

**Los inhibidores quinasa reducen la proteína c-Abelson fosforilada (c-abl-p)  
inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un modelo neuronal colinérgico: implicaciones en la  
Enfermedad de Alzheimer**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**(Para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas- Énfasis en  
Neurociencias)**

**Presentado por:**

**Anlly Banessa Holguín Velásquez  
Microbióloga.**

**Tutora:**

**Marlene Jiménez Del Río, MSc, DSc**

**Comité tutorial:**

**Carlos Vélez Pardo, MSc, DSc**

**Dora María Benjumea, MSc, DSc**

**Miguel Ángel Mendívil Pérez, MSc, PhD.**

**CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**MEDELLÍN**

**2022**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	7
<b>RESUMEN</b>	8
<b>PALABRAS CLAVES</b>	9
<b>ABSTRACT</b>	10
<b>KEY WORDS</b>	11
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	12
<b>LISTA DE TABLAS</b>	13

## PARTE I: MARCO TEÓRICO

### CAPÍTULO 1: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

1.1. Definición	14
1.2. Epidemiología e importancia en la salud pública	14
1.3. Manifestaciones Clínicas de la EA	15
1.4. Neurofisiopatología	16
1.4.1 Placas seniles	17
1.4.1.1. Producción del péptido A $\beta$	17
1.4.2. Ovillos neurofibrilares	17
1.4.3. Muerte neuronal	17
1.5. Etiología de la EA	18
1.5.1. Factores modificadores de la EA	18
1.5.1.1. Edad	18
1.5.1.2. Factores ambientales: metales pesados	18
1.5.2. Factores genéticos	19
1.5.2.1. Mutaciones en la Proteína Precursora Amiloide (APP)	19
1.5.2.2. Mutaciones en Presenilina 1 y 2 (PSEN-1 y 2)	20
1.5.2.3. Factor de Riesgo genotipo APOE	21
1.6. Diagnóstico	22
1.7. Tratamiento	22
1.7.1. Tratamientos convencionales	23
1.7.1.1. Anticolinesterasas	23
1.7.1.2. Antiglutámico	23

1.7.2. Otras alternativas terapéuticas	23
1.7.2.1. Inhibidores de las enzimas Beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) secretasas	23
1.7.2.2. Tratamientos Anti-Apoptóticos	24

## **CAPÍTULO 2: ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EA**

2.1. Definición de EO	25
2.2. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	25
2.3. Fuentes de EO	26
2.4. El EO y la mitocondria	28
2.5. El EO y la EA	29
2.6. EL EO, la apoptosis y la EA	29
2.6.1 Definición de apoptosis	29
2.6.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis	30
2.6.1.2. Vía intrínseca de la apoptosis	31
2.6.2 El A $\beta$ , EO y la apoptosis en la EA	32

## **CAPITULO 3: PROTEINA QUINASA ABELSON (c-Abl), EO y EA**

3.1. Definición y estructura de la c-Abl	35
3.2. Mecanismo de Acción de la c-Abl	36
3.3. Funciones de la c-Abl	37
3.4. c-Abl, EO, Apoptosis y la EA	38
3.4.1.c-Abl y el péptido A $\beta$	39
3.4.2. c-Abl y la fosforilación de la proteína TAU	40
3.4.2.1 Fosforilación Directa de TAU	40
3.4.2.2 Fosforilación Indirecta de TAU	41

## **CAPÍTULO 4: INHIBIDORES DE c-Abl COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN LA EA**

4.1. Estructura y clasificación de los inhibidores de quinasa c-Abl	43
4.1.1 Imatinib	44
4.1.2. Nilotinib	44
4.1.3. Bosutinib	45

4.1.4. Dasatinib	45
4.1.5 Ponatinib	46
4.2. Metabolismo de los inhibidores de quinasa c-Abl	48
4.3. Mecanismo de acción de los inhibidores de quinasa c-Abl	49
4.4. Inhibidores de quinasa c-Abl en la EA	50

## **PARTE II: INVESTIGACIÓN**

<b>CAPÍTULO 5: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A INVESTIGAR</b>	<b>53</b>
--	-----------

### **CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y LOS OBJETIVOS DE INVESTIGACION**

6.1. Hipótesis	55
6.2. Objetivos del proyecto	55
6.2.1. Objetivo General	55
6.2.1.1. Objetivos específicos	55

### **CAPÍTULO 7: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN**

7.1. Aislamiento, caracterización y descongelamiento de CEM de Cordón Umbilical-Gelatina de Wharton (CU-GW)	56
7.2. Prueba de transdiferenciación de CEM de CU-GW a neuronas Colinérgicas (NC)	56
7.3. Evaluación de marcadores de NC por Inmunofluorescencia	56
7.4 Evaluación de la neurotoxicidad y activación de c-Abl por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en las NC	57
7.5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por microscopía de fluorescencia	57
7.6. Evaluación de activación de c-Abl y oxidación de DJ1 por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en las NC por Inmunofluorescencia	57
7.7. Evaluación de la neurotoxicidad del nilotinib H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en las NC	57
7.8. Evaluación de las EROs intracelulares en NC	58
7.9. Ensayo de inhibición de c-Abl por los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) en NC	58

7.10. Análisis estadístico de los datos	58
---	----

## **CAPÍTULO 8: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN**

8.1. Transdiferenciación de CEM-GW en Neuronas Colinérgicas (NC)	59
8.2. Efecto tóxico del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en NC	59
8.2.1. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 µM induce alteraciones del ΔΨ <sub>m</sub> en NC	59
8.2.2 El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 µM induce la oxidación de la proteína DJ1 en NC	61
8.2.3 El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 µM induce la activación de la proteína c-Abl en NC	62
8.3. Exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a diferentes intervalos de tiempo en NC	64
8.3.1 La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a diferentes intervalos de tiempo induce alteración del ΔΨ <sub>m</sub> en NC	64
8.3.2. La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 0,5 hrs induce el valor máximo de la activación de c-Abl en NC	65
8.3.3 La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 1 hr induce el valor máximo la oxidación de DJ-1 en NC	66
8.3.4 La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 3hrs induce el valor máximo la activación de caspasa 3 en NC	67
8.4 Efecto neuroprotector de los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) en función del ΔΨ <sub>m</sub> , la activación de la proteína c- Abl, la oxidación DJ-1 y la caspasa 3 en NC	68
8.4.1 El nilotinib es inocuo a concentraciones menores o iguales a 25nM en las NC	68
8.4.2 El nilotinib mantiene el ΔΨ <sub>m</sub> , no genera EROs y regula caspasa 3 en NC	69
8.5. Los ITKs (imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib y ponatinib) protegen a las NC expuestas al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	72
8.5.1 Los ITKs restaura y mantienen el ΔΨ <sub>m</sub> contra el EO inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en NC	72
8.5.2 Los ITKs disminuye los niveles del sensor de EO, la proteína DJ-1 oxidada en NC	72
8.5.3 Los ITKs reduce los niveles de la proteína c-Abl fosforilada en NC	75

<b>CAPITULO 9. DISCUSIÓN</b>	<b>78</b>
------------------------------	-----------

<b>CAPITULO 10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	82
<b>CAPITULO 11. CONTRIBUCIONES O APORTES CIENTÍFICOS</b>	83
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	84

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores Dra. Marlene Jiménez del Rio y Dr. Carlos Vélez Pardo, por guiarme en este proceso de aprendizaje y aceptarme en el grupo de investigación, por su consejo, dirección y disponibilidad para desarrollar mi proceso académico y profesional.

Al Profesor Miguel Mendívil y Viviana Soto por sus consejos y la transmisión de su conocimiento y experiencia en la parte experimental, lo cual fue vital para la ejecución de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Dora Benjumea quienes destinaron su tiempo para guiarme a través de valiosos aportes para la ejecución de mi trabajo de investigación

A mis compañeros del grupo de Neurodegenerativas Daniel Martínez, Carolina Vélez, Nicolas Gómez, Daniela Giraldo, Laura Pérez, Cristina Yepes, por hacer este proceso mucho más alegre y ameno

A Diana Quintero, Jazmín Calvo y mi querida Catherine Quintero, por su amistad traducida en un soporte constante y el empuje para seguir adelante.

A la Profesora Eliana Restrepo por la paciencia y constante ayuda en mi proceso y a la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas

A la Universidad de Antioquia, Colciencias y al grupo de Neurociencias de Antioquia (GNA).

Y finalmente, a las maternas donantes de los cordones umbilicales.

## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo crónico caracterizado clínicamente por la pérdida de la memoria, y neuropatológicamente, por la presencia de placas del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), ovillos neurofibrilares, gliosis y pérdida neuronal principalmente de las neuronas colinérgicas. Estos fenómenos celulares y moleculares son potenciados por el estrés oxidativo (EO) que finalmente conducen a la muerte de las neuronas colinérgicas en el hipocampo. Recientemente, el EO, se ha asociado con la proteína tirosina quinasa celular Abelson (c-Abl), como molécula diana desencadenante del deterioro neuronal por daño de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular. En este contexto, se ha demostrado en modelos *in vivo*, que c-Abl se encuentra activada en neuronas expuestas al péptido  $A\beta$  y al peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), y que su señalización está asociada a EO, y a muerte neuronal. Por lo tanto, se ha propuesto a la proteína c-Abl como posible blanco terapéutico en el diseño de tratamientos para la EA. De hecho, se ha evidenciado que los inhibidores farmacológicos de c-Abl, como el nilotinib, previene el EO, las alteraciones sinápticas inducidas por  $A\beta$ , la fosforilación de TAU, la neurodegeneración y el deterioro cognitivo. Sin embargo, a pesar de estos avances hasta el presente, no se cuenta con una terapia efectiva que reduzca los síntomas y la neuropatología que presentan los pacientes con la EA. De igual forma, no se ha establecido con precisión cuál es la relación entre el EO, la proteína c-Abelson, y su regulación con los inhibidores quinasa en un modelo neuronal colinérgico en condiciones de EO.

Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos establecer un protocolo de detección de activación de la c-Abl-fosforilada (c-Abl-p) y evaluar el efecto de los inhibidores de quinasa en función de la activación de la proteína c-Abl-p y el EO inducidos por el  $H_2O_2$  en un modelo neuronal colinérgico de la EA.

Con el objetivo de establecer un modelo celular semejante a neuronas colinérgicas (NC), se utilizaron células estromales mesenquimales (CEM) silvestres (WT) obtenidas a partir de cordón umbilical (CEM-CU) que fueron transdiferenciadas a neuronas colinérgicas y su posterior evaluación de activación de la c-Abl a través de la estimulación con el  $H_2O_2$ . En este contexto, las células transdiferenciadas a NC mostraron marcadores neuronales, colinérgicos como MAP-2, NF-L,  $\beta$ -tubulina III, ChAT, VACHT, y negativo para la proteína ácida fibrilar glial (por su sigla en inglés, glial fibrilar acidic protein, GFAP) respectivamente por microscopia de fluorescencia (MF) y que posteriormente fueron expuestas al  $H_2O_2$  y evaluadas en función de la expresión y activación del marcador de la proteína quinasa c-Abl en presencia de los inhibidores específicos de primera (v.gr.imatinib), segunda (v.gr.dasatinib, bosutinib y nilotinib), y tercera generación (v.gr.ponatinib).

Como resultado de este trabajo de investigación, inicialmente se estableció el protocolo de activación de c-Abl inducido por 100 $\mu$ M de  $H_2O_2$  por un intervalo de tiempo entre 30 minutos (30 min) a 12 horas (hrs) de exposición al  $H_2O_2$  en el modelo de NC. El Análisis de los datos evidenció que 100 $\mu$ M de  $H_2O_2$  aumentó la activación de la quinasa c-Abl ( $\sim$  1.3-f.c. (fold change)), la oxidación DJCys106SO3 ( $\sim$  7.5-f.c.), y disminuyó el potencial de membrana

mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )-comparadas con las NC no tratadas. Además, estos hallazgos revelaron que la concentración de 25nM de los inhibidores de la proteína quinasa c-Abl fueron inocuas para las NC. En este contexto, se demostró que los 5 inhibidores fueron significativamente capaces de proteger a las NC del daño del  $\Delta\Psi_m$  y disminuir los niveles de c-Abl-p-Y412, siendo los más potentes el nilotinib, imatinib y ponatinib ( $\sim$ -0.80-f.c,  $\sim$ -0.68-f.c y  $\sim$ -0.54-f.c respectivamente) comparados con las NC expuestas solamente al  $H_2O_2$ . También se evidenció que los inhibidores nilotinib, imatinib y bosutinib fueron los más efectivos en la reducción significativa de la oxidación de la proteína DJ-1Cys106SO<sub>3</sub> ( $\sim$ -0.91-f.c,  $\sim$ -0.87-f.c y  $\sim$ -0.86-f.c respectivamente), al compararlos con las NC expuestas al  $H_2O_2$ .

En este trabajo, se estandarizó por primera vez un protocolo de activación de la quinasa c-Abl-p-Y412 por  $H_2O_2$  en un modelo neuronal colinérgico NC. También se evidenció que los inhibidores de quinasas nilotinib, dasatinib, ponatinib, imatinib y bosutinib son neuroprotectores y restauradores de la funcionalidad mitocondrial vía disminución de los niveles de la c-Abl-p y de la reducción de los niveles de la oxidación de la proteína DJ-1 y la caspasa 3. Estos hallazgos permiten sugerir a la proteína c-Abl como un blanco terapéutico de estudio, brindando una alternativa promisoriosa para la selección y el diseño de moléculas en el tratamiento de la EA.

**PALABRAS CLAVES:** Enfermedad de Alzheimer, Estrés oxidativo, Modelo, Neuronas colinérgicas, Proteína c-Abl, Peróxido de hidrogeno, Inhibidores de las proteínas quinasas, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib, Ponatinib, Fosforilación y Apoptosis.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a chronic progressive neurodegenerative disorder characterized clinically by memory loss, and neuropathologically, by the presence of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) plaques, neurofibrillary tangles, gliosis and neuronal loss, mainly of cholinergic neurons. These cellular and molecular events are potentiated by oxidative stress (OS) that ultimately lead to death of cholinergic neurons in the hippocampus. Recently, EO has been associated with the Abelson cell protein tyrosine kinase (c-Abl), with the induction of neuronal deterioration due to lipid, protein, and nucleic acid damage and an increase in intracellular  $Ca^{2+}$ . In this context, it has been shown *in vivo* models that c-Abl is activated in neurons exposed to  $A\beta$  peptide and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and that its signaling is associated with OS and neuronal death. Therefore, the c-Abl protein has been proposed as a possible therapeutic target in the design of treatments for AD. In fact, pharmacological inhibitors of c-Abl, such as nilotinib, have been shown to prevent OS,  $A\beta$ -induced synaptic alterations, TAU phosphorylation, neurodegeneration, and cognitive impairment. However, despite these advances to date, there is no effective therapy that reduces the symptoms and neuropathology presented by patients with AD. Similarly, the relationship between OS, the c-Abelson protein, and its regulation with kinase inhibitors in a cholinergic neuronal model under oxidative stress conditions has not been precisely proved.

Therefore, in this work we set out to show a protocol for detecting the activation of c-Abl-phosphorylated (c-Abl-p-Y412) and to evaluate the effect of kinase inhibitors on c-Abl-p and induced OS. by  $H_2O_2$  in a cholinergic neuronal model of AD.

