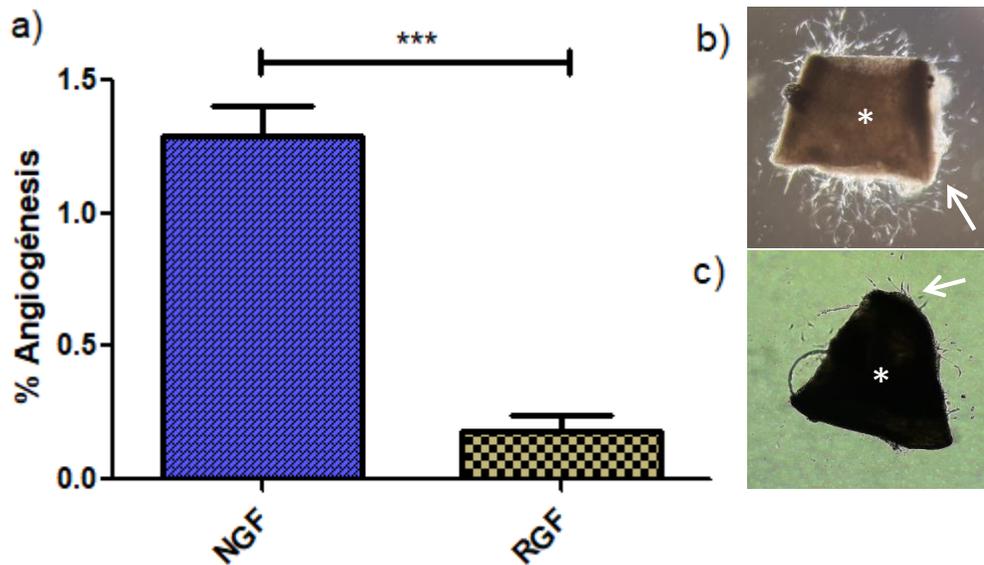
Se determinó la normalidad y homocedasticidad de la prueba de Shapiro-Wilk. Para evaluar las diferencias entre los grupos, se realizó ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Tukey y para los datos no paramétricos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas una  $p < 0.05$ . El análisis se realizó con el programa GraphPad Prism version 6 (San diego, California USA).

## **7.- Resultados**

### **Estandarización del ensayo de angiogénesis en aortas de ratón**

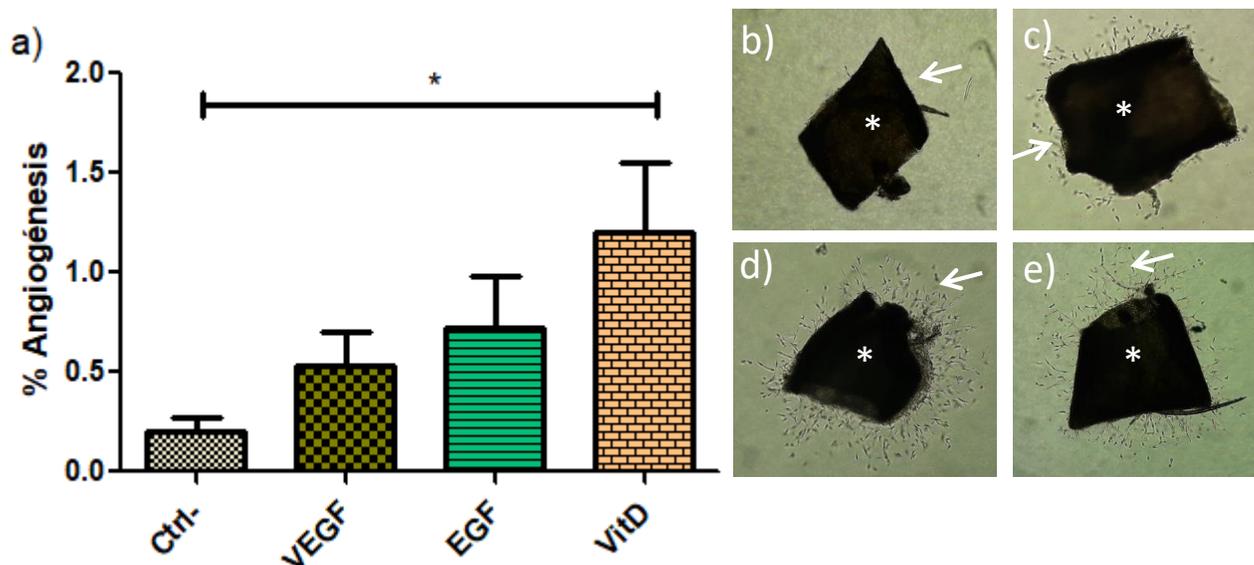
Con el fin de establecer si los compuestos que iban a ser seleccionados a través de bioinformática tenían actividad angiogénica, se decidió estandarizar un modelo en el

cual se pudiera evaluar la angiogénesis. El ensayo de anillos aórticos de ratón es uno de los modelos de angiogénesis más sencillos y rápidos de realizar, sin embargo se ha documentado que la angiogénesis observada puede deberse al daño mecánico ocasionado por los cortes al endotelio y por las condiciones de la matriz donde se realiza, es por esto que se probaron 2 matrices comerciales, la matriz *Corning Matrigel Basement Membrane* y la matriz *Corning Matrigel Growth Factor Reduced* la cual tiene una cantidad reducida en factores de crecimiento, esto para que la proliferación resultante de los anillos aórticos sea principalmente por el efecto del estímulo y no por los componentes de la matriz. En la **figura 1** se compararon estas 2 matrices para observar la diferencia en el porcentaje de angiogénesis, la figura 1a muestra que las aortas embebidas en la matriz con factores de crecimiento o (NFG) presentaron una mayor área de crecimiento en comparación con aquellas que estaban embebidas en la matriz con factores de crecimiento reducido (RGF), en la **figura 1b** se muestra una aorta (\*) con la matriz NFG y en la **figura 1c** una con la matriz RFG, se puede observar un mayor crecimiento de células en su periferia (flecha).