To prove a cell model like cholinergic neurons (NC), wild-type mesenchymal stromal cells (CEM) were used, obtained from the umbilical cord (CEM-UC) that were transdifferentiated to cholinergic neurons and their later evaluation of activation of c-Abl through stimulation with  $H_2O_2$ . In this context, cells transdifferentiated to NC showed neuronal, cholinergic markers such as MAP-2, NF-L,  $\beta$ -tubulin III, ChAT, VChAT, and negative for the glial fibrillary acidic protein (for its acronym in English, glial fibrillary acidic protein, GFAP) respectively by fluorescence microscopy (MF) and that were subsequently exposed to  $H_2O_2$  and evaluated based on the expression and activation of the protein kinase c marker -Abl in the presence of specific inhibitors of the first (v.gr.imatinib), second (v.gr.dasatinib, bosutinib and nilotinib), and third generation (v.gr.ponatinib).

As a result, the establishment of the c-Abl activation protocol induced by 100uM  $H_2O_2$  was shown for a time interval between 30 minutes (30 min) to 12 hours (hrs) of exposure to  $H_2O_2$  in the NC model. Data analysis showed that 100uM  $H_2O_2$  increases c-Abl kinase activation ( $\sim 1.3$ -f.c. (fold change)), DJCys106SO3 oxidation ( $\sim 7.5$ -f.c.), and decreases mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) compared to untreated NC. Furthermore, they revealed that 25nM concentration of c-Abl protein kinase inhibitors were harmless to NC. In this context, it was shown that the 5 inhibitors were significantly able to protect NC from  $\Delta\Psi_m$  damage and decrease c-Abl-p levels, the most potent being nilotinib, imatinib and ponatinib ( $\sim 0.80$ -f.c,  $\sim 0.68$ -f.c and  $\sim 0.54$ -f.c respectively) compared to  $H_2O_2$  treatment alone and that the inhibitors nilotinib, imatinib and bosutinib were the most effective in significantly reducing

oxidation of the protein DJ-1Cys106SO<sub>3</sub> (~-0.91 -f.c, ~-0.87-f.c and ~-0.86-f.c respectively), in NC exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In this work, a protocol for activation of c-Abl-p-Y412 kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a cholinergic NC neuronal model was standardized for the first time. It was also shown that the kinase inhibitors nilotinib, dasatinib, ponatinib, imatinib and bosutinib are neuroprotective and restore mitochondrial functionality by decreasing c-Abl-p levels and reducing the levels of DJ-1 protein oxidation and caspase 3. These findings suggest c-Abl protein as a therapeutic target for study, providing a promising alternative for the selection and design of molecules in the treatment of AD.

**KEY WORDS:** Alzheimer's disease, Oxidative stress, Cholinergic Neuron, Model, c-Abl protein, Hydrogen peroxide, Protein kinase inhibitors, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib, Ponatinib Phosphorylation and Apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

### FIGURAS INTRODUCTORIAS

<b>Figura 1.</b> Neurofisiopatología de la EA	15
<b>Figura 2.</b> Procesamiento de la APP	16
<b>Figura 3.</b> Representación del complejo PSEN1	19
<b>Figura 4.</b> Sitios de los cortes de la APP	20
<b>Figura 5.</b> Formación de EROs	25
<b>Figura 6.</b> Sitios de producción de EROs	25
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de EO en la EA	28
<b>Figura 8.</b> Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis	31
<b>Figura 9.</b> Vía de señalización de apoptosis inducida por la presencia del fragmento tóxico A $\beta$ <sub>25-35</sub> solo o en combinación con el Fe <sup>2+</sup>	33
<b>Figura 10.</b> Organización Estructural de la proteína c-Abl	34
<b>Figura 11.</b> Conformación inactiva / activa de c-Abl	36
<b>Figura 12.</b> Participación de la proteína c-Abl en la neuropatología de la EA	41
<b>Figura 13.</b> Estructura química del imatinib	42
<b>Figura 14.</b> Estructura química del nilotinib	43
<b>Figura 15.</b> Estructura química del bosutinib	44
<b>Figura 16.</b> Estructura química del dasatinib	44
<b>Figura 17.</b> Estructura química del ponatinib	45
<b>Figura 18.</b> Clasificación de los Inhibidores de quinasas	46
<b>Figura 19.</b> Clasificación de los inhibidores de c-Abl según su mecanismo de acción	49
<b>Figura 20.</b> Nilotinib ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas	51

### FIGURAS DE RESULTADOS

<b>Figura 1.</b> Transdiferenciación de CEM-GW-CU en Neuronas Colinérgicas (NC)	60
<b>Figura 2.</b> El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a concentraciones superiores a 100 $\mu$ M altera moderadamente el $\Delta\Psi$ m de las NC	62
<b>Figura 3.</b> El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a concentraciones iguales o superiores a 100 $\mu$ M inducen la oxidación del DJ-1 en NC	63
<b>Figura 4.</b> El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 100 $\mu$ M induce el máximo pico de activación de c-Abl-p-Y412 en NC	64
<b>Figura 5.</b> La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 $\mu$ M) a diferentes intervalos de tiempo induce una reducción del $\Delta\Psi$ m en NC	65
<b>Figura 6.</b> La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 $\mu$ M) a 0,5 hrs induce el valor máximo de activación de c-Abl en NC	66
<b>Figura 7.</b> La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 $\mu$ M) una 1 hr induce el valor máximo de	

oxidación de DJ-1 en NC	67
<b>Figura 8.</b> La exposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 μM) 3 hr induce el valor máximo de la activación de caspasa 3 en NC	68
<b>Figura 9.</b> El nilotinib a concentraciones menores e iguales a 25 nM son inocuas para las NC	70
<b>Figura 10.</b> El nilotinib a concentraciones menores de 50 nM regulan la activación de caspasa 3 en NC	71
<b>Figura 11.</b> Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) restauran el ΔΨ <sub>m</sub> de las NC expuestas al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	73
<b>Figura 12.</b> Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) reducen la oxidación de DJ-1 de las NC expuestas al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	74
<b>Figura 13.</b> Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) reducen la activación de c-Abl-p-Y412 en las NC expuestas al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies reactivas de oxígeno (ERO <sub>s</sub> )	25
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las principales características de los ITKs	47
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones y cinética del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> utilizados en diferentes modelos Celulares	61

## **PARTE I: MARCO TEÓRICO**

### **CAPÍTULO 1: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)**

#### **1.1. Definición**

La EA se define como un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo, que afecta diferentes regiones de la corteza del cerebro y el hipocampo relacionadas con funciones principales del cuerpo como la memoria, el comportamiento, el discurso, la orientación visoespacial y el sistema motor (1). La EA se caracteriza neuropatológicamente por la acumulación de placas  $\beta$  amiloide y ovillos neurofibrilares, acompañados de cambios inflamatorios, atrofia y pérdida neuronal que conducen al deterioro cognitivo del paciente y finalmente a su dependencia total por parte de familiares y profesionales de la salud (2,3).

#### **1.2. Epidemiología e importancia en la salud pública**

De acuerdo con el reporte de la Organización Mundial de la Salud, la EA representa del 60- al 80% de los casos de demencia (4). Asimismo, un informe epidemiológico mundial de la EA en el 2022 reportó más de 50 millones de personas con demencia. Esta situación se agrava aún más debido al envejecimiento de la población que prevé que esta cifra se triplique para el año 2050 (2, 4); estimándose que para el 2030 las personas con demencia por Alzheimer con 65 años o más, alcanzarán una cifra de 12.7 millones solo en Estados Unidos (2, 5). Además, las muertes debidas al Alzheimer aumentaron por encima del 145% entre el 2000 y 2019, y se estima que para el año 2050 esta enfermedad costará alrededor de \$1 billón de dólares. Por esta razón, la EA representa un grave problema para los servicios de salud pública, generando un impacto físico, psicológico, social y económico en pacientes, cuidadores, familias y la sociedad en general (2, 6). Adicionalmente, el estigma social asociado con la demencia tanto entre la población en general y los profesionales de la salud ha obstaculizado la concientización sobre la enfermedad creando un desafío constante y haciendo necesario implementar estrategias de atención y tratamiento que permitan mejorar la calidad de vida del paciente (7).

En Colombia la situación no es ajena a este problema de salud pública, como lo demuestra un estudio realizado por el Instituto Nacional de Salud en adultos mayores en el 2019, mostró una prevalencia de demencia del 9,4% en mayores de 65 y del 57,4% para mayores de 85 años, la cual se predice que incrementara a la par con el aumento de la expectativa de vida, lo que hace prever para los próximos años un aumento en el número de pacientes con la EA en nuestro país (8). De hecho, el departamento de Antioquia tiene la mayor tasa per cápita de pacientes afectados con la EA en el mundo, donde se identificó el grupo más grande de personas con EA genético de inicio temprano en menores de 65 años, compuesto de 25 familias con cerca de 5000 miembros, de los cuales alrededor de 1800 portan la mutación PSEN1-E280A autosómica dominante característica de la EA familiar (EAF) relacionada con el aumento de la producción del péptido beta amiloide (9-11).

### 1.3. Manifestaciones Clínicas de la EA

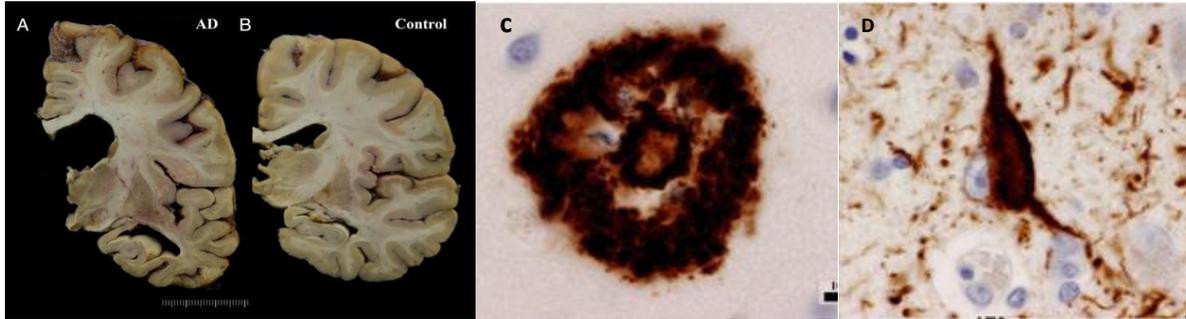
Durante el desarrollo y la progresión de la EA se producen cambios progresivos en los individuos afectados, que han sido agrupados de acuerdo con Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer en tres fases: la preclínica, en donde los individuos presentan cambios medibles en el cerebro que indican los primeros signos de la enfermedad pero que aún no desarrollan sintomatología. La segunda fase del deterioro cognitivo leve (DCL) en el cual se presentan biomarcadores evidentes de la enfermedad acompañados de síntomas sutiles relacionados con el lenguaje y el pensamiento sin afectar la vida cotidiana (2). Finalmente, la demencia o fase tres que se caracteriza clínicamente por una evolución promedio de 7 a 10 años y que se divide en tres estadios: leve, moderado y severo. En el estadio leve el paciente es autónomo, la alteración del lenguaje es mínima, se presentan dificultades mínimas en recordar hechos recientes y los recuerdos pasados no se ven alterados. En este estadio se pueden presentar síntomas neuropsiquiátricos como ansiedad, apatía, irritabilidad y síntomas depresivos. En el estadio moderado de EA se afectan las regiones de la corteza cerebral del lenguaje, el razonamiento, el procesamiento sensorial y cognitivo; lo que genera que los pacientes tengan problemas de memoria episódica; sin embargo, logran recordar detalles esenciales. En este estadio, los pacientes necesitan cuidados y ayuda para actividades diarias como vestirse, las funciones cognitivas se ven afectadas, presentan cambios del comportamiento, la personalidad y en los patrones de sueño. En el estadio severo y último de la enfermedad se presenta una atrofia generalizada de la corteza cerebral y el agrandamiento de los ventrículos; en esta etapa, los pacientes requieren de un cuidador para realizar actividades diarias, porque hay daño en las áreas del cerebro responsables del movimiento y la memoria. Las capacidades cognitivas empeoran, incluida la capacidad de caminar y sentarse, lo cual hace que los pacientes aumenten el riesgo de infecciones, riesgo de broncoaspiración y trombosis venosa profunda, padecimientos secundarios que se convierten a menudo en la causa directa de la muerte (12, 13).

Las manifestaciones clínicas de la EAF no se diferencian de la forma esporádica, no obstante, la sintomatología asociada aparece de forma más temprana en el ciclo de vida de las personas. La pérdida de memoria, trastornos del lenguaje y algunas anomalías motoras se presentan en igual medida (14). Los marcadores patológicos también son los mismos, presentándose ovillos neurofibrilares y acumulación de  $\beta$ -amiloide en forma de placas seniles.

### 1.4. Neuropatología de la EA

La EA se caracteriza macroscópicamente por una disminución del volumen cerebral y microscópicamente por la presencia de depósitos de la proteína beta amiloide ( $A\beta$ ), (placas seniles) en la región cortical del cerebro, los ovillos neurofibrilares (NFTs) (**Figura 1**) que ocupan gran parte del citoplasma celular de las neuronas piramidales, y una marcada pérdida de neuronas colinérgicas de la corteza cerebral que afecta a la amígdala, el hipocampo (15-17) y la gliosis. Todos estos hallazgos neuropatológicos pueden estar

acompañados de daños sinápticos, disfunción mitocondrial, EO, activación de los astrocitos e inflamación, lo cual genera daño y muerte neuronal (18). Estos son los principales marcadores patogénicos implicados en la progresión de la EA (19).



**Figura 1. Neuropatología de la EA.** Hallazgos macroscópicos: **(A)** disminución del volumen cerebral en un paciente con EA comparado con un **(B)** Control, y hallazgos microscópicos: **(C)** placas de A $\beta$  y **(D)** ovillos neurofibrilares intracelulares. Tomada de la referencia (20).

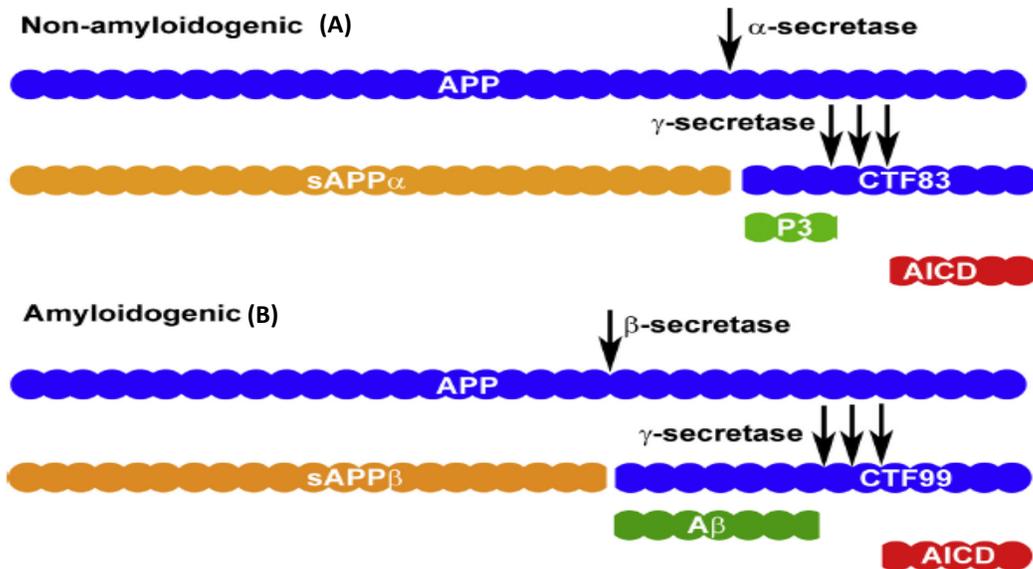
#### 1.4.1 Placas seniles

Las placas seniles están compuestas principalmente péptido beta amiloide, restos neurales degenerativos y células reactivas. Estas placas tienen un núcleo central con depósitos proteicos que contienen principalmente el péptido A $\beta$  con diferentes formas morfológicas, incluyendo placas neuríticas, difusas, de núcleo denso, o clásicas y compactas; que resultan del procesamiento anormal de la proteína precursora del amiloide (21).

##### 1.4.1.1. Producción del péptido A $\beta$

El péptido A $\beta$  es un producto natural del metabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés, Amyloid Precursor Protein,). La producción del péptido A $\beta$  de las placas amiloides se produce por la proteólisis de la APP. En individuos sanos la APP es procesada por la enzima  $\alpha$ -secretasa, lo que resulta en la generación de dos fragmentos: uno soluble  $\alpha$ -APP, el cual se libera al espacio extracelular; y el otro que queda anclado a la membrana el fragmento de carboxilo C83. El fragmento C83 es a su vez procesado por la  $\gamma$ -secretasa dando origen a dos nuevos péptidos, el intracelular amiloide (AICD) y el péptido p3, los cuales no son tóxicos y son generados por la “vía no amiloidogénica” (22) (**Figura 2A**). El péptido A $\beta$  producido por esta vía se encuentra en su forma soluble, es decir, un péptido de 40 aminoácidos (A $\beta$  40). A diferencia de la “vía amiloidogénica”, en los pacientes con la EA, en donde la APP sufre inicialmente proteólisis por la  $\beta$ -secretasa produciendo dos fragmentos: uno extracelular  $\beta$ -APP soluble; y el otro anclado a la membrana (C99). Este último es procesado por la  $\gamma$ -secretasa generando un fragmento AICD y otro extracelular que corresponde al péptido A $\beta$ 1-42 insoluble originado “vía amiloidogénica” (23) (**Figura 2B**). En la EA hay una sobreproducción del péptido y/o una reducción del aclaramiento de este, desencadenando un cambio conformacional del péptido que lo hace insoluble haciendo que se deposite en el parénquima neuronal, primero en placas difusas amorfas asociadas con algunas neuritas distróficas y va creciendo poco a poco hasta que toma una conformación de hoja  $\beta$  (24).

En esta forma, el péptido A $\beta$  se deposita en el parénquima e interactúa con los receptores de membrana provocando una cascada neuropatológica que da lugar a alteraciones en la homeostasis del calcio, incremento en el EO mitocondrial, inflamación crónica por activación de astrocitos y microglía y disminución en el metabolismo energético; contribuyendo así, al deterioro neuronal, a la disfunción sináptica y finalmente a la muerte neuronal (19).



**Figura 2. Procesamiento de la APP.** Esquema de la vía (A) no amiloidogénica y (B) amiloidogénica y de la proteólisis de la (APP). Tomada de la referencia (25).

#### 1.4.2. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés Neurofibrillary tangles) son otro de los marcadores implicados en el desarrollo de la EA compuestos por la proteína TAU hiperfosforilada (26). La proteína TAU es una proteína que pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, por sus siglas del inglés Microtubule-associated protein) implicada en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos y transporte vesicular (27). Los microtúbulos son esenciales para el mantenimiento de la arquitectura neuronal, el transporte axonal y la plasticidad neuronal (28). En la EA, la proteína TAU es hiperfosforilada por múltiples quinasas como la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5), la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), e interesantemente también por la proteína quinasa celular Abelson (**c- Abl**). Este proceso postraslacional de hiperfosforilación de la proteína TAU por las quinasas induce la pérdida de su afinidad por los microtúbulos, y su disociación de estos e induce su asociación en estructuras filamentosas o Filamentos Helicoidales Pareados (PHF, por sus siglas en inglés, paired helical filaments), los cuales dan paso a la formación de los NFT (29).

#### 1.4.3. Muerte neuronal

La EA es un trastorno neurológico multifactorial e irreversible que provoca deterioro cognitivo, pérdida de neuronas colinérgicas en el hipocampo y en las áreas corticales. La agregación de proteínas en placas amiloidógenas y ovillos neurofibrilares, así como la neurodegeneración en estas regiones del cerebro representan las características

neuropatológicas principales de este trastorno. Los mecanismos implicados en la neurodegeneración y en la muerte neuronal incluyen el mal plegamiento de las proteínas, el aumento de la apoptosis, la alteración de las vías de señalización molecular y del transporte axonal, el EO, la inflamación y la disfunción mitocondrial (20).

Los agregados de TAU inducen citotoxicidad y desencadenan alteraciones en el transporte axonal, dañando el citoesqueleto microtubular e induciendo la muerte neuronal (19, 30). Adicionalmente, la muerte celular y la agregación de los productos tóxicos mencionados anteriormente desencadenan la activación de células de la microglía y astrocitos, componentes de la respuesta inmune cerebral, con el fin de reducir el daño y eliminar los desechos. Sin embargo, en la EA esta respuesta es exagerada induciendo la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas y especies reactivas de oxígeno; las cuales generan un ambiente citotóxico e inflamatorio severo que finalmente conducen a la muerte neuronal y al deterioro cognitivo en los pacientes con la EA (31).

## **1.5. Etiología de la EA**

La EA es un trastorno multifactorial, que se clasifica en dos formas clínicas: la Enfermedad de Alzheimer Esporádica o de origen desconocido (EAE) que representa entre el 90 y 99% de los casos tardíos, y la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) que representa entre el 1 y 10% de los casos, los cuales tienen un origen genético (2). En esta última forma clínica, los factores de riesgo se relacionan con la historia familiar y la genética de los pacientes, los cuales son factores no modificables. En la EAF las mutaciones en los genes de la APP, Presenilina 1 (PSEN1) y Presenilina 2(PSEN2) explican la mayoría de los casos genéticos (32).

Adicionalmente, existen otros factores de riesgo modificables como el estilo de vida, el cual incluye la falta de actividad física, el estrés y el consumo de cigarrillo; y enfermedades asociadas, como la hipertensión y la diabetes. Estos factores una vez controlados y/o tratados reducen el riesgo del deterioro cognitivo y demencia (2, 33-35).

En una revisión reciente se han identificado más de 70 factores presumiblemente afectan directa o indirectamente el funcionamiento cognitivo al inicio y la trayectoria de la demencia y sus interrelaciones. Se categorizaron en seis grupos: factores demográficos, factores ambientales, factores psicológicos, grupo de salud social, grupo físico y estilo de vida (36).

### **1.5.1. Factores modificadores de la EA**

#### **1.5.1.1. Edad**

Numerosos estudios epidemiológicos demostraron que el factor demográfico que tiene mayor importancia en el deterioro cognitivo y aparición de la EA es la edad. De hecho se evidenció que en los individuos entre los 75-84 años de edad aumentaba drásticamente en un 19% la prevalencia de sufrir la EA, mientras que en individuos mayores de los 85 años

de edad, el riesgo podría aumentar de 30 a 35%, alcanzando incluso valores hasta del 50% (37). Por esta asociación, algunos autores han considerado la EA como una forma acelerada del envejecimiento normal, ya que algunos de los cambios patológicos identificados en la enfermedad son similares a los observados en el envejecimiento, exceptuando por su severidad (32).

#### **1.5.1.2. Factores ambientales: metales pesados**

Los factores ambientales han sido asociados a la EA esporádica de inicio tardío y en la progresión de la EA. Algunos estudios han demostrado que la exposición crónica a metales pesados como el hierro, cobre, manganeso, plomo, aluminio, y el cadmio pueden ser un factor de riesgo para la EA esporádica. Dentro de estos, el aluminio se considera el metal pesado más importante relacionado epidemiológicamente con la EA, ya que es una molécula tóxica que puede interactuar con diferentes proteínas e inducir la formación de estructuras neurofibrilares (38). Se ha encontrado que los metales participan en la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares, así como en los procesos de EO, alterando la homeostasis de metales como hierro, magnesio y calcio (39). Asimismo, la alteración de la homeostasis de metales esenciales celulares induce la activación de la microglía y de astrocitos, lo que desencadena una sobreproducción de citocinas proinflamatorias y finalmente lleva a la muerte neuronal (32, 40, 41).

### **1.5.2. Factores genéticos**

#### **1.5.2.1. Mutaciones en la Proteína Precursora Amiloide (APP)**

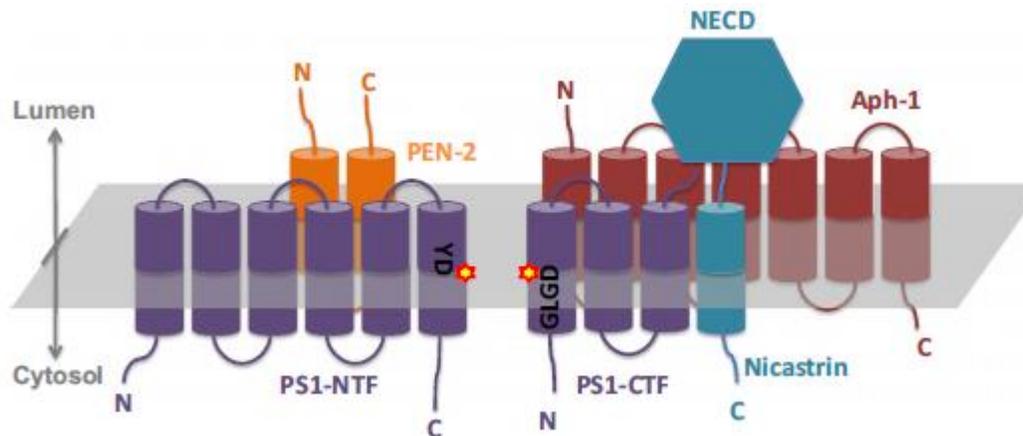
El gen de la APP ubicado en el cromosoma 21q21 codifica para una proteína transmembrana de tipo 1 expresada de forma ubicua, la cual presenta tres variantes predominantes: la APP695, APP751 y APP770, siendo la isoforma APP695 la que se expresa en las neuronas. A nivel génico, se han encontrado aproximadamente 73 mutaciones en el gen APP de las cuales están relacionados con la EA y provocan una acumulación aumentada de A $\beta$  (<https://www.alzforum.org/mutations/app>). La mayoría de las mutaciones de la APP se encuentran en los exones 16 y 17, cerca de los sitios de reconocimiento por las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas afectando el procesamiento y el metabolismo normal de la proteína, del mismo modo que la producción de A $\beta$  y su predisposición a agregarse. Estas mutaciones generalmente representaban un patrón autosómico dominante; algunas mutaciones como la A673V produce una asociación de las placas amiloides a los vasos cerebrales y al aumento de su tamaño; y por su parte la mutación D678H Taiwán puede generar microhemorragias. El estudio de las mutaciones en la APP, ha contribuido a un mejor entendimiento de la patogénesis de la EA (42).

#### **1.5.2.2. Mutaciones en Presenilina 1 y 2 (PSEN-1 y 2)**

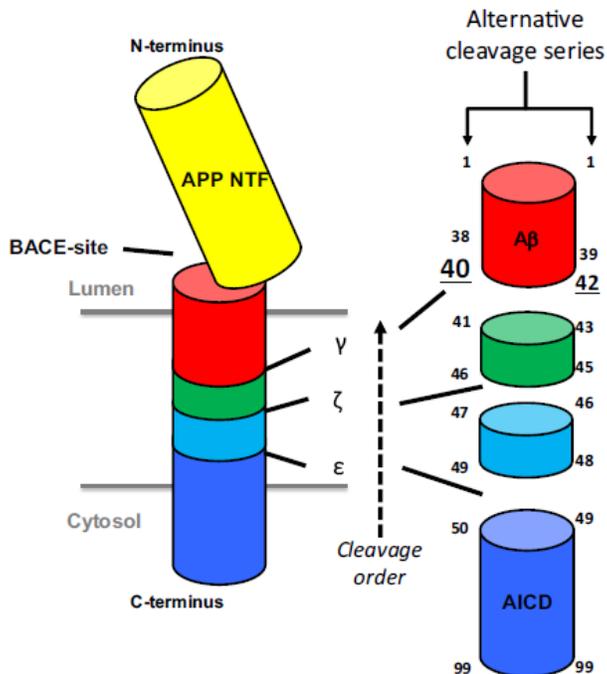
Las mutaciones más comunes asociadas a las formas familiares de EA son las presentes en los genes PSEN 1/2 (43). Las proteínas PSEN-1 y PSEN-2 son homólogas, con un 67% de similitud, con una diferencia en la región N-terminal y la región hidrofílica. Las proteínas presenilina son vitales para la función del complejo proteasa llamado  $\gamma$ -secretasa. La  $\gamma$ -secretasa es un complejo heterotetramérico formado por la interacción de Presenilina 1 (la

cual está compuesta por nueve dominios transmembrana) con proteínas y cofactores como la Nicastrina, el potenciador 2 de la Presenilina y faringe anterior defectuosa-1 (APH1) (**Figura 3**). Si alguno de los componentes falla, el complejo comienza a desestabilizarse y procede a degradarse (44). El complejo  $\gamma$ -secretasa, y en particular PSEN, es esencial para la regulación de vías de señalización intracelulares (como la vía de señalización de Notch y la homeostasis del calcio a través de la regulación en la expresión del gen de unión a CREB) (19).

La  $\gamma$ -secretasa se expresa en diversos órganos y varios tipos celulares del cerebro y su función es el clivaje de una gran cantidad de proteínas transmembranales, incluyendo la APP. En el complejo multiproteico  $\gamma$ -secretasa, la proteína Presenilina 1 constituye la subunidad catalítica. En el caso de la PSEN1 mutante, esta puede interactuar con APP potenciando el corte específico en el sitio 42, lo que genera un depósito del péptido A $\beta$  (**Figura 4**). Además, las mutaciones en la PSEN1 puede conducir a una pérdida de la función de la  $\gamma$ -secretasa al desestabilizar el complejo y contribuir a la neurodegeneración (45).



**Figura 3. Representación del complejo PSEN1.** Gráfica de la topología de las subunidades del complejo PSEN1: Presenilina (morado), nicastrina (azul), APH-1 (rojo) y PEN-2 (naranja). La secuencia altamente conservada del bolsillo catalítico, YD287 y GLGD385 presente en la presenilina 1 identificado con estrellas. Tomada de la referencia (45).



**Figura 4. Sitios de corte de la APP.** Representación gráfica de los cortes realizados por las secretasas y los diferentes péptidos generados, en términos de su longitud. Tomada de la referencia (45).

Las mutaciones en el gen *PSEN1* son las más frecuentes y se conocen aproximadamente 350 mutaciones diferentes (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>), mientras que las mutaciones en el gen *PSEN2* son más raras con 87 mutaciones reportadas (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-2>). Una de las mutaciones más importantes e interesantes se generó por el cambio en el codón 280 del aminoácido alanina por un ácido glutámico (E280A) en la *PSEN1*, causante de la EA de aparición temprana y familiar, descubierta en Antioquia, reportado en al menos 5000 miembros de 25 familias del departamento y con una edad de inicio aproximada entre los 44-49 años (9, 46). Las primeras evidencias sobre la mutación *PSEN1*-E280A surgieron de los trabajos sobre la demencia presenil tipo Alzheimer con agregación familiar realizados en 1987 en un grupo procedente de Antioquia, cuyo estudio genealógico demostró compromiso de nueve individuos en cuatro generaciones. En dicho trabajo se sugirió la existencia de un patrón de herencia autosómico dominante de penetrancia completa (47). Estudios previos genéticos de la población de Antioquia evidenciaron que esta mutación presenta características comunes en una población homogénea; es decir, que no era el resultado de mezcla racial, ni en su fundación, ni en su desarrollo (47). Por lo anterior, la población antioqueña (“paisa”) representa un foco de investigación interesante para la EAF.