**Figura 1.- Porcentaje de angiogénesis de anillos aórticos de ratón en diferentes matrices.** En el panel a) se muestra el porcentaje de angiogénesis en aortas sobre matriz *Corning Matrigel Basement Membrane* (NGF) y con factores de crecimiento reducidos (RGF). El panel b) el anillo aórtico (\*) con matriz NGF con crecimiento de células endoteliales (flecha). Mientras que el panel c) muestra el anillo aórtico (\*) con matriz RGF con crecimiento de células endoteliales (flecha). \*\*\*  $p < 0.001$ , con una  $n=4$ . Las microfotografías son representativas de 4 ensayos independientes. Las microfotografías fueron tomadas con un aumento de 50X, se utilizó una prueba t-Student para comparar grupos mostrando en la gráfica la media y la  $\pm$ DE

Al observar que los factores presentes en la matriz influyen en el crecimiento de la aorta, se quiso descartar la idea de que los controles positivos se vieran afectados de igual manera en la matriz con factores de crecimiento reducido, por lo que se usaron concentraciones reportadas en este modelo de VEGF y EGF, además de la vitamina D3 la cual ha demostrado activar vías de señalización asociadas a angiogénesis (**figura 2**). En la **figura 2a** se observó que sólo el tratamiento con vitamina D a una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M tuvo diferencias con respecto al control (**figura 2b**), interesantemente, el tratamiento con EGF (**figura 2d**) en todos los ensayos mostraba crecimiento en su periferia, pero los tratamientos con vitamina mostraron una mayor área de proliferación como se observa en la **figura 2e**. No se observó crecimiento significativo en las aortas tratadas con VEGF (**figura 2c**).



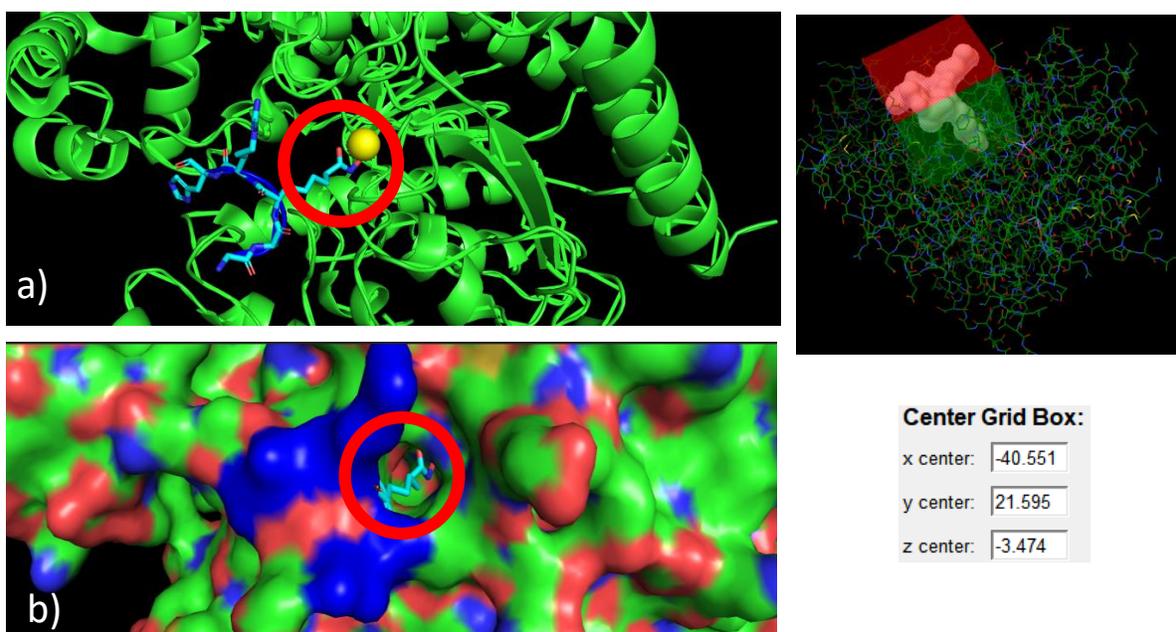
**Figura 2.- Porcentaje de angiogenesis en los controles positivos.** El panel a) muestra los 3 controles positivos, vitamina D, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF). b) control negativo, c) VEGF 25ng/mL, d) EGF 10ng/mL e) Vitamina D3  $1 \times 10^{-7}$  molar, \*  $p < 0.05$  y una  $n=3$ . Los asteriscos (\*) muestran el anillo aortico y las flechas el crecimiento celular. Las microfotografías son representativas de 3 ensayos independientes. Las microfotografías fueron tomadas con un aumento de 50X, se realizó una prueba ANOVA de 1 vía con un post-test de Dunnett graficando la media  $\pm$  DE.

Se seleccionó a la vitamina D como control positivo ya que tanto las concentraciones de VEGF y EGF no mostraron diferencias significativas que aunque en las **figuras 2d** y **2e** se puede apreciar a simple vista el aumento de células adyacentes de la aorta, aquellos estímulos con vitamina D mostraron una expansión más lejos del anillo aortico.

### Docking de la base de datos Zinc15

La estructura que se tomó de la base de datos de proteínas (PDB) se usó para obtener la posición del sitio activo así poder calcular las coordenadas donde se realizará el *docking* con las moléculas de la base de datos ZINC15. En la **figura 3a** se observa como el compuesto inositol-6-fosfato encerrado en el círculo rojo se encuentra en el centro catalítico de la enzima, la representación fluida de la enzima y el inhibidor en la **figura 3b** se puede observar como el inositol-6-fosfato se encuentra en el bolsillo de