### 1.5.2.3. Factor de Riesgo genotipo APOE

La APOE es un miembro de la familia de apoproteínas, importantes por su función en el metabolismo y transporte de lipoproteínas. El gen APOE en humanos, está localizado en el cromosoma 19, contiene tres polimorfismos comunes:  $\epsilon 2$  (cisteínas en el codón 112 y el codón 158),  $\epsilon 3$  (cisteínas en el codón 112) y  $\epsilon 4$  (arginina en el codón 112), que codifican para tres isoformas (ApoE2, ApoE3 y ApoE4). Estudios de asociación genómica realizados en grandes grupos étnicos han confirmado de manera robusta una relación entre EA y APOE

$\epsilon 4$ , demostrando un aumento del 40% en la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en pacientes con EA, en comparación con el 15% en sujetos normales. Estos hallazgos confirman que sujetos con el genotipo  $\epsilon 4 / \epsilon 4$  están más predispuestos a padecer EA de inicio temprano que los sujetos  $\epsilon 4$  heterocigotos (48). De hecho, la presencia de  $\epsilon 4$  afecta directamente la función cognitiva, ya que se ha visto asociado con puntajes menores en las tareas de aprendizaje que involucran la memoria en adultos (49). Esto podría ser explicado por el hecho de que el alelo  $\epsilon 4$  se ha asociado con mayor acúmulo del A $\beta$ , aumento en la inflamación periférica y disfunción cerebrovascular (50, 51). En el cerebro de individuos sanos la ApoE es expresada y secretada predominantemente por los astrocitos; mientras que individuos con la EA es expresada y secretada principalmente por la microglía, en donde interactúa directamente con A $\beta$  tanto soluble como fibrilar. ApoE4 promueve la agregación de A $\beta$  en oligómeros y fibrillas y reduce su eliminación del líquido intersticial, lo que puede conducir a la deposición de A $\beta$  en forma de placas amiloides de núcleo denso lo que conduce a la pérdida de sinapsis de una manera dependiente de dicha isoforma (52, 53).

## 1.6. Diagnóstico

En la actualidad, para realizar el diagnóstico definitivo de la EA es necesario hacer un estudio post-mortem en los cerebros de los pacientes para evidenciar la presencia de los marcadores neuropatológicos como las placas de péptido beta amiloide y los ovillos neurofibrilares. Debido a la falta de marcadores biológicos específicos *in vivo* de la EA, es fundamental contar con una batería completa de pruebas de diagnóstico (58), la cual comprende: i) valoración clínica, en la cual se realiza una revisión de la historia familiar y la valoración neuropsicológica, (información de las áreas cognitivas deterioradas y la capacidad funcional del paciente); ii) pruebas de laboratorio, mediante las cuales se puede medir la concentración de los biomarcadores A $\beta$  y la proteína TAU en el líquido cefalorraquídeo que permitan descartar otras causas del deterioro cognitivo; iii) realización de neuroimágenes, como por ejemplo la tomografía computadorizada (TC) y la resonancia magnética (RM), las cuales son muy útiles para identificar atrofia del hipocampo y de otras regiones cerebrales. Estas pruebas deben ir acompañadas de hallazgos específicos de la EA, como dilatación ventricular e hipoperfusión-hipometabolismo a nivel temporal y parietal; y iv) estudios genéticos útiles para identificar las mutaciones en los genes APP, PSEN1 y PSEN2 causales de la EA familiar (54, 55).

## 1.7. Tratamiento

A pesar de que en los últimos años se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos moleculares de la EA, aún no se ha logrado tener un escenario completo de la enfermedad, lo que dificulta el desarrollo de tratamientos definitivos para su cura. De hecho, los tratamientos actuales disponibles solo sirven para tratar la sintomatología. Además, ninguno de estos previene o revierte la progresión de la enfermedad (29).

### **1.7.1. Tratamientos Convencionales**

Los tratamientos actuales disponibles para la EA se enfocan principalmente en el mejoramiento de los sistemas neuronales colinérgicos y glutamatérgicos, cuando se presenta sintomatología como alteraciones cognitivas, comportamentales y físicas. Los medicamentos aprobados para pacientes con demencia tipo EA leve o moderada de primera línea terapéutica recomendada corresponden a inhibidores de la colinesterasa como el donepezil, rivastigmina y galantamina. Mientras que para los casos con deterioro cognitivo moderado a severo se recomienda un tratamiento con una combinación de memantina y un inhibidor de la colinesterasa. La efectividad restringida y los beneficios terapéuticos limitados de estos medicamentos, adicionado a la ausencia de agentes terapéuticos que puedan modificar el curso de la enfermedad sugiere la inminente necesidad de explorar nuevas alternativas terapéuticas (56-58).

#### **1.7.1.1 Anticolinesterasas**

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE, por sus siglas en inglés Acetylcholinesterase) son uno de los fármacos más utilizados para tratar la EA. La galantamina y el donepezil inhibidores irreversibles y la rivastigmina que es un inhibidor reversible de la AChE y de la butirilcolinesterasa (BChE, por sus siglas en inglés butyrylcholinesterase). El mecanismo acción de estos inhibidores consiste en aumentar la concentración de la acetilcolina en el espacio sináptico, al inhibir la enzima encargada de su catabolismo, la AChE. Los inhibidores de la AChE mejoran temporalmente la cognición, los síntomas de comportamiento y las tareas de rutina (55, 59, 60).

#### **1.7.1.2. Antiglutámico**

Otro de los medicamentos aprobados para el tratamiento de la EA en el estado moderado y grave es la memantina, que actúa como antagonista no competitivo de uno de los receptores del glutamato, el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) glutamatérgico. Este medicamento ejerce un efecto neuroprotector al bloquear la acción excitotóxica del glutamato, disminuyendo su disponibilidad en el espacio sináptico (56-58).

### **1.7.2. Otras alternativas terapéuticas**

La EA es un trastorno multifactorial, debido a esto existen una amplia variedad de fármacos que se encuentran en diferentes fases de estudio y que se encuentran enfocados en los diversos mecanismos que causan esta patología.

#### **1.7.2.1. Inhibidores de las enzimas Beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) secretasas**

Las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas son las principales enzimas responsables de la formación de placas amiloides y por consiguiente de la agregación y el depósito del A $\beta$  y, por tanto, hace que sean consideradas principales dianas o blancos terapéuticos en la EA. En este sentido, numerosos tipos de inhibidores de la  $\beta$ -secretasa (IBS), de la  $\gamma$ -secretasa (IGS) y moduladores de la  $\gamma$ -secretasa (MGS) se encuentran en estudios preclínicos con el objetivo de inhibir selectivamente la producción de A $\beta$ 42 en la EA (61-63). En este contexto, para el 2019 solo se había identificado por Pettus et al, un potente inhibidor de BACE1 (por sus siglas en inglés beta-site APP cleaving enzyme 1) altamente selectivo denominado AM-6494 que

mostró una inhibición significativa de BACE1 en un modelo preclínico *in vivo* (64, 65). Dada la escasa eficiencia demostrada en los estudios clínicos de los tratamientos disponibles en la actualidad para la EA (66) y el hecho que los medicamentos son paliativos, que mejoran temporalmente los síntomas; unido a la complejidad multifactorial de la EA; la investigación científica se ha focalizado en la búsqueda del diseño de terapias alternativas que prevengan, reduzcan o retarden la progresión de este desorden neurodegenerativo devastador, incluso se ha pensado en medicamentos ya aprobados para otras indicaciones clínicas pueden reutilizarse en la EA en presencia de una justificación científica atractiva y evidencia preclínica sólida (66).

#### **1.7.2.2. Tratamientos Anti-Apoptóticos en la EA**

Como parte del mecanismo central que desencadena la neuropatología de la EA es la apoptosis, se ha realizado una búsqueda de compuestos que la regulen y la reduzcan (67). En este sentido, se han propuesto varias moléculas con potencial anti-apoptótico para su tratamiento en modelos *in vitro*; por ejemplo, los cannabinoides CP55, 940 y JWH-015 que protegen y rescatan a las células de la apoptosis después de ser expuestas al A $\beta$ 25-35 / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (68). Otro de los compuestos evaluados fue el ASS234, un compuesto con propiedades antioxidantes y antiapoptóticas (69). Al igual se ha visto que extractos del hongo *Amanita caesarea* reduce el porcentaje de células apoptóticas que se explica por su función antioxidante (70). En esta misma línea se han evaluado otros antioxidantes como lo son la curcumina, vitamina E, Gingko biloba, melatonina (71) con resultados prometedores y finalmente, se están evaluando otros medicamentos como por ejemplo, La coenzima Q10 conocido como ubiquinona, la cual es un importante cofactor de la cadena transportadora de electrones (CTE), posee actividad antiapoptótica inhibiendo la activación de la permeabilidad mitocondrial independiente de su propiedad de captación de radicales libres (72) En conjunto, estos estudios nos demuestran que reduciendo o eliminando los procesos apoptóticos puede ser una manera viable de terapia para el tratamiento de la EA.

## CAPÍTULO 2: ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EA

### 2.1. Definición de EO

El concepto de EO fue formulado en 1985 en el marco de las investigaciones sobre el daño relacionado con el oxígeno en sistemas biológicos. El EO fue definido inicialmente como “la alteración del equilibrio prooxidante – antioxidante a favor del primero” (73). En la actualidad, el EO es definido como el desbalance entre la alta producción de especies reactivas de oxígeno (EROs, EROs por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) provenientes del metabolismo celular y los mecanismos moleculares antioxidantes deficientes para degradar las EROs (74, 75). Las EROs pueden participar en varias funciones fisiológicas donde sirven como moléculas de señalización (76). En condiciones fisiológicas, las células mantienen la homeostasis redox con un nivel basal de EROs al controlar el equilibrio entre la generación y la eliminación. Un aumento moderado de EROs favorece la proliferación y supervivencia celular. Aunque, cuando la cantidad de EROs alcanza un cierto nivel, puede abrumar la capacidad antioxidante de la célula y desencadenar la muerte celular al oxidar macromoléculas celulares como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (77).

### 2.2. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Las EROs son generalmente pequeñas moléculas que tienen una vida corta y son altamente reactivas, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ), los peróxidos de proteínas, de ácidos nucleicos y lípidos, el oxígeno singlete, así como las especies reactivas del nitrógeno (óxido nítrico, peroxinitrito), del carbono, azufre y los halógenos (78) (**Tabla 1**).

Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su capa externa y son capaces de existir de forma independiente y poseen una alta reactividad ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica lo que hace que los radicales libres sean altamente reactivos hacia otras sustancias, o incluso consigo mismos.

Los radicales  $O_2^-$  y perhidroxilo ( $HO_2$ ) sufren una dismutación espontánea (adición de un electrón) por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) para producir  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  es estable y menos reactivo que el  $O_2^-$ ; la adición de dos electrones más, forma la molécula  $H_2O$ . La reducción del  $H_2O_2$  produce radicales  $OH^-$  que pueden reaccionar con lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas, alterando sus estructuras y funciones esto es debido a que el  $OH^-$  es extremadamente reactivo con una vida media de menos de 1 nanosegundo (ns), por lo que reacciona muy cerca de su lugar de formación (**Figura 5**) (79, 80). En los sistemas biológicos los factores que llevan a la formación de las EROs y por consiguiente al aumento del EO pueden estar asociados a defectos hereditarios o adquiridos (mutaciones), factores medioambientales (radiación o toxinas), o por eventos a nivel molecular por alteraciones metabólicas.

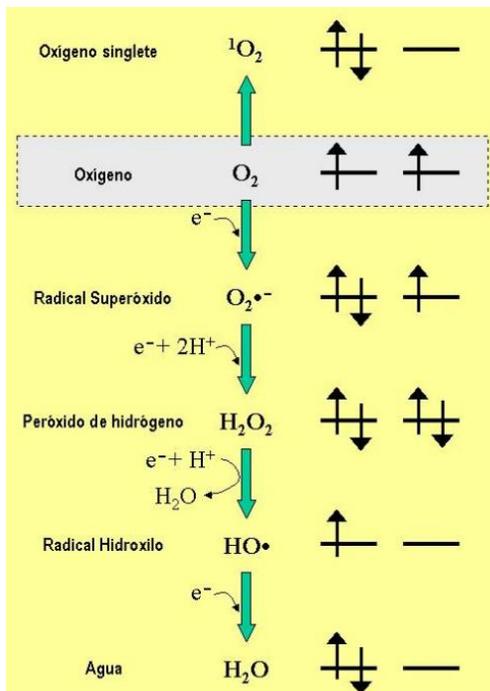


Figura 5. Formación de EROs. Tomado de (81)

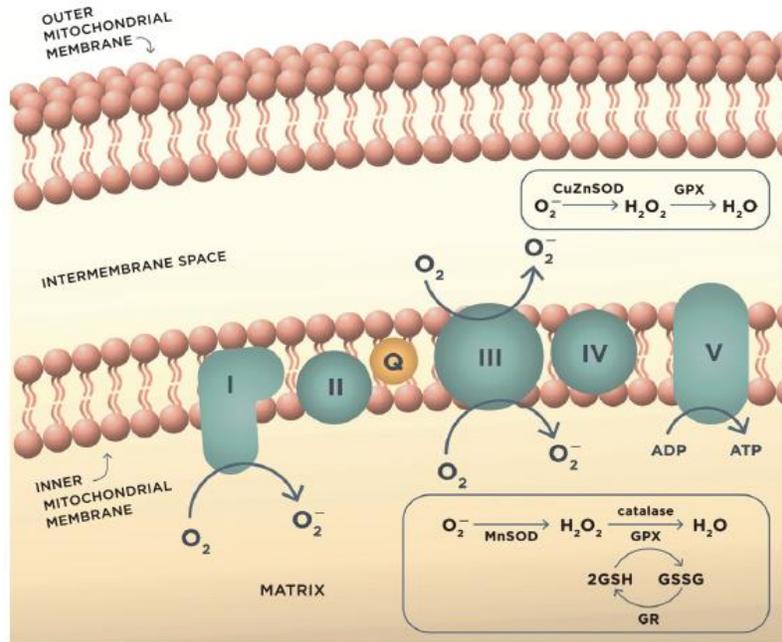
Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (EROS) Tomado de la referencia p78).

RADICALES	NO RADICALES
Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )
Radical Peroxilo ( $RO_2^{\bullet}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Radical Alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ )	Anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
	Ácido hipobromoso ( $HOBr$ )

### 2.3. Fuentes de EO

El EO puede ser exógeno o endógeno. Las fuentes biológicas exógenas provienen de la luz ultravioleta, la radiación ionizante (rayos-X o rayos- $\gamma$ ), la polución; así mismo de sustancias químicas, como los metales pesados (hierro, cobre, cobalto y cromo), los solventes industriales, el tabaco o las reacciones de xenobióticos con actividad redox. Por otra parte, el EO endógeno se genera por procesos metabólicos, inflamatorios y por la activación de algunas vías de señalización celular donde participan como segundos mensajeros. Dentro de sus fuentes se encuentran la xantina oxidasa, enzimas citocromo P-450 en el retículo endoplásmico (RE), peroxisomas, flavin oxidasas, NADPH oxidasas de membrana plasmática (82) aunque, la fuente principal de ROS generalmente se considera que es la cadena respiratoria mitocondrial en la membrana mitocondrial interna. Para este caso, las EROs que se producen en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa, aportan aproximadamente el 90% (83) (**Figura 6**). Los complejos mitocondriales I, II y III se encuentran dentro de la cadena respiratoria, actúan como transportadores de electrones y contribuyen de manera importante a la generación de EROs, siendo la principal fuente el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), el cual genera  $O_2^{\bullet-}$ . Otras fuentes de  $O_2^{\bullet-}$ , son los radicales ubisemiquinona ( $Q^{\bullet-}$ ) que se producen en el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa) como producto de la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ KGDH). A medida que los electrones se transportan a través de los complejos mitocondriales, se produce el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal generando un gradiente electroquímico, que es finalmente utilizado para generar ATP (84). La producción de EROs es importante para generar un potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) y producir ATP, por lo que, cualquier daño en algunos de los complejos podría llevar a un aumento de la producción de

EROs y su liberación a otros compartimentos celulares (85, 86). Finalmente, el superóxido producido en estos complejos es liberado en la matriz mitocondrial donde reaccionan con la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD); o en el espacio intermembrana donde reacciona con la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (CuZnSOD), formando finalmente el  $H_2O_2$ , que puede ser reducido a agua a través de las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (87).



**Figura 6. Sitios de producción de EROs.** Producción de EROs en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa y mecanismos de remoción por sistemas antioxidantes Tomada de la referencia (83).

Otra de las fuentes de EO son las NADPH oxidasas (NOX) se encuentran en la membrana y que generan superóxido (NOX1-3, NOX5) o peróxido de hidrógeno (NOX4, DUOX1-2) de forma dependiente de NADPH. Los electrones se transfieren secuencialmente desde el NADPH citosólico a un FAD unido no covalentemente ubicado en el dominio deshidrogenasa, luego al hemo interno y externo en el dominio transmembrana y finalmente al  $O_2$  en el lado opuesto de la membrana celular produciendo  $O_2^-$  o  $H_2O$  (88, 89). De igual forma se ha demostrado que el retículo endoplásmico produce EROs; para el caso del  $H_2O_2$ , se produce a través del proceso de plegamiento oxidativo (92). El núcleo de la maquinaria de plegamiento oxidativo del RE es un grupo de enzimas oxidorreductasas-chaperonas de la familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDI); esta enzima cataliza la formación de enlaces disulfuro en las proteínas del sustrato, lo que lleva a la reducción de motivos CXXC PDI que a su vez son reoxidados por ER oxidorreductina 1 (ERO1). Este último produce  $H_2O_2$  a medida que dos electrones por par de tiol fluyen desde los PDI hasta el oxígeno molecular (90).

## 2.4 El EO y la mitocondria

Debido que el ATP es generado principalmente por el metabolismo oxidativo, se puede deducir que las neuronas son especialmente dependientes de la función mitocondrial (91). La función mitocondrial está significativamente alterada en la EA y existe un interés creciente en comprender cómo esta alteración puede dirigirse para inhibir o mitigar el proceso neurodegenerativo en la EA. De hecho, se ha observado que los pacientes que padecen la EA tienen mitocondrias menos eficientes en la producción de ATP, pero más eficientes en la producción de EROs (92).

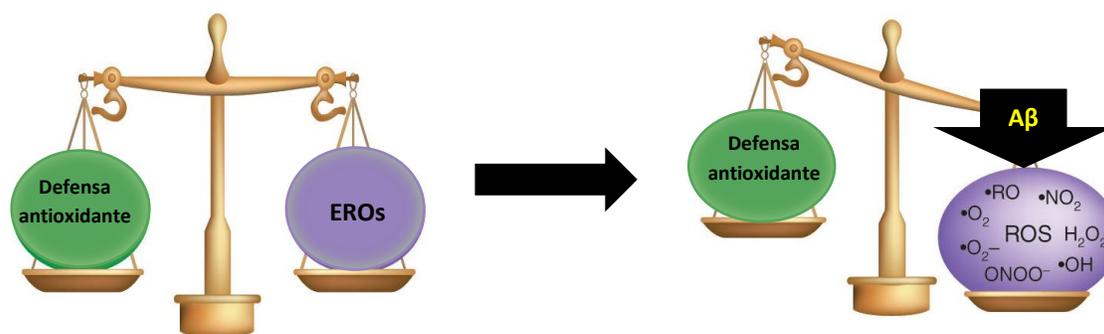
Dado que la mitocondria es la principal fuente de ROS, su disfunción se relaciona con un círculo vicioso de EO, en el cual el daño mitocondrial desencadena la producción de ROS, el cual, a su vez, aumenta el daño mitocondrial al colapsar su potencial de membrana, acelerando la producción de más ROS, lo que acelera el daño celular y provoca una disfunción sináptica: mostrándonos un fuerte vínculo entre el EO y la disfunción mitocondrial. Esta alteración oxidativa generalizada se puede observar en sujetos con DCL y podría preceder a las alteraciones neuropatológicas de la EA, lo que sugiere que el EO aparece desde una etapa temprana de la EA antes del inicio de los síntomas clínicos y la aparición de la patología A $\beta$  y se comporta como una característica central de la EA (83).

Estos hallazgos sugieren el papel de las mitocondrias en el cerebro de los pacientes con la EA sufriendo cambios en: la morfología mitocondrial y número, fosforilación oxidativa,  $\Delta\psi_m$ , amortiguamiento de Ca<sup>2+</sup>, producción de ROS, oxidación y mutación del ADNmt, sitios de contacto mitocondrial-RE, biogénesis mitocondrial, transporte mitocondrial a lo largo del axón neuronal y mitofagia (93); que lleva a consecuencias como, un aumento de la producción de ROS en las neuronas, una promoción del procesamiento amiloidogénico de APP, una actividad respiratoria mitocondrial dañada, un aumento de poros de transición de la permeabilidad mitocondrial mPTP, un deterioro del transporte axonal mitocondrial (94). Además, los dos marcadores histopatológicos principales y típicos de la EA, el péptido A $\beta$  y TAU, se acumulan de forma nociva y progresiva e interactúan de forma no específica con las mitocondrias afectando el transporte mitocondrial axonal incluido Tomm40 (95) y, en consecuencia, el transporte de mitocondrias a lo largo del axón desde el soma neuronal hasta las sinapsis. Por otro parte, la deficiencia del sistema de reparación de material genético eficiente y a la ausencia de proteínas protectoras como histonas hacen vulnerable al ADN mitocondrial al ataque de EROs disminuyendo los niveles de transcripción de proteínas mitocondriales cruciales en el control y la calidad del funcionamiento mitocondrial. Finalmente, el daño causado por las mitocondrias en última instancia conduce al daño neuronal, la neurodegeneración y el deterioro cognitivo en pacientes con EA (96).

## 2.5 EO y la EA

Vale la pena resaltar que el sistema nervioso central (SNC) es particularmente vulnerable al EO por múltiples razones, incluyendo su alto consumo de oxígeno (aproximadamente el 20% del oxígeno que aporta el sistema respiratorio), su uso de diferentes ROS dentro de los

procesos de señalización; además de su metabolismo antioxidante escaso. Esto, sumado a que sus lípidos están compuestos en gran parte por ácidos grasos polinsaturados fácilmente oxidables lo convierten en uno de los sistemas más susceptibles al EO donde pueden ocurrir daños irreversibles de las biomoléculas celulares y perturbación de las funciones neuronales (10). Así mismo, en la EA se ha observado que la acumulación de A $\beta$  además de incrementar el EO, donde las EROs liberadas por las mitocondrias neuronales metabólicamente activas pueden promover varios procesos que potencian aún más la disfunción mitocondrial y llevan a la aparición de los marcadores neuropatológicos característicos de la EA (97). Además, se ha observado que el A $\beta$  también tiene la capacidad de internarse en la membrana mitocondrial, además es capaz de unirse a la enzima alcohol deshidrogenasa ocasionando la disfunción mitocondrial y, por supuesto, el aumento excesivo de ROS (98). Dentro de nuestro grupo, se ha podido demostrar que el fragmento A $\beta$  (25-35) induce EO (**Figura 7**), lo que apoya la hipótesis que el EO es uno de los eventos iniciales y causales del desarrollo de la neuropatología de la EA (99).



**Figura 7. Mecanismo de EO en la EA.** Se ha observado que el A $\beta$  es capaz de inducir un desequilibrio que da como resultado EO y la muerte celular al aumentar la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> creando en círculo, lo que conlleva a la activación de vías de muerte (100).

## 2.6 EL EO, la apoptosis y la EA.

La EA es una enfermedad donde participan múltiples mecanismos que permiten desarrollar la neuropatología. En este sentido, se han postulado varias hipótesis que tratan de explicar el papel del A $\beta$ , su relación con las EROs y la pérdida neuronal por apoptosis que se ha demostrado en la EA.

### 2.6.1 Definición de apoptosis

La palabra apoptosis fue utilizada por primera vez en un artículo de 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para describir un morfológicamente distinto tipo de muerte celular estrictamente regulado (101) y altamente conservado crucial para mantener la homeostasis celular al regular el recambio celular en los organismos vivos sanos al eliminar las células tanto enfermas como células en exceso; además, desempeña un papel en el desarrollo y el envejecimiento de los tejidos. Morfológicamente, se caracteriza principalmente por el encogimiento celular, la formación de vesículas en la membrana, la condensación de cromatina y la fragmentación nuclear, seguidas de la formación de cuerpos apoptóticos

(102). Finalmente, la liberación de marcadores de superficie celular como la fosfatidilserina que permite que células como los macrófagos puedan fagocitar estos cuerpos para una mayor degradación y también para prevenir la necrosis secundaria (103). La apoptosis se da por dos vías principales, la vía del receptor de muerte (extrínseca) y la vía mediada por la mitocondria (intrínseca) (104).

#### **2.6.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis**

La activación de la vía extrínseca se inicia mediante interacciones mediadas con los receptores transmembrana. Estos receptores de muerte son un subconjunto de la familia de receptores, como el factor de necrosis tumoral (TNFR), que tiene un dominio citoplasmático que desempeña un papel fundamental en la transmisión de las señales de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelular mediante la unión de ligandos (FasL/FasR) a sus correspondientes receptores de muerte; estas interacciones receptor-ligando dan como resultado la agrupación de receptores, el reclutamiento y oligomerización a un sitio de acoplamiento para otras proteínas proapoptóticas como Dominio de muerte asociado a FAS (FADD); la procaspasa-8 y la 10 se unen a FADD a través de la dimerización de su dominio efector de muerte, lo que da como resultado la formación del complejo de señalización que induce la muerte (DISC) y la activación. El reclutamiento de varios monómeros de procaspasa 8 y 10 al DISC resulta en su dimerización y activación. En las células tipo I la caspasa-8 y la caspasa-10 activas escinden y activan el efector caspasa-3 y caspasa-7, lo que lleva a la apoptosis; en las células tipo II, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) inhiben activación directa de las caspasas ejecutoras por la caspasa 8, salvo que las IAPs sean inhibidas por proteínas liberadas de la mitocondria (**Figura 8**) (105, 106).

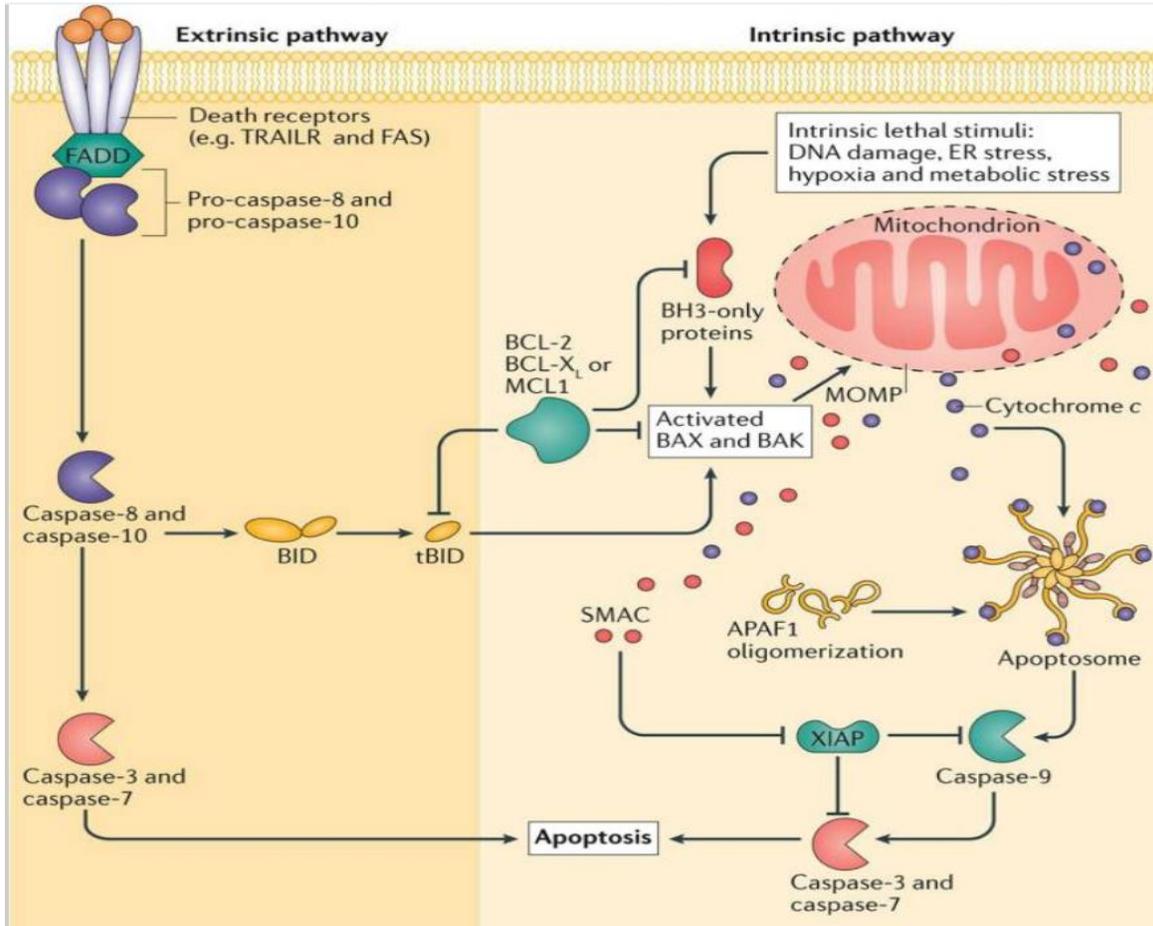
#### **2.6.1.1 Vía intrínseca de la apoptosis**

La vía apoptótica intrínseca se refiere principalmente a la vía apoptótica mediada por mitocondrias, puede ser iniciada por una variedad de estímulos intracelulares y extracelulares que incluyen físicos, químicos y fisiopatológicos; dentro los que se encuentran estrés lisosomal/RE, daño en el ADN, estrés metabólico, estrés celular causado por radiación ionizante, calor, hipoxia, privación de citocinas, EO y fármacos quimioterapéuticos. Si bien estos factores estresantes activan eventos de señalización específicos como lo son la reducción de la señalización de proteína quinasa B/Akt, activación N-terminal de la quinasa c-Jun o activación de p53 con daño en el ADN, finalmente convergen en la activación de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 que son reguladoras y desencadenan la fase de ejecución de la apoptosis que se manifiesta por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (106).