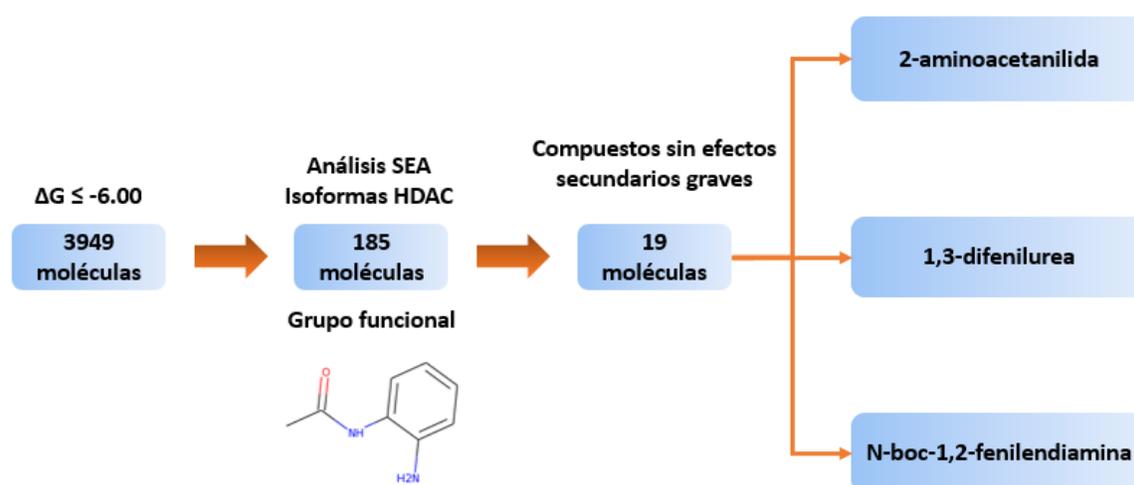
la enzima, bloqueando el Zinc<sup>2+</sup> que se encuentra en su interior necesario para el proceso de deacetilación por parte de la HDAC. Las coordenadas obtenidas del compuesto se reportan en la **figura 3c** donde el compuesto está encerrado por la caja cuadrículada.



**Figura 3.- Estructura de la HDAC junto al inhibidor inositol-6-fosfato.** a) Estructura laminar de la HDAC (verde) junto al inhibidor inositol-6-fosfato (azul), el círculo rojo muestra la interacción del inositol-6-fosfato con el Zinc<sup>2+</sup> de la enzima (amarillo) lo que causa la inhibición de esta, b) Para una mejor representación se le da superficie a la HDAC mostrando en el círculo rojo el bolsillo de la enzima, en este bolsillo ocurre el proceso de deacetilación. c) Selección de las coordenadas mediante el uso de una caja cuadrículada, la caja contiene al inositol-6-fosfato.

Usando estas coordenadas se realizó el acoplamiento con todas las moléculas aprobadas por la FDA que se encontraban en la base de datos, el filtrado de las moléculas se muestra representado con un esquema en la **figura 4**. De todas las

moléculas se seleccionaron 3 de ellas con base a los últimos criterios y por poseer el grupo funcional fenilendiamínico asemejándose más al entinostat. Los 3 compuestos seleccionados tuvieron una alta afinidad contra la isoforma 1 de la HDAC con el *docking*, además de que se reportó actividad contra las isoformas 2 y 3 de la enzima en el análisis rápido de similitud SEA, las moléculas seleccionadas 2-aminoacetanilida, 1,3-difenilurea y N-boc-1,2-fenilendiamina se probaron a la concentración indicada para compuestos fenilendiaminicos reportados por Ottoson y colaboradores en el 2016.

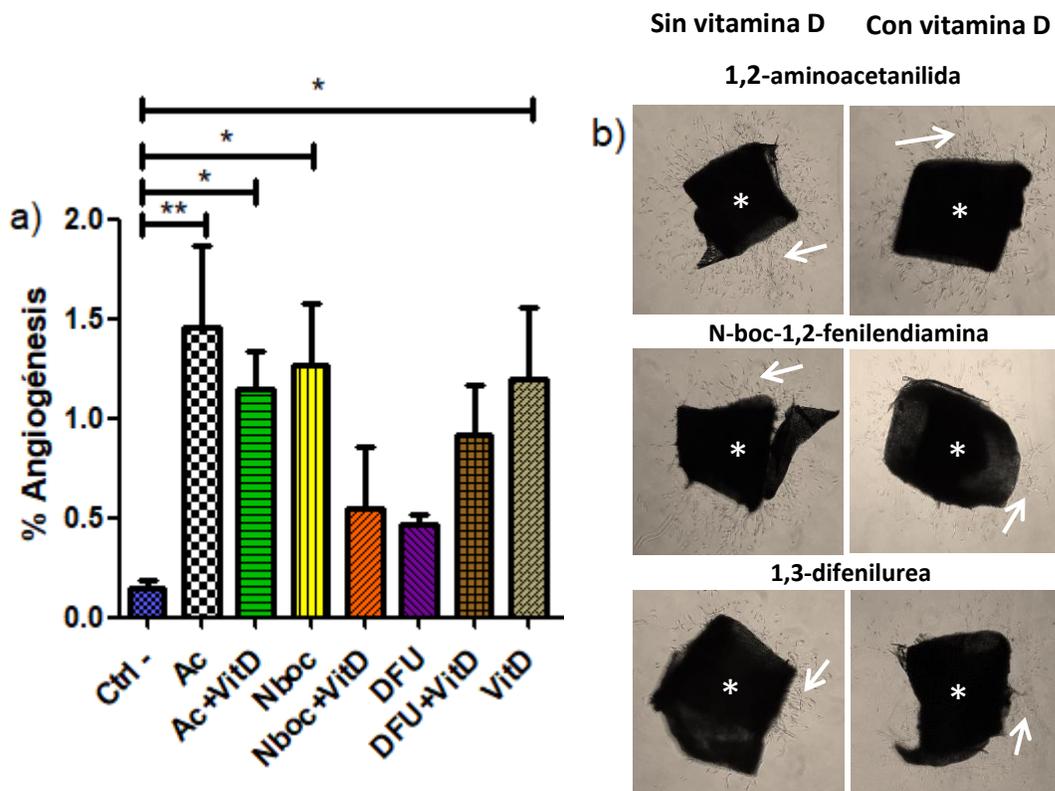


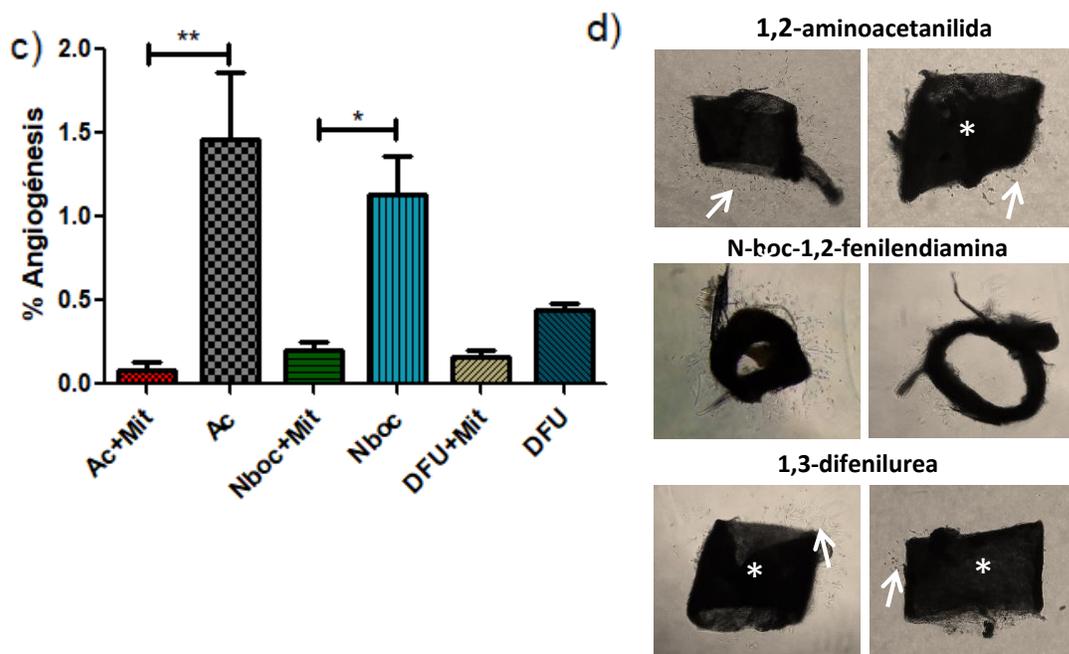
**Figura 4.- Docking y filtrado de moléculas candidato encontradas en ZINC15.** De un total de 3949 moléculas sólo 185 tuvieron una fuerza de unión estable con la HDAC de las cuales 19 presentaron el grupo funcional deseado y sólo 3 de ellos contaron con información suficiente sobre sus efectos secundarios.

### Angiogénesis en anillos aórticos de ratón con inhibidores de histonas deacetilasa

Los compuestos obtenidos se probaron a una concentración de  $25\mu\text{M}$ , concentración reportada anteriormente en compuestos con el grupo funcional fenilendiamínico y se utilizaron para tratar las aortas y verificar si estos podían incrementar la angiogénesis por si solos y en sinergia con el control positivo, vitamina D. Interesantemente, la mayoría de estos compuestos incrementó el porcentaje de angiogénesis de forma

significativa tal y como se muestra en la **figura 5**, las aortas tratadas con los compuestos 1,2-aminoacetanilida y N-boc-1,2-fenilendiamina representados en la **figura 5a** tuvieron un mayor porcentaje de angiogénesis, aun mayor que el tratamiento en conjunto con el control positivo, la diferencia se puede observar en la figura 5b, donde se aprecia la disminución del área de crecimiento, efecto que quizá no era producto de una proliferación si no de un efecto de migración celular por parte de las células que se encontraban en el anillo aórtico por lo que se utilizó el inhibidor de proliferación celular mitomicina C en conjunto con el inhibidor que más incremento el área de proliferación.





**Figura 5.- Efecto angiogénico de inhibidores de histona deacetilasa.** a) Porcentaje de angiogénesis de aortas tratadas con los inhibidores de histona deacetilasa todos a una concentración de  $25\mu\text{M}$  b) Anillos aórticos (\*) con el tratamiento de vitamina D (VitD) y sin vitamina D. c) Porcentaje de angiogénesis de aortas tratadas con 1,2-aminoacetanilida  $25\mu\text{M}$  y el inhibidor de proliferación celular mitomicina C a  $3.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (Mit). d) Anillos aórticos tratadas en presencia y en ausencia de mitomicina C. \*  $p<0.05$  y \*\*  $p<0.01$ . Las microfotografías son representativas de 3 ensayos independientes. Las microfotografías fueron tomadas con un aumento de 50X, se realizó una prueba ANOVA de 1 vía con un post-test de Dunnett graficando la media y la DE.

Tal y como se observa en la **figura 5c** se puede concluir que no incrementan la migración, si no que activan mecanismos de división celular en los anillos aórticos de ratón, en la **figura 5d** se puede observar en anillo aórtico (\*) y pocas células que migraron fuera de la aorta (flecha) pero al no poder proliferar no aumenta el área de angiogénesis, al contrario, en la **figura 5e** el tratamiento con 1,2-aminoacetanilida mostró una mayor cantidad de células en los anillos aórticos.

## 9.- Discusión

La *diabetes mellitus* (DM) es un problema de salud pública importante, el cual tiene repercusiones tanto en la persona que los padece como en los recursos sanitarios de las instituciones de salud. Las úlceras diabéticas son una de las principales complicaciones de la DM2, las cuales están caracterizadas por angiopatía, pobre cicatrización y neuropatía. La angiopatía dificulta el cierre de la ulceración volviendo el entorno de la herida isquémico, no cicatrizante y susceptible a infecciones, actualmente se ha tratado de resolver este problema con tratamientos para aumentar la circulación sanguínea en el pie, sin embargo, la mayoría pueden ser invasivos o caros como por ejemplo el procedimiento quirúrgico de re-vascularización, factores de crecimiento o el plasma rico en plaquetas, no obstante ninguno de estos tratamientos han mostrado ser eficaces [16, 49]. Uno de los mecanismos poco estudiados y uno de los más importantes para la angiogénesis son los mecanismos inducidos por hipoxia celular, los cuales generalmente activan el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , el cual en diabéticos se encuentra disminuido y poco funcional [50], por lo que el restablecimiento de esta vía se puede ser usada como blanco terapéutico en el tratamiento del pie diabético [47]. Se ha reportado que los inhibidores de histonas deacetilasas (iHDAC) con un grupo fenilendiaminico pueden ser potentes inductores de HIF-1 $\alpha$  y desencadenar la expresión de genes relacionados con angiogénesis y producción de moléculas antimicrobianas y cicatrizantes [51-53]. El problema de usar estos inhibidores son los diversos efectos adversos que pudiesen tener sobre el paciente, además de ser económicamente no viables para su uso en úlceras de pie diabético o cualquier herida crónica, por lo tanto, se recientemente la investigación se ha enfocado en la búsqueda de iHDAC no nocivos para su uso como tratamientos con herramientas de modelaje y ensamblaje molecular, con el fin identificar compuestos eficaces, seguros y con más información sobre sus efectos adversos.