Las proteínas de la familia BCL2 son globulares y están compuestas de 9 hélices alfa, se dividen en tres subcategorías según su función y su estructura: las proteínas antiapoptóticas, como BCL2, Bcl-XL, MCL-1, las proteínas pro-apoptóticas como BAX y BAK, que tienen múltiples dominios BH y las proteínas que posee únicamente un dominio tipo BH3, que se clasifican funcionalmente en activadores directos como PUMA, BIM y BID y proteínas desrepresoras/sensibilizadoras como BAD y NOXA. La señalización de muerte puede activar

las proteínas solo BH3 mediante varios mecanismos que incluyen inducción transcripcional (Bim, Hrk/DP5, Bmf, Puma, Noxa), escisión (Bid) o desfosforilación (Bad) y promueven la apoptosis mediante la interacción directamente con Bax para promover su cambio conformacional e inserción en las membranas mitocondriales o bloqueando proteínas antiapoptóticas. Las proteínas pro-apoptóticas interactúan directamente con la membrana mitocondrial externa desencadenando la permeabilización tras ser activadas por proteínas solo BH3. Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas previenen la MOMP al unirse e inhibir la interacción de membrana de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak activados o uniéndose y secuestrando las proteínas activadoras solo BH3. El paso final de permeabilización y el inicio de MOMP están regulados por un desequilibrio entre los miembros de la familia Bcl-2 pro y antiapoptóticas. Cuando se crea ese desbalance Bax y Bak forman oligómeros que se insertan en la membrana externa mitocondrial, formando poros que dan como resultado MOMP trayendo como consecuencia la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y que las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial, como el segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias (SMAC) y el citocromo c, se liberan en el citosol. El citocromo c interactúa con el factor 1 activador de la proteasa apoptótica (APAF1), formando un complejo llamado "apoptosoma". El apoptosoma es un complejo multiproteico que consta de un complejo en forma de anillo de siete radios, que va a permitir que se active la caspasa-9. La caspasa-9 activa, a su vez, activa la caspasa-3 y la caspasa-7, lo que lleva a la apoptosis. Por otro lado, SMAC/Diablo bloquea el inhibidor de caspasas llamado inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP), liberando las caspasas para que se activen y activen las efectoras. Un punto común de ambas vías es en la activación de una proteína BID, la cuál puede ser clivada por la caspasa 8; esta proteína troncada tBID (activada) puede activar la señalización mediada por moléculas mitocondriales, como BAX y BAK finalizando como vía intrínseca (**Figura 8**).

Como resultado, la célula se transforma en pequeños cuerpos apoptóticos que luego son absorbidos por fagocitosis (101,107-111).



**Figura 8. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.** Esta figura ilustra los principales actores de la apoptosis. Tomada de (106).

### 2.6.2 El A $\beta$ , EO y la apoptosis en la EA

Numerosos estudios científicos han encontrado una relación entre A $\beta$ , EO, la neurodegeneración y la EA. Además, una de las hipótesis propone, que los oligómeros de A $\beta$  pueden incorporarse directamente a las membranas formando estructuras similares a poros llamadas "canales amiloides" que son selectivamente permeables al Ca $^{2+}$ , permitiendo que las concentraciones de Ca $^{2+}$  citosólico aumenten entrando a los subcompartimientos celulares como RE, aparato de Golgi, mitocondria y vesículas, desarrollando finalmente una alteración en la homeostasis del Ca $^{2+}$ , la plasticidad sináptica y el proceso de formación de la memoria (112), afectando la bioenergética de la mitocondria, que lleva a la liberación del citocromo c y factores pro-apoptóticos (113, 114).

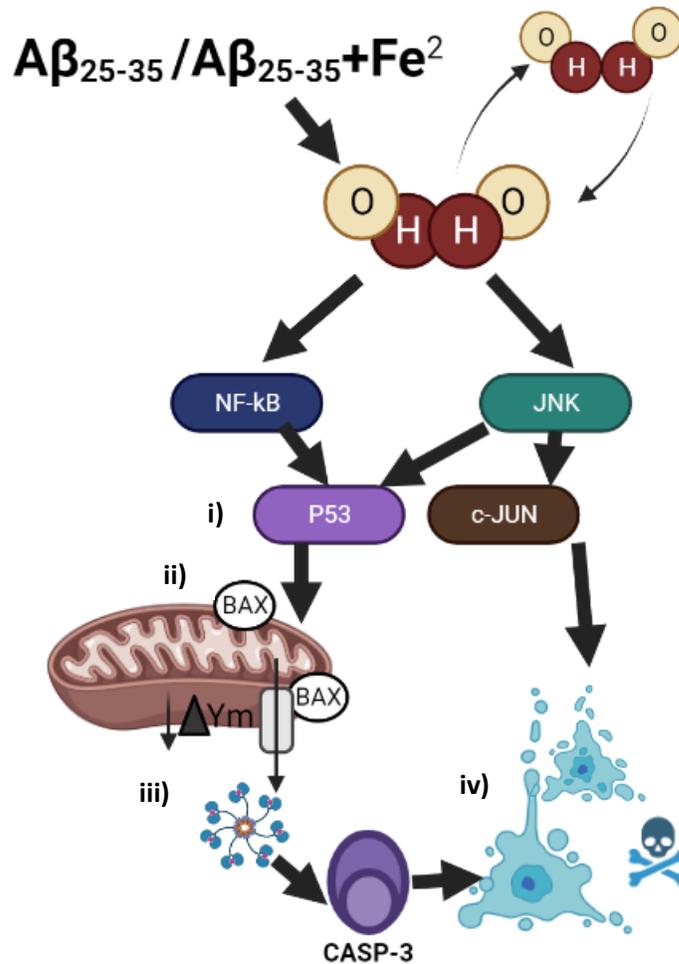
A su vez, se ha observado que la acumulación de A $\beta$  en los cerebros con la EA afectan la respiración mitocondrial ya que provocan la desregulación del complejo I y IV asociada con una mayor carga de A $\beta$  lo que conduce a la producción de EROs y el aumento de la patología A $\beta$  (115), donde las EROs mitocondriales colapsan el potencial de la membrana mitocondrial

acelerando la producción de EROs (116). Por otro lado, se ha evidenciado que las mitocondrias tienen otro papel importante en la célula, regulando la apoptosis. La apoptosis neuronal mediada por EO inducido por el A $\beta$ , provoca la activación de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK) y de las vías mitocondriales pro-apoptóticas que involucran tanto a p53 como a bcl-2 (93). De hecho, existe una interacción directa entre p53 y EROs, en donde p53 modula los niveles celulares de EROs a través de genes inducibles por p53 que codifican una serie de enzimas prooxidantes e inhiben genes de las antioxidantes a nivel transcripcional. Además, se ha evidenciado que p53 contiene residuos de cisteína en su dominio de unión al ADN, que pueden ser oxidados por EROs, lo cual afectaría la actividad de unión del ADN de p53 a genes específicos, dando como resultado un daño celular y muerte neuronal (67, 82, 117).

Por otra parte, se han encontrado niveles elevados de metales como Cu, Zn y Fe, como intermediarios de la sobreproducción de EROs y el aumento en los depósitos de A $\beta$ 42. Además, se ha evidenciado que el Cu y Zn se excretan dentro de la hendidura sináptica de algunas neuronas y pueden jugar un papel importante ya que pueden unirse a A $\beta$  modulando el proceso de agregación; actuando sobre la cinética al afectar la morfología de los agregados formados. En esa misma línea, se ha reportado una correlación positiva entre el aumento en las concentraciones del A $\beta$ , la formación de placas seniles y el déficit de memoria en ratones transgénicos Tg2576 (una forma mutante de la APP) (118). Lo anterior se comprobó con la identificación de una relación positiva entre los niveles de A $\beta$ , la neurodegeneración y el deterioro y pérdida neuronal, entre cerebros de pacientes con EA y controles (119, 120). Igualmente, un estudio reciente donde realizaron inyecciones intrahipocámpales en ratones transgénicos (5xFAD) con extractos que contienen A $\beta$ , se demostró que el A $\beta$  induce muerte celular por apoptosis; confirmando así, el efecto neurotóxico del péptido A $\beta$  y el EO en los procesos neurodegenerativos en modelos de la EA (121).

Nuestro grupo de investigación logró probar que el A $\beta$  25-35 induce apoptosis en un modelo *in vitro*, mediante la activación de una cascada de señalización mediada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (99). (**Figura 9**) También, se ha reportado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede difundirse a través de las membranas biológicas y activar diferentes quinasas, factores de transcripción y oxidación de proteínas consideradas sensores de EO, como el DJ-1 (122). Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene la capacidad de interactuar con iones de metales pesados como Cu o Fe que se encuentran en concentraciones elevadas en cerebros de pacientes con EA (123, 124) y que generan radicales libres mediante la reacción de fenton. Estudios recientes han demostrado que a medida que se da la progresión de la EA, aumenta la probabilidad que ocurran interacciones que promuevan la formación de complejos A $\beta$ -metal permitiendo su agregación (125). De hecho, los experimentos *in vitro* demuestran que la formación del complejo A $\beta$ -Cu<sup>1+</sup> produce EROs (126). Aunque si se ha demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producto de la toxicidad de A $\beta$  reacciona con Fe<sup>2+</sup>, generando EO y activando vías de muerte celular (99). En este contexto, se ha logrado proponer un mecanismo de señalización inducido por la fracción A $\beta$  25-35 que produce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activa una cascada de señalización a través de proteínas pro-apoptóticas como ASK-1, JNK, c-JUN, P53 y PUMA, las cuales activan la liberación de

caspasas iniciadoras y ejecutoras desencadenantes de muerte celular por apoptosis (100, 127).



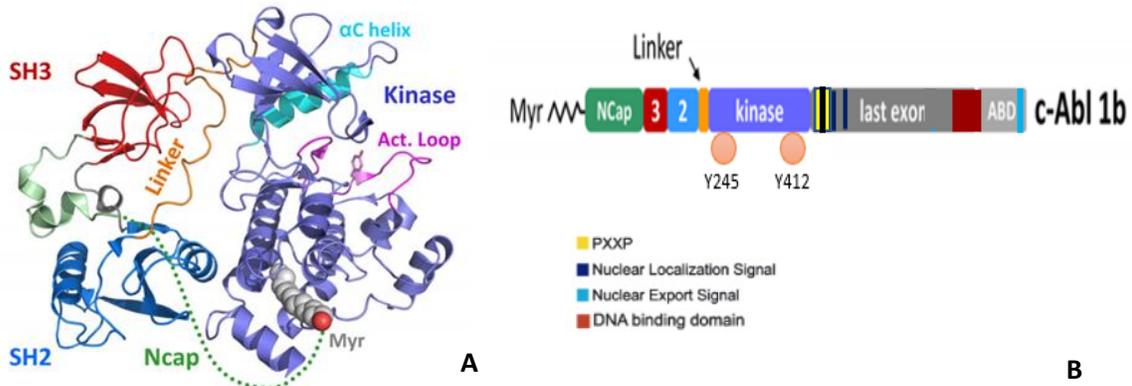
**Figura 9. Vía de señalización de apoptosis inducida por la presencia del fragmento tóxico Aβ<sub>25-35</sub> solo o en combinación con el Fe<sup>2+</sup>.** El Aβ<sub>25-35</sub> / Aβ<sub>25-35</sub>+Fe<sup>2+</sup> genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que aumenta sus niveles en presencia de Fe<sup>2+</sup>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden **i)** activar p53 y la quinasa c-Jun, que activan las proteínas proapoptóticas Bcl-2 inhibiendo las funciones de las proteínas antiapoptóticas; **ii)** inducir la despolarización de la membrana mitocondrial aumentando pérdida del ΔΨ<sub>m</sub> y/o la apertura de los canales Bax/Bak en la membrana externa de la mitocondria, lo que permite la liberación de AIF, **iii)** provocar la oxidación de la cardiolipina, que junto con el aumento de la permeabilidad y la apertura de canales en la membrana mitocondrial median la liberación de Smac/Diablo y citocromo c hacia el citosol. (128-132). Estos permiten **vi)** la condensación y fragmentación nuclear. Imagen modificada de (100).

### CAPÍTULO 3: PROTEINA QUINASA ABELSON (c-Abl) EO y EA

La proteína quinasa celular Abelson (c-Abl) participa en varios procesos celulares, que incluyen la regulación de la actina del citoesqueleto, la regulación del ciclo celular, la apoptosis o el arresto celular en respuesta al EO intracelular y recientemente se ha asociado con muerte neuronal en modelos in vivo de la EA, por lo tanto la proteína c-Abl se ha postulado como un blanco terapéutico promisorio para el tratamiento de la EA (133).

#### 3.1. Definición y estructura de la c-Abl

El gen de la tirosina quinasa no receptora de Abelson (c-Abl, Abl1) fue originalmente identificado como el homólogo celular del oncogén v-Abl del virus de la leucemia murina de Abelson, y posteriormente fue identificada en células de mamíferos y se le denominó celular Abl (c-Abl) (134). c-Abl es una protooncoproteína de 140 kDa que pertenece a la familia Src de tirosina quinasas, codificada por el gen de Abl ubicado en el cromosoma 9 (9q34.12). Esta quinasa se expresa en la mayoría de las células, pero con una localización subcelular diferente, por ejemplo, en los fibroblastos reside predominantemente en el núcleo mientras que en las células hematopoyéticas primarias y las neuronas c-Abl es más citoplásmica. Algunos de los dominios funcionales de la proteína c-Abl han sido caracterizados. Estos consisten en una región N-cap miristoilada, seguida de los dominios de homología Src 2(SH3) y (SH2), un sitio que conecta SH2 con el dominio quinasa denominada linker, un dominio de tirosina quinasa y una región con un dominio de unión a la actina denominada ABD en el extremo C-terminal (**Figura 10A**) (135). La región N-cap regula la actividad de la quinasa y su anclaje a membrana. El dominio C terminal quinasa es una región de > 600 aminoácidos, compuesta de secuencias ricas en prolina (PXXP), de un dominio de unión al ADN (DNA, binding domain (BD)), de tres secuencias de localización nuclear (NLS), una secuencia de exportación nuclear (NES) y motivos de unión a actina G (monoméricos) y F (actina BD). Las células humanas expresan dos variantes de c-Abl, Abl 1a y Abl 1b. La isoforma 1a se origina a partir de un promotor alternativo, lo que ocasiona un truncamiento corto de aminoácidos en el extremo N-terminal sin sitio de miristilación. Mientras que la variante 1b de c-Abl, si presenta un sitio miristilado en la región N-cap (**Figura 10B**). El ácido mirístico se une a su vez al dominio tirosina quinasa, lo que genera un plegamiento de c-Abl generando un estado de auto inhibición. Se ha demostrado que mutaciones en las secuencias de señal de miristilación resultan en una actividad aumentada de la quinasa (136). La región N-cap, también puede influir en la regulación de la actividad de la quinasa mediada por los dominios SH3 y SH2 (137).