Los modelos experimentales usados para medir la angiogénesis son diversos, como la formación de túbulos de células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC), el cual tiende a ser caro por ser una línea celular primaria y tardado por el tiempo que conlleva todo el proceso de cultivo celular, el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM), el cual es uno de los más baratos pero también uno de los menos precisos, ya que al ser el ensayo directamente al embrión de pollo es difícil distinguir una angiogénesis normal o inducida por los diversos factores que se encuentran en el mismo sistema. El ensayo elegido en el presente estudio fue el de anillos aórticos de ratón el cual tiene como ventajas ser barato, además se puede conseguir un alto número de anillos aórticos por animal, permitiendo ver la respuesta a diferentes tratamientos en un solo ratón [48, 54, 55]. Al realizar el ensayo se observó que se tienen 2 principales complicaciones, el tipo de matriz que se utiliza y la forma en que se mide el crecimiento de células alrededor de la aorta ya que puede ser por el número de brotes que salen directamente del anillo aórtico así como el área de crecimiento de las células que salen de estos anillos. Se probaron 2 tipos comerciales de Matrigel, el *Corning Matrigel Matrix* (NGF) y el *Growth Factor Reduced* (RGF), la diferencia que se tiene entre ellos es la cantidad de factores de crecimiento que posee la matriz, siendo la matriz NGF usada mayormente para ensayos de anti-angiogénesis ya que promueve el crecimiento de endotelio vascular significativo sin la necesidad de agregar un estímulo, a diferencia de la matriz RGF la cual necesita de un estímulo para que se observe el crecimiento de células endoteliales [45, 46].

El uso de la matriz RGF se hizo con el fin de observar un efecto angiogénico producido directamente por la acción del estímulo en este caso nuestros fármacos, interesantemente la elección del control positivo coincidió en los controles reportados en este modelo y los principales factores angiogénicos reducidos en la matriz. La elección de la vitamina D se hizo con base a los datos publicados por Trujillo *et. al*, donde se propone el uso del calcitriol para el tratamiento de úlceras de pie diabético ya que es capaz de inducir moléculas angiogénicas como VEGF [47]. En nuestros resultados observamos que el VEGF recombinante no funcionó como esperábamos y

que las células que salían de la aorta no se conectaban entre sí, un fenómeno conocido como regresión vascular, donde la falta de nutrientes como el suero en los primeros días de crecimiento ocasiona que las células pierdan las uniones entre ellas y no se llegue a una estabilización vascular para formar el vaso sanguíneo[56]. Esto podría sugerir que el VEGF no se encontraba a una concentración adecuada en este modelo ya que, en los estudios revisados, la matriz no era una matriz RGF. Otro dato interesante fue en el comportamiento de los otros controles positivos, vitamina D y EGF, ambos mostraron un crecimiento de células endoteliales, aunque aquellos anillos aórticos tratados con vitamina D proliferaban más que aquellos tratados con EGF, con esto observamos que el método de medición también influye en este ensayo ya que de usar el método por número de brotes se abrían obtenido diferentes resultados, a comparación del método del área por pixeles, aunque se eligió este por la diversidad en la posición de los cortes usados en los ensayos ya que de usar el primer método con aortas colocadas en posición transversal no se observaría la mayoría de los brotes que salen de la aorta [46, 57].

El reposicionamiento molecular resulta ser una herramienta bastante útil ya que nos permite encontrar un fármaco aprobado por la FDA y usarlo como tratamiento para otro tipo de enfermedad que no sea a la que estaba destinado. En el presente estudio, resulta controversial utilizar como prototipos moléculas anti-tumorales como las iHDAC como una alternativa a la falta de angiogénesis en pie diabético, aunque existen diversos reportes que hablan de que la concentración de estos influyen en el efecto que puedan tener sobre la célula, ya que a altas y bajas concentraciones pueden tener efectos totalmente opuestos, pueden ese contexto puede ayudar a la formación de túbulos en células endoteliales aórticas bovinas o a la reparación y mantenimiento del intestino en modelos de conejos [33, 58, 59], este efecto benéfico se ha observado mayormente en células sin alteraciones genéticas como las que tienen las células tumorales. Se logró reposicionar fármacos aprobados por la FDA gracias a las coordenadas proporcionadas por el acoplamiento entre las moléculas y la HDAC donde se observó mediante modelaje 3D la interacción que hay entre estos

compuestos y el bolsillo de deacetilación de la enzima, donde se puede apreciar 2 formas eficaces de inhibir a las HDAC, la primera es mediante la quelación de Zinc<sup>2+</sup> mediante la unión con grupos amino y la segunda bloqueando el canal para evitar que los grupos acetilo interaccionen con el Zinc<sup>2+</sup>, este segundo puede ser bloqueado con facilidad por ácidos grasos de cadena corta como el butirato o el ácido valpróico, es por esto que los iHDAC más eficaces son aquellos que poseen un grupo fenilendiaminico para la quelación del Zinc<sup>2+</sup> y una cadena de carbonos para bloquear el canal de deacetilación [37, 60].

A pesar de que se obtuvo un número considerable de candidatos con el grupo funcional deseado, la mayoría eran anti-cancerígenos derivados de la molécula líder entinostat y fármacos discontinuados o restringidos por la FDA, es por esto que la selección de moléculas candidato se redujo a 3 moléculas, la 2-aminoacetanilida la cual es una molécula nitrada de la acetanilida, fármaco usado como analgésico que aunque fue cambiado por su metabolito menos tóxico, el acetaminofén, se ha demostrado que tiene actividad sobre HDAC [61]. El segundo, N-boc-1,2-fenilendiamina es utilizado para la síntesis de antifúngicos como miconazol, aunque también se ha observado que posee propiedades anti-inflamatorias [62]. El último compuesto seleccionado, 1,3-difenilurea es una citoquinina que sirve como hormona en plantas el cual se puede extraer de la leche de coco, la 1,3-difenilurea se ha propuesto como un agente antituberculoso por su actividad contra la enzima epóxido hidrolasa del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* [63-65].

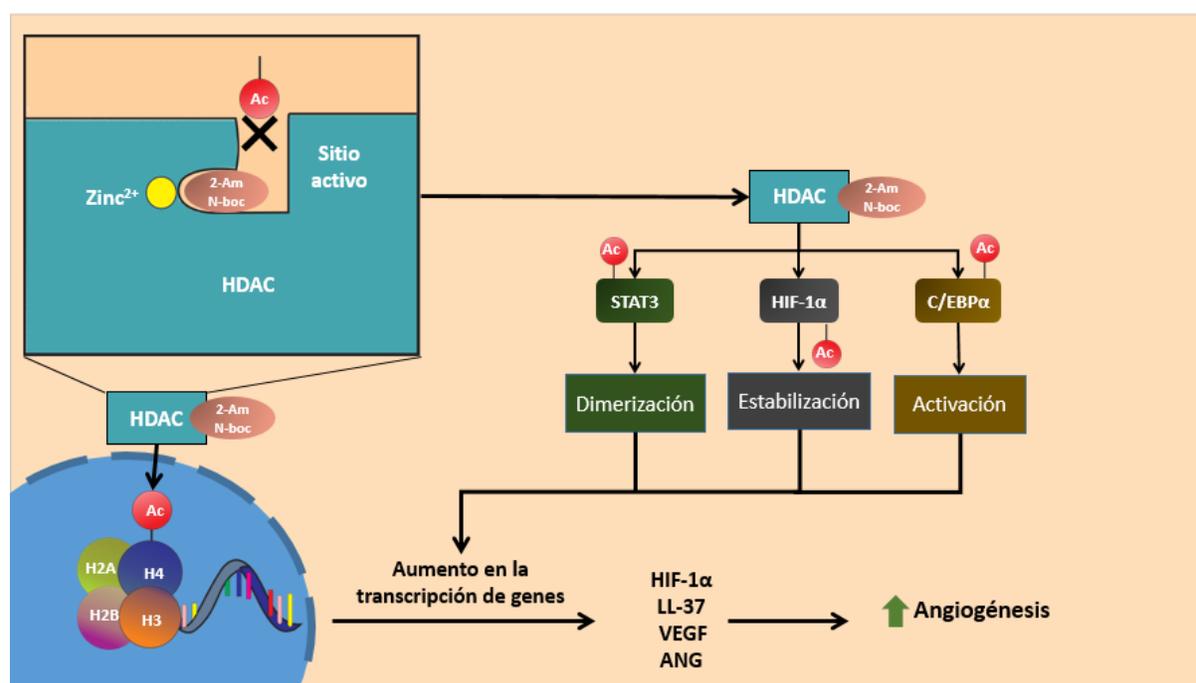
De los 3 compuestos probados en las aortas de ratón, sólo dos de ellos incrementaron la angiogénesis, el compuesto 1,2-aminoacetanilida y N-boc-1,2-fenilendiamina, esto se deba quizá a la solubilidad que tienen estas moléculas, al presentar bajos coeficientes de partición y ser hidrosolubles les es más sencillo asociarse a las proteínas de la matriz ya solidificado, se ha observado que mientras más lipofílico sea un compuesto afecta su permeabilización a través de la matriz ya solidificada, esto puede solucionarse diluyendo el Matrigel con el compuesto antes de que esta se solidifique [66], esto explicaría porque el compuesto 1,3-difenilurea no tuvo el mismo

efecto que los otros dos. Otro resultado interesante es en la acción conjunta del control positivo con la de los iHDAC seleccionados, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en donde se esperaba un efecto de sinergismo por parte de los dos estímulos, pero no se observó un aumento de la angiogénesis en comparación con el tratamiento sólo con el iHDAC. Esto puede ser por las diferentes vías de señalización que tienen los inhibidores y la vitamina D en cuanto a la estimulación de la angiogénesis ya que si se observa un sinergismo porque ambos comparten la vía para expresar péptidos antimicrobianos [35, 67]. STAT3 es uno de los factores de transcripción claves para la transformación de una célula normal a una cancerígena y se ha observado que la vitamina D tiene la capacidad de disminuir la proliferación de líneas celulares cancerígenas de pulmón, donde recientemente se demostró que inhibe la migración de estas células y la proliferación bloqueando las vías de STAT3 y  $\beta$ -catenina además de regular la señalización de HIF-1 $\alpha$  [68-70]. Para estar seguros de que el efecto de las moléculas candidato desencadenan la proliferación en el endotelio vascular de los anillos aórticos, se utilizó el inhibidor de la mitosis como la mitomicina C, demostrando que estos inducen la proliferación de las células endoteliales y el efecto no está relacionado con la inducción de migración de las células endoteliales [71].

Los resultados de este estudio proponen que la inducción en la proliferación del endotelio vascular es dependiente de la inhibición de las HDAC y la interacción que tiene esta inhibición con otras proteínas, ya que estas enzimas no sólo tienen actividad contra los grupos acetilo de las histonas, también con los factores de transcripción involucrados con procesos angiogénicos como HIF-1 $\alpha$ , este se estabiliza en citoplasma cuando se acetila la lisina tirosina 709 la cual está ligada a la actividad de las HDAC, o con el factor de transcripción C/EBP $\alpha$  el cual la acetilación de este aumenta su actividad y se ha demostrado que su expresión se aumenta en presencia de un iHDAC [72, 73]. Aunque no se ha asociado una respuesta angiogénica directa al factor C/EBP $\alpha$ , este tiene la capacidad junto a HIF-1 $\alpha$  de aumentar la expresión del péptido LL-37 el cual posee una alta actividad angiogénica, un ejemplo de la

desregulación de este péptido es en el cáncer de pulmón ayuda al crecimiento del tumor activando la proliferación de este mediante receptores de crecimiento epidérmico (EGFR) [74, 75]. Es importante mencionar que fisiológicamente las úlceras de pie diabético están en un microambiente hipóxico lo que da lugar a la transcripción de genes distintos a aquellos vistos en normoxia, de hecho estudios anteriores por nuestro grupo ha demostrado que mientras que algunos péptidos inducen cicatrización en normoxia no inducen la expresión de genes relacionados con cicatrización en hipoxia [47], por lo que sería importante reproducir los resultados del presente estudio en un ambiente hipóxico.

En conjunto, se sugiere que las siguientes vías de señalización están involucradas por las moléculas propuestas en este estudio al inducir la angiogénesis (**figura 6**).