**Figura 10. Organización estructural de la proteína c-Abl.** (A) Estructura cristalina de rayos X de c-Abl-1b se representa como una cinta (a la izquierda). La porción no estructurada del N-cap miristoilado que se acopla al lóbulo C del dominio quinasa se muestra como una *línea de puntos*. En el dominio quinasa, las posiciones de la hélice  $\alpha$ C y el bucle de activación (Act. Loop) se muestran en *cian* y *magenta* respectivamente. Los dominios en la estructura están codificados por colores y corresponden al esquema. (B) variante c-Abl 1b consta de una región N-cap miristoilada (Myr), seguida de los dominios SH3 y SH2, el linker SH2/quinasa, el dominio de tirosina quinasa, seguida de una región rica en prolinas y una última región larga, con un dominio C-terminal de unión al ADN (DB) y a actina (ABD). Tomada y modificada referencia (135, 138)

### 3.2 Mecanismo de Acción de la c-Abl

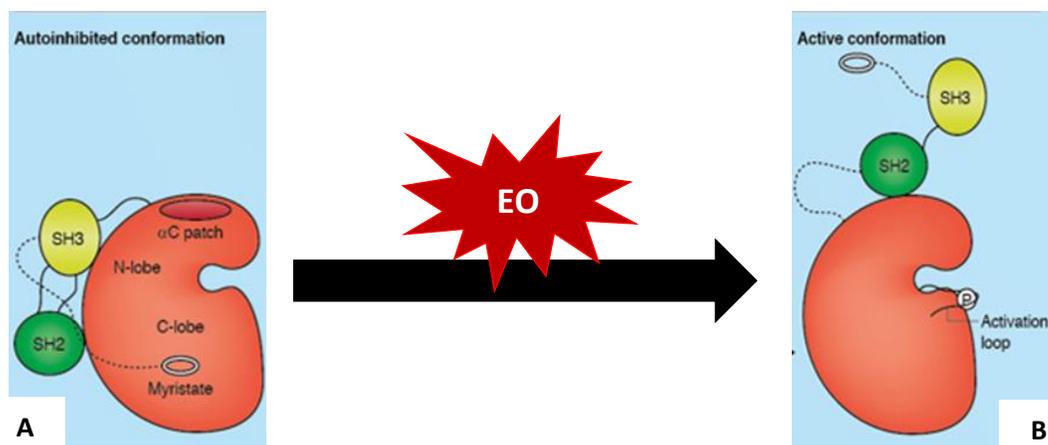
El dominio quinasa de la c-Abl está muy regulado y en la mayoría de las células se encuentra inactivo. Esta regulación negativa, se da cuando el dominio SH3 se une a la región linker (la cual es una región rica en prolinas) y forma una hélice poliprolina tipo II (PPII) que bloquea su actividad. El papel de regulador del dominio SH3, fue confirmado al realizar deleciones o mutaciones en este dominio SH3, así como sustituciones de las prolinas de la región linker, que demostraron el aumento de la actividad quinasa, y por consiguiente la regulación negativa del dominio SH3 sobre la c-Abl cuando está en condiciones celulares normales (139). Por su parte, el dominio SH2 en c-Abl presenta doble acción de inhibición y de activación de la quinasa. En el estado de autoinhibición, la interacción de la región N-Cap con el dominio tirosina quinasa, permite la reorientación del dominio SH2 y su interacción con el residuo de tirosina 361 en la región C-terminal de la molécula. En conjunto, las interacciones entre las regiones N-Cap y el dominio tirosina quinasa; y entre el dominio SH3 y la región linker; y el dominio SH2 con la región C-terminal disminuyen la maleabilidad de c-Abl, confiriéndole un estado inactivo (140).

Durante la activación de c-Abl, la orientación de las regiones de los extremos N- y C-terminal, así como los residuos conservados del sitio activo del dominio tirosina quinasa, coordinan la inter-conversión dinámica de las conformaciones de un estado inactiva a activa. En el estado activo, hay una reorientación del dominio SH2 hacia la región N-terminal, adquiriendo una conformación de “top-hat”. Esta reorientación no solo remueve la inhibición del dominio SH2, sino que aumenta la actividad quinasa de la molécula mediante un efecto alostérico (141). El residuo de aminoácidos que contiene la secuencia Asp-Phe-Gly (DGF) conservada en las

quinasas, y que se ubica muy cerca del bolsillo de unión de ATP en la hendidura formada entre las regiones N y C, su acción a través del aspartato es catalizar un cambio conformacional de la quinasa, que permite que se coordine y se una un ión de magnesio al ATP y se active la fosforilación de la molécula blanco por la quinasa. De hecho, en el estado activo, el dominio tirosina quinasa de c-Abl cataliza la transferencia del fosfato- $\gamma$  del ATP a los residuos tirosina de sus proteínas o péptidos sustratos. Estudios de cristalografía de la molécula c-Abl han revelado múltiples interacciones intramoleculares en los estados de autoinhibición entre los sitios no catalíticos (N-cap, SH3, SH2 y región linker). Cuando ocurren interrupciones de estas interacciones intramoleculares inhibitorias se aumenta la actividad de c-Abl; por ejemplo, i) alteraciones provocadas por la fosforilación de las tirosinas 89 y 134 en el dominio SH3 y en la tirosina 245 en la región linker, pueden conducir a una pérdida en la interacción entre ambas regiones e inducir la activación de c-Abl, dado que estos sitios la estructura de la quinasa constituyen puntos críticos en la regulación de las vías de señalización de c-Abl. De igual manera, la actividad de c-Abl está regulada, a través de las interacciones con los dominios SH2 o SH3 que facilitan su oligomerización, autofosforilación, activación y el aumento de su actividad quinasa (142, 143).

La actividad de la quinasa c-Abl aumenta mediante diversos estímulos fisiológicos, que van desde la progresión de la fase S en el ciclo celular, la radiación ionizante, el EO, la participación de los receptores de adhesión celular, factores de crecimiento y citoquinas. Además, se ha identificado que se activa con una amplia gama de respuestas celulares, incluida la redistribución de Abl del citoesqueleto al núcleo, fosforilación de ARN polimerasa II, activación de quinasas como c-Jun, la inducción de detención de G1 y apoptosis. Estas observaciones respaldan el papel de c-Abl en la integración de las señales de adhesión con el control del ciclo celular y en la respuesta celular al daño del ADN y al EO (144).

Finalmente, cabe resaltar que la función de la mayoría de los inhibidores de quinasas es impedir la unión del ATP en la hendidura formada entre las regiones N y C terminal y a través de interacciones moleculares en esta región de la quinasa impidiendo que cumpla su función (**Figura 11**) (135).



**Figura 11. Conformación inactiva /activa de c-Abl. A)** Conformación de auto inhibición de la c Abl y **(B)** Conformación de activación de la c Abl. Tomada y modificada de referencia (145).

### 3.3. Funciones de la c-Abl

La tirosina quinasa c-Abl es una tirosina quinasa no receptora de expresión constitutiva que está implicada en múltiples funciones celulares y se activa en respuesta a múltiples factores expuestos previamente. Estudios realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que c-Abl participa en una variedad de funciones que incluyen la proliferación celular o diferenciación celular, la retracción o la migración, la autofagia, la reparación del ADN, además promueve apoptosis durante el desarrollo embrionario y en condiciones en las que no es posible reparar el ADN (146), en este contexto, se ha propuesto que en el núcleo la proteína c-Abl interactúa con el ADN vía surco menor de la doble hélice en donde cumple un papel de transcripción, recombinación y de reparación del ADN (147). También c-Abl se ha implicado, en la remodelación de la actina del citoesqueleto, la endocitosis medida por receptor y también regula funciones especializadas como la señalización del receptor de antígeno en los linfocitos y la adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales. Además, c-Abl se ha asociado a vías de señalización celular asociadas al EO y al control de la elección, entre la supervivencia neuronal o la apoptosis empleando el sistema c-Abl/p73 y activando la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (Rb) (148).

Numerosos estudios sugieren que los miembros de la familia de tirosinas quinasas de c-Abl desempeñan un papel importante en el desarrollo del SNC. En este contexto, se ha evidenciado *in vitro* que la inhibición química o génica de la c-Abl reduce la fosforilación de PSD95, lo que conduce a una disminución en su agrupamiento y por consiguiente en su función sináptica (149).

De igual forma, se demostró en embriones de ratón que la c-Abl junto con Arg (otro miembro de la familia de tirosinas quinasas Abl) presentes en los sinaptosomas y en los conos de crecimiento neural potencializan los procesos de sinapsis (150). Adicionalmente, estudios en cultivos primarios de neuronas del hipocampo revelaron que la inhibición de la c-Abl conduce a la disminución de la longitud y a la formación de ramificaciones de las dendritas, también a la reducción del número de dendritas primarias y secundarias ocasionando la disrupción en su polaridad y de la comunicación dendritas-axones (151).

### 3.4. c-Abl, EO, Apoptosis y la EA

La actividad de c-Abl es crucial para el adecuado desarrollo neuronal, sin embargo, esta proteína quinasa permanece relativamente quiescente en neuronas de adultos sanos, y su activación ha sido demostrada en el contexto de la EA en donde el péptido A $\beta$  y EO, activa c-Abl, p73 y fosforila Cdk5 que a su vez activa p53, que junto con p73 promueven la muerte neuronal (152-155).

### 3.4.1.c-Abl y el péptido A $\beta$

Los cambios inducidos por A $\beta$  que subyacen al deterioro cognitivo pueden implicar la activación de vías de señalización que median cambios importantes en la estructura sináptica y la organización del citoesqueleto neuronal durante los procesos de neurodegeneración en la EA. Vargas et al., 2014 mostraron que los oligómeros de A $\beta$  inducen la relocalización y activación de EphA4 que conducen a la activación de la quinasa c-Abl. Además, demostraron que la inhibición de la vía EphA4/c-Abl previene la pérdida de espinas dendríticas y el proceso apoptótico causado por A $\beta$  (**Figura 12 A**) (154). Por otra parte, Álvarez et al. demostraron que las fibrillas del péptido A $\beta$  inducen un incremento en la actividad de c-Abl en neuronas del hipocampo en ratas, así como un incremento en los niveles de proteínas p73 y del complejo p73/c-Abl que controlan no solo la decisión entre la supervivencia neuronal y la apoptosis, sino también puede ser un mediador de neurodegeneración (148, 153). Además, cuando realizaban la inhibición de c-Abl por medio de imatinib o del RNA interferente (RNAi) las neuronas fueron rescatadas de la neurotoxicidad mediada por las fibrillas de AB (153). Adicionalmente, Yañez et al., 2016 mostraron que c-Abl interactúa directamente con APP a través de la Tyr682 en la cola citoplasmática y su proteína adaptadora Fe65, lo cual facilitaba la interacción de la APP con BACE1 promoviendo el procesamiento amiloidogénico de APP, por lo que se ha sugerido a los miembros de la familia Abelson de tirosina quinasa no receptores, como uno de los potenciales mediadores de neurotoxicidad cascada abajo de los efectos neurotóxicos del péptido A $\beta$ , que representa uno de los factores etiológicos más estudiados de la EA (152-158).

En concordancia con los previos hallazgos *in vitro*, estudios *in situ* de tejido postmortem de cerebros de la EA, han demostrado que la acumulación del A $\beta$  aumenta los niveles del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que puede mediar la toxicidad (159). El EO, la acumulación de proteínas agregadas y el daño mitocondrial son marcadores comunes de las enfermedades neurológicas. De igual forma, se ha evidenciado que las neuronas expuestas al EO generado por el A $\beta$  (160), activan c-Abl citoplasmático y nuclear. En donde la producción de ROS durante el EO conduce al daño oxidativo del ADN y c-Abl puede desempeñar un papel importante en el arresto del ciclo celular en el punto de control G1-S, al inducir la formación del complejo ATM/ATR/c-Abl que conduce a la fosforilación de Y99 de p73 activando los participantes de apoptosis en caso de que no exista la reparación del ADN (**Figura 12 B**) (134, 161); también se ha demostrado que la c-Abl se dirige a las mitocondrias, donde tiene una respuesta de muerte celular al EO (162).

De igual manera, se ha demostrado que el complejo c-Abl-p73 se acumula en el núcleo y se localiza en las neuritas y los ovillos neurofibrilares en los cerebros de la EA. Los niveles de proteína p73 y c-Abl también aumentaron en las neuronas del hipocampo expuestas a las fibrillas del A $\beta$  (163). De manera interesante, se determinó que el efecto de las fibrillas del A $\beta$  en las membranas celulares neuronales del hipocampo es similar a los efectos de las neuronas expuestas al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como inductor de la activación de c-Abl y de EO. Asimismo, c-Abl también puede regular la catalasa (enzima que convierte el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> en los sistemas biológicos) al fosforilarla en sus residuos de tirosina Y321 y Y386,

lo que conlleva a su ubiquitinación, a la subsiguiente degradación y por consiguiente al aumento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del EO intracelular (164). Por otro lado, se ha demostrado que la peroxiredoxina Prx1 es considerada un inhibidor fisiológico de c-Abl ya que interactúa con el dominio SH3 de c-Abl e inhibe su actividad catalítica; además, se ha observado que las células deficientes de c-Abl muestran un mayor nivel de expresión de Prx1 (165). Por lo anterior, c-Abl puede representar un interruptor celular involucrado en la decisión de aumentar la respuesta fisiológica al EO o iniciar la apoptosis (133, 153).

Recientemente, Reichenstein y colaboradores en el 2021, demostraron que la activación farmacológica aguda de las quinasas Abl o la aplicación de péptidos monoméricos beta 1-42 (A $\beta$  1-42) a concentraciones bajas de 5 nM reducen de forma similar la neurotransmisión excitatoria espontánea en cultivos neuronales del hipocampo. Además, demostraron que la reducción de la liberación espontánea mediada por el péptido A $\beta$ 1-42 puede ser revertida por la inhibición de la quinasa Abl, lo que sugiere un vínculo entre la activación aberrante de la quinasa Abl y los efectos de los péptidos A $\beta$  en la transmisión sináptica basal (155).

Estos resultados indicaron que el EO comparte un mecanismo común con el A $\beta$  en la activación del c-Abl y en la inducción de la apoptosis observada en la EA. Asimismo, demostraron que la inhibición de c-Abl altera su interacción con APP, proponiendo así, que la inhibición de c-Abl podría ser un objetivo farmacológico para prevenir los efectos nocivos del aumento de los niveles de A $\beta$ , EO y apoptosis en la EA (153).

#### **3.4.2. c-Abl y la fosforilación de la proteína TAU**

La proteína TAU asociada a los microtúbulos, es el componente principal de los filamentos helicoidales, son estructuras agregadas que se encuentran en los ovillos neurofibrilares en los cerebros de los pacientes con EA (166).

Los niveles normales de fosforilación de TAU dependen de la regulación de las fosfatasa y de las quinasas. Cuando se activan las quinasas ocurre la hiperfosforilación de TAU que dificulta la capacidad de esta proteína para unirse a los microtúbulos y promover el ensamblaje de estos. Dentro de las principales quinasas que regulan la fosforilación de TAU se encuentran principalmente GSK-3 $\beta$ , Cdk5 MAPKs, PKA, CK1 y la familia Src de tirosina quinasa y dentro de esta familia a su vez, se ha demostrado que c-Abl es la principal responsable del proceso de fosforilación de TAU en la EA (167). Más de 40 sitios de fosforilación han sido descritos en TAU, dentro de los que se encuentran 5 tirosinas, en las posiciones 18, 29, 197, 310 y 394, de estas, se ha demostrado que las tirosinas 18, 197 y 394 se encuentran fosforiladas en cerebros de pacientes con EA y las dos últimas son producidas por la c-Abl (168).