**Figura 6.- Mecanismo de acción propuesto de 2-aminoacetanilida y N-boc-1,2 fenilendiamina para la inducción de angiogénesis.** Los compuestos 2-aminoacetanilida (2-Am) y N-boc-1,2-fenilendiamina (N-boc) propuestas se unen al Zinc<sup>2+</sup> del sitio activo de la enzima mediante su grupo fenilendiaminico, inhibiendo la deacetilación de histonas, relajando el DNA para aumentar la transcripción de genes en respuesta a los factores de transcripción que son regulados por las histonas deacetilasas como STAT3, HIF-1α y C/EBPα.

## 10.- Conclusión

Los compuestos que fueron elegidos candidatos a ser inhibidores de histona deacetilasa 1,2-aminoacetanilida y N-Boc-1,2-fenilendiamina inducen angiogénesis en el modelo de anillos aórticos de ratón a una concentración de 25µM.

## 11.- Referencias

1. Federation, I.D., *IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels.* 2019.
2. DeFronzo, R.A., et al., *Type 2 diabetes mellitus.* Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15019.
3. Leto, D. and A.R. Saltiel, *Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(6): p. 383-96.
4. Fort, P.E., et al., *Differential roles of hyperglycemia and hypoinsulinemia in diabetes induced retinal cell death: evidence for retinal insulin resistance.* PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26498.
5. Zhang, J., et al., *PKC-Mediated Endothelin-1 Expression in Endothelial Cell Promotes Macrophage Activation in Atherogenesis.* Am J Hypertens, 2019. **32**(9): p. 880-889.
6. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17016.
7. Yan, L.-J., *Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway.* Animal models and experimental medicine, 2018. **1**(1): p. 7-13.
8. Volpe, C.M.O., et al., *Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications.* Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 119.
9. Koye, D.N., et al., *The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease.* Adv Chronic Kidney Dis, 2018. **25**(2): p. 121-132.
10. Davies, M., et al., *The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1518-22.
11. Thiruvoipati, T., C.E. Kielhorn, and E.J. Armstrong, *Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes.* World J Diabetes, 2015. **6**(7): p. 961-9.
12. Armstrong, D.G., A.J.M. Boulton, and S.A. Bus, *Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence.* N Engl J Med, 2017. **376**(24): p. 2367-2375.
13. Monteiro-Soares, M., et al., *Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review.* Diabetes Metab Res Rev, 2012. **28**(7): p. 574-600.
14. Kenny, G.P., R.J. Sigal, and R. McGinn, *Body temperature regulation in diabetes.* Temperature (Austin), 2016. **3**(1): p. 119-45.
15. Prompers, L., et al., *Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study.* Diabetologia, 2008. **51**(5): p. 747-55.

16. Montiel-Jarquín, Á.J., et al., *Costes directos de atención médica del pie diabético en el segundo nivel de atención médica*. Revista chilena de cirugía, 2017. **69**: p. 118-123.
17. Armstrong, D.G. and J.L. Mills, *Toward a change in syntax in diabetic foot care: prevention equals remission*. J Am Podiatr Med Assoc, 2013. **103**(2): p. 161-2.
18. Cervantes-García, E. and P.M. Salazar-Schettino, *Clinical and surgical characteristics of infected diabetic foot ulcers in a tertiary hospital of Mexico*. Diabetic foot & ankle, 2017. **8**(1): p. 1367210-1367210.
19. Dunyach-Remy, C., et al., *Staphylococcus aureus Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis*. Toxins (Basel), 2016. **8**(7).
20. Lavery, L.A., et al., *Diabetic foot syndrome: evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort*. Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1435-8.
21. Taha, O.A., et al., *Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for Klebsiella pneumoniae Isolated From Diabetic Foot Patients*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2127.
22. Alavi, S., et al., *Bacteriologic study of diabetic foot ulcer*. Pakistan Journal of Medical Sciences, 2007. **23**: p. 681-684.
23. Perez-Favila, A., et al., *Current Therapeutic Strategies in Diabetic Foot Ulcers*. Medicina (Kaunas, Lithuania), 2019. **55**(11): p. 714.
24. Beltrán B., C., et al., *Tratamiento de la infección en el pie diabético*. Revista chilena de infectología, 2001. **18**: p. 212-224.
25. Rebolledo, F., J. Teran Soto, and J. Escobedo, *The Pathogenesis of the Diabetic Foot Ulcer: Prevention and Management*. 2011.
26. Lespada, M.I., et al., *Bacteremia caused by Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing K. pneumoniae. A retrospective study of 7 years*. Revista Española de Quimioterapia, 2019. **32**(1): p. 15-21.
27. Quiroga, C., M. Nastro, and J. Di Conza, *Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America*. Rev Argent Microbiol, 2019. **51**(1): p. 93-100.
28. Soares, M.O., et al., *Cost effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers*. BMJ, 2009. **338**: p. b825.
29. Redekop, W.K., et al., *The cost effectiveness of Apligraf treatment of diabetic foot ulcers*. Pharmacoeconomics, 2003. **21**(16): p. 1171-83.
30. Hadden, M.J. and A. Advani, *Histone Deacetylase Inhibitors and Diabetic Kidney Disease*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
31. Hancock, W.W., et al., *HDAC inhibitor therapy in autoimmunity and transplantation*. Ann Rheum Dis, 2012. **71 Suppl 2**: p. i46-54.
32. Milazzo, G., et al., *Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability*. Genes, 2020. **11**(5): p. 556.
33. Ottosson, H., et al., *Potent Inducers of Endogenous Antimicrobial Peptides for Host Directed Therapy of Infections*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36692.
34. Lee, H., A.J. Jeong, and S.-K. Ye, *Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy*. BMB reports, 2019. **52**(7): p. 415-423.
35. Miraglia, E., et al., *Entinostat up-regulates the CAMP gene encoding LL-37 via activation of STAT3 and HIF-1 $\alpha$  transcription factors*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 33274-33274.
36. Schauber, J., et al., *Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways*. Gut, 2003. **52**(5): p. 735-741.

37. Schaubert, J., et al., *Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(4): p. 816-24.
38. Liu, P.T., et al., *Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on the Induction of Cathelicidin*. *The Journal of Immunology*, 2007. **179**(4): p. 2060.
39. Yang, X., et al., *Chitosan hydrogel encapsulated with LL-37 peptide promotes deep tissue injury healing in a mouse model*. *Military Medical Research*, 2020. **7**(1): p. 20.
40. Dodd, M.S., et al., *Fatty Acids Prevent Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Signaling Through Decreased Succinate in Diabetes*. *JACC: Basic to Translational Science*, 2018. **3**(4): p. 485.
41. Gonzalez-Curiel, I., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 induces LL-37 and HBD-2 production in keratinocytes from diabetic foot ulcers promoting wound healing: an in vitro model*. *PloS one*, 2014. **9**(10): p. e111355-e111355.
42. Rivas-Santiago, B., et al., *Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer*. *J Dermatol Sci*, 2012. **65**(1): p. 19-26.
43. Huang, S.-Y. and X. Zou, *Advances and challenges in protein-ligand docking*. *International journal of molecular sciences*, 2010. **11**(8): p. 3016-3034.
44. Devy, L., et al., *The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent*. *Faseb j*, 2002. **16**(2): p. 147-54.
45. Béliveau, R., et al., *The Antiangiogenic Agent Neovastat ( $\mathcal{A}$ -941) Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Biological Effects*. *Clinical Cancer Research*, 2002. **8**(4): p. 1242.
46. Buharalioğlu, C., et al., *Angiotensin II-induced process of angiogenesis is mediated by spleen tyrosine kinase via VEGF receptor-1 phosphorylation*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2011. **301**: p. H1043-55.
47. Trujillo, V., et al., *Calcitriol promotes proangiogenic molecules in keratinocytes in a diabetic foot ulcer model*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017. **174**: p. 303-311.
48. Rodero, M.P., et al., *Control of both myeloid cell infiltration and angiogenesis by CCR1 promotes liver cancer metastasis development in mice*. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2013. **15**(6): p. 641-648.
49. Hsu, C.-C., et al., *Depression and the Risk of Peptic Ulcer Disease: A Nationwide Population-Based Study*. *Medicine*, 2015. **94**(51): p. e2333-e2333.
50. Pichu, S., et al., *Impact of the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) pro582ser polymorphism and its gene expression on diabetic foot ulcers*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015. **109**(3): p. 533-40.
51. Shi, Y.-H. and W.-G. Fang, *Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis*. *World journal of gastroenterology*, 2004. **10**(8): p. 1082-1087.
52. Fan, D., et al., *Activation of HIF-1 $\alpha$  and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization*. *Nat Med*, 2015. **21**(7): p. 808-14.
53. Heun, Y., et al., *HIF-1 $\alpha$  Dependent Wound Healing Angiogenesis In Vivo Can Be Controlled by Site-Specific Lentiviral Magnetic Targeting of SHP-2*. *Mol Ther*, 2017. **25**(7): p. 1616-1627.
54. Stryker, Z.I., et al., *Evaluation of Angiogenesis Assays*. *Biomedicines*, 2019. **7**(2).
55. Tamanoi, F., *Chapter One - Recent excitements in the study of the CAM assay*, in *The Enzymes*, F. Tamanoi, Editor. 2019, Academic Press. p. 1-9.
56. Korn, C. and H.G. Augustin, *Mechanisms of Vessel Pruning and Regression*. *Dev Cell*, 2015. **34**(1): p. 5-17.

57. Laschke, M.W., et al., *Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **85A**(2): p. 397-407.
58. Marks, P.A., V.M. Richon, and R.A. Rifkind, *Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2000. **92**(15): p. 1210-1216.
59. Liu, D., et al., *Low Concentration of Sodium Butyrate from Ultrabraid+NaBu suture, Promotes Angiogenesis and Tissue Remodelling in Tendon-bones Injury*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 34649.
60. Krämer, O.H., et al., *The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2*. The EMBO journal, 2003. **22**(13): p. 3411-3420.
61. Mukhtar, Y.M., et al., *Acetanilide and bromoacetyl-lysine derivatives as activators for human histone deacetylase 8*. Bioorg Med Chem Lett, 2017. **27**(11): p. 2319-2323.
62. Bhookya, S., et al., *Synthesis of tert-butyl (substituted benzamido)phenylcarbamate derivatives: anti-inflammatory activity and docking studies*. Journal of Chemical Biology, 2017. **10**(3): p. 105-115.
63. Brown, J.R., et al., *The structure-activity relationship of urea derivatives as anti-tuberculosis agents*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(18): p. 5585-95.
64. Shen, W., et al., *Synthesis and structure-activity relationship of acylthiourea derivatives as inhibitors of microsomal epoxide hydrolase*. Medicinal Chemistry Research, 2012. **21**(12): p. 4214-4218.
65. Kim, S., et al., *PubChem 2019 update: improved access to chemical data*. Nucleic Acids Research, 2018. **47**(D1): p. D1102-D1109.
66. Zhang, Y., et al., *Quantitative characterization of binding of small molecules to extracellular matrix*. Journal of biochemical and biophysical methods, 2006. **67**(2-3): p. 107-122.
67. Ottosson, H., et al., *Potent Inducers of Endogenous Antimicrobial Peptides for Host Directed Therapy of Infections*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36692.
68. Xu, S., et al., *Calcitriol inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma cells by suppressing Smad2/3-, STAT3- and  $\beta$ -catenin-mediated epithelial-mesenchymal transition*. 2020. **111**(1): p. 59-71.
69. Bernardi, R.J., et al., *Antiproliferative Effects of  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 and Vitamin D Analogs on Tumor-Derived Endothelial Cells*. Endocrinology, 2002. **143**(7): p. 2508-2514.
70. So, J.Y., et al., *Targeting CD44-STAT3 signaling by Gemini vitamin D analog leads to inhibition of invasion in basal-like breast cancer*. PloS one, 2013. **8**(1): p. e54020-e54020.
71. Zare, M., et al., *The effect of mitomycin-C on corneal endothelial cells after photorefractive keratectomy*. Journal of ophthalmic & vision research, 2011. **6**(1): p. 8-12.
72. Liss, A., et al., *The gene signature in CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$  dysfunctional acute myeloid leukemia predicts responsiveness to histone deacetylase inhibitors*. Haematologica, 2014. **99**(4): p. 697-705.
73. Geng, H., et al., *HIF1 $\alpha$  protein stability is increased by acetylation at lysine 709*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(42): p. 35496-35505.
74. Ji, P., et al., *Myeloid cell-derived LL-37 promotes lung cancer growth by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling*. Theranostics, 2019. **9**(8): p. 2209-2223.
75. von Haussen, J., et al., *The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells*. Lung Cancer, 2008. **59**(1): p. 12-23.