En estudios posteriores, se demostró que las quinasas Abl no solo se co-localizan con las placas de A $\beta$ , si no con los ovillos neurofibrilares y con los cuerpos de degeneración granulovacuolar (GVD), que son característicos de la neuropatología de los cerebros con la EA (141, 169, 170). Además se evidenció la colocalización de esta proteína quinasa con NFTs en la corteza entorrinal e hipocampo de pacientes con la EA (170) Asimismo,

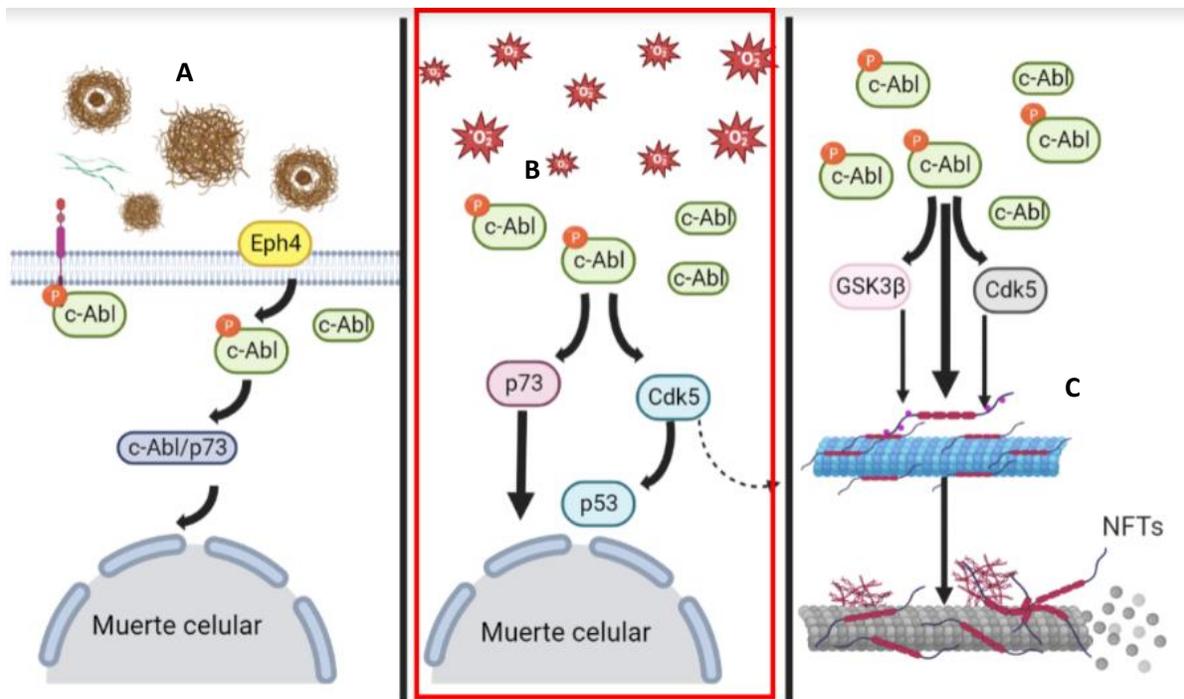
numerosas investigaciones indican que el desarrollo temprano de la patología de la EA se debe a un deterioro acelerado de la dinámica de la actina del citoesqueleto sináptico, y de las perturbaciones de la proteína TAU que resulta en la reducción de la eficacia sináptica, la degeneración de las espinas dendríticas y la disfunción sináptica (171).

#### 3.4.2.1. Fosforilación Directa de TAU

Se ha demostrado que la fosforilación directa de la tirosina 18 en TAU mediada por Fyn, no afecta la unión a los microtúbulos. Sin embargo, adicional a esta fosforilación, la presencia de TAU fosforilada en la Y394 en los filamentos helicoidales apareados de pacientes con EA, por c-Abl, confirman que esta fosforilación es un evento deletéreo específico de la EA (169). De igual manera, en un estudio realizado por Ait-Bouziad et al., 2020 encontraron que c-Abl también fosforiló Tau en Y18, Y29, Y197, Y310 e Y394, siendo Y310 e Y394 los principales sitios de fosforilación (**Figura 12C**). Además, confirman las observaciones previas sobre el impacto negativo de la fosforilación de tirosina en la interacción de TAU con los microtúbulos, probablemente mediado por el gran cambio hacia el potencial electrostático negativo, así como por reordenamientos estructurales de la región de unión a microtúbulos a través de la fosforilación de residuos de tirosina C-terminal Y310 e Y394 (172).

#### 3.4.2.2. Fosforilación Indirecta de TAU

Adicional a la habilidad de fosforilar directamente a TAU, c-Abl también puede indirectamente fosforilar a TAU mediante otras quinasas. Por ejemplo, en modelos *in vivo*, c-Abl puede fosforilar a Cdk5 (una serina/treonina quinasa fundamental en el desarrollo de los mamíferos) en la tirosina 15 y estimular la actividad quinasa de Cdk5, la cual puede fosforilar a su vez a TAU en 9 a 15 sitios diferentes, e inducir su hiperfosforilación y contribuir a la formación de NFT (152) (**Figura 12C**). Se ha demostrado que la fosforilación de TAU mediada por Cdk5 aumenta aún más la fosforilación total de TAU, ya que facilita la fosforilación posterior de TAU por GSK3 $\beta$  (principal quinasa que fosforila a TAU) (173). Por otro lado, c-Abl también puede fosforilar el residuo Y547 de la proteína adaptadora Fe65 (brain-enriched adaptor protein), la cual unida a la APP se trasloca al núcleo y aumenta la expresión de la quinasa GSK3 $\beta$ , que a su vez media la hiperfosforilación de TAU (174). Por lo tanto, estos hallazgos demostraron que c-Abl, actúa como reguladora de la remodelación de la actina en el citoesqueleto, y son las responsables en la patogénesis de la EA como un potencial actor cascada abajo de la señalización de la transducción de señales del A $\beta$ , EO y la hiperfosforilación de la proteína TAU de forma directa e indirecta, constituyendo c-Abl una molécula con un importante potencial como diana terapéutica para el diseño de tratamientos en la EA (153).



**Figura 12. Participación de la proteína c-Abl en la neuropatología de la EA. A)** c- Abl y su relación con los oligómeros de A $\beta$ . **B)** c- Abl y su relación con el EO y **C)** c- Abl y su relación con NFTs. Adaptada de (133).

## CAPÍTULO 4: LOS INHIBIDORES DE c-Abl COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN LA EA

Como se describió anteriormente, la quinasa c-Abl participa en diversos procesos celulares conducentes al deterioro neuronal de los pacientes con la EA, lo que la convierte en foco de atención para los investigadores y en una candidata de regulación terapéutica promisoría para la EA.

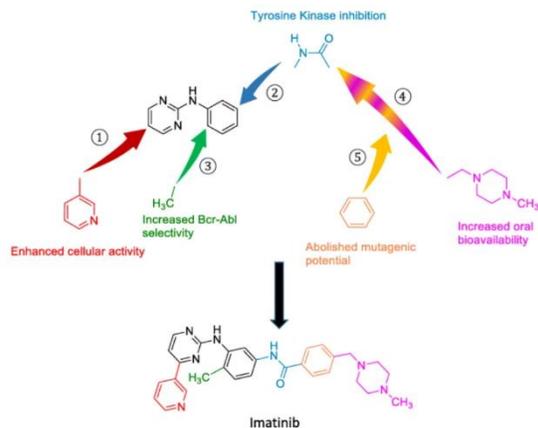
### 4.1. Estructura, clasificación y función de los Inhibidores de quinasa c-Abl

Las quinasas se han convertido en uno de los objetivos más buscados en la investigación farmacológica del siglo XXI, debido a sus funciones críticas en la señalización celular. Hasta la fecha, la FDA de EE. UU. ha aprobado 68 inhibidores de quinasa de molécula pequeña (peso molecular inferior a 500–900 Da) (175).

Desde el descubrimiento inicial se han desarrollado inhibidores de primera, segunda y tercera generación; para superar algunas de las limitaciones de los inhibidores de primera generación, como la falta de especificidad, baja potencia, la baja capacidad de atravesar barrera hematoencefálica (BHE) o ineficacia en presencia de mutaciones; los avances en la biología estructural de las quinasas oncogénicas han facilitado el desarrollo racional de fármacos de segunda y tercera generación logrando mayor selectividad mediante la explotación de pequeñas diferencias estructurales (176). Los inhibidores de la proteína quinasa son competitivos con el trifosfato de adenosina (ATP), lo que significa que se unen de una manera que bloquea el sitio ATP.

Hasta el momento se han aprobado cinco inhibidores de BCR-Abl: imatinib (Gleevec®, Novartis), dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb), nilotinib (Tasigna®, Novartis), bosutinib (Bosulif®, Wyeth) y ponatinib (Iclusig®, Ariad Pharmaceuticals) **Tabla 2** resume las principales características de los ITKs (177).

#### 4.1.1 Imatinib

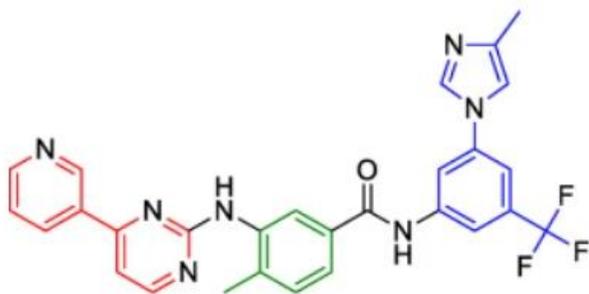


**Figura 13. Estructura química del imatinib.** El compuesto principal derivado de fenilaminopirimidina se indica en negro. ① El grupo piridilo (rojo) agregado en la posición 3' del resto de pirimidina mejoró la actividad celular, ② el sustituyente amida (azul) en el anillo de fenilo proporcionó a la molécula actividad inhibidora contra las tirosinas quinasas, y ③ el 6-metilo (verde) la adición al anillo de aminofenilo central anuló la actividad inespecífica sobre PKC, aumentando así la selectividad del compuesto por Bcr-Abl. Finalmente, se agregó ④ una N-metilpiperazina (púrpura) para

mejorar la solubilidad acuosa y la biodisponibilidad oral del fármaco, pero ⑤ requirió la inserción del conector amida y un anillo de benceno (amarillo) como espaciador para abolir el potencial mutagénico del resto de anilina obtenido de otro modo. Tomado de (177).

El imatinib (STI571, nombre IUPAC 4-[(4-methylpiperazin-1-yl) methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino]phenyl]benzamide). El primer competidor de ATP conocido capaz de inhibir la quinasa Bcr-Abl con alta selectividad, pero no especificidad perteneciendo a la primera generación de los ITKs. Imatinib consiste en un núcleo de bisarilanilino típico que comprende un anillo de fenilo en un lado y un resto de piridina-pirimidina en el otro lado, que posee un grupo benzamida-piperazina en la posición meta del átomo de nitrógeno de tipo anilina (**Figura 13**). Se utiliza como fármaco de primera línea en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica con cromosoma filadelfia positivo (LMC BCR-Abl). También para la dermatofibrosarcoma, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), síndrome hipereosinofílico, síndromes mielodisplásicos y como un tratamiento de segunda línea para la mastocitosis sistémica agresiva sin la mutación *KIT*<sup>D816V</sup>. Imatinib se usa fuera de etiqueta para tumores desmoides, cordomas, melanomas avanzados con mutación *KIT*, y el tratamiento de las leucemias mielógenas crónicas después del trasplante alogénico de células madre. Imatinib es, por tanto, un inhibidor de amplio espectro, modulando las actividades varias proteínas como c-Abl, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), la tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3), la proteína específica de linfocitos (Lck), la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), el dominio intracelular de la proteína precursora de amiloide (AICD), la  $\alpha$ -sinucleína y el receptor del factor de células madre (c-kit) (178).

#### 4.1.2. Nilotinib

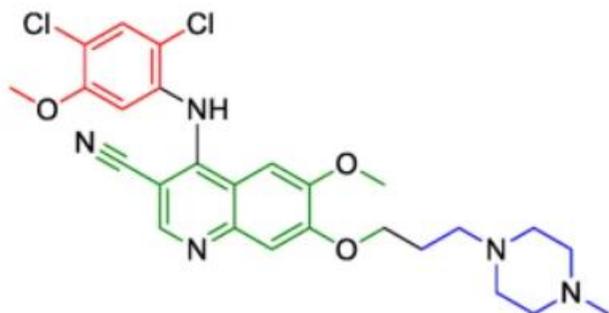


**Figura 14. Estructura química del nilotinib.** verde: estructura central; rojo y azul: grupo de sustituyentes). Tomado de (177).

El nilotinib (AMN107, nombre IUPAC 4-metil-N-[3-(4-metil-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluorometil)fenil]-3-(1)benzamida). Es un inhibidor de segunda generación que parte de estructura de imatinib mediante la inversión del grupo de enlace amida, reemplazando el anillo de piperazina con 3-metilimidazol y agregando un grupo trifluoro-metilo al sustituyente anilincarbonilo, para aumentar el número de interacciones (**Figura 14**). El nilotinib fue aprobado desde el 2007 para el tratamiento de pacientes con LMC. Al igual que el imatinib, el nilotinib puede inhibir otras quinastas, incluidas las MAPK, motivo alfa estéril y quinasa que contiene cremallera de leucina (ZAK), c-kit, receptor de dominio de discoidina (DDR) y PDGFR (179). Se ha propuesto que el nilotinib puede ser utilizado como un tratamiento para las sinucleinopatías, incluida la enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB). De manera interesante, se ha demostrado que el nilotinib promueve la eliminación de  $\alpha$ -sinucleína por autofagia (180) y

evita la muerte de células dopaminérgicas y los déficits conductuales en el modelo de toxicidad MPTP de parkinsonismo *in vivo* (181).

#### 4.1.3. Bosutinib



**Figura 15. Estructura química del bosutinib.** verde: estructura central; rojo y azul: grupo de sustituyentes). Tomado de (177).

El bosutinib (SKI-606, nombre IUPAC 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil) amino]-6 metoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il) propoxi]quinolina-3-carbonitrilo), Es un medicamento de segunda generación que tiene una estructura más diferente, ya que se ha desarrollado a partir de un compuesto inhibidor líder de Src (4-[(2,4-diclorofenil) amino]-6,7-dimetoxi-3-quinolinacarbonitrilo). El núcleo central de quinolina requería la adición de un resto de *N*-metilpiperazino protonable hidrofílico (**Figura 15**). Es un fármaco utilizado como tratamiento eficaz contra LMC BCR-Abl y fue aprobado por la FDA en 2012 (**Tabla 2**). Este fármaco no solo es para inhibir la c-Abl sino, además, tirosina quinasas Src (182). Y presenta importante ventaja de que los transportadores de resistencia a múltiples fármacos no lo excretan de manera eficiente (177).

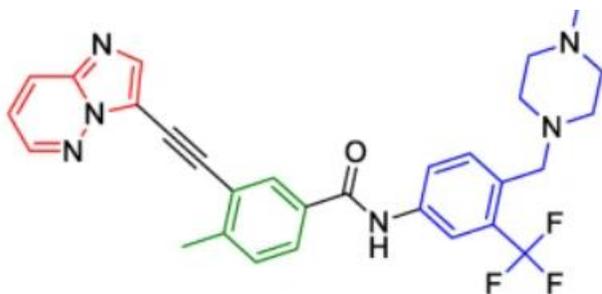
#### 4.1.4. Dasatinib



**Figura 16. Estructura química del dasatinib.** verde: estructura central; rojo y azul: grupo de sustituyentes). Tomado de (177).

El dasatinib (BMS 345825, nombre IUPAC N-(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide). Es un medicamento de los de segunda generación. Estructuralmente, el anillo central de fenilo ha sido reemplazado por un grupo aminotiazol que ocupa el bolsillo de adenina de Abl. En cambio, el grupo piridina de imatinib se reemplaza por una hidroxietil piperazina, que permanece expuesta al solvente también después de la unión de Bcr-Abl (Figura 16). Es un peculiar inhibidor de DFG-in, aunque no es eficaz en el caso de la mutación T315I. En comparación con imatinib, dasatinib permite que los pacientes con LMC en fase crónica logren respuestas al tratamiento más rápidas y profundas por lo cual esta aprobado y se puede recetar como terapia de primera línea para el tratamiento de la LMC. Aparte de la c-Abl este inhibidor actúa sobre la familia Src quinasas y EPHA2 (183).

#### 4.1.5 Ponatinib

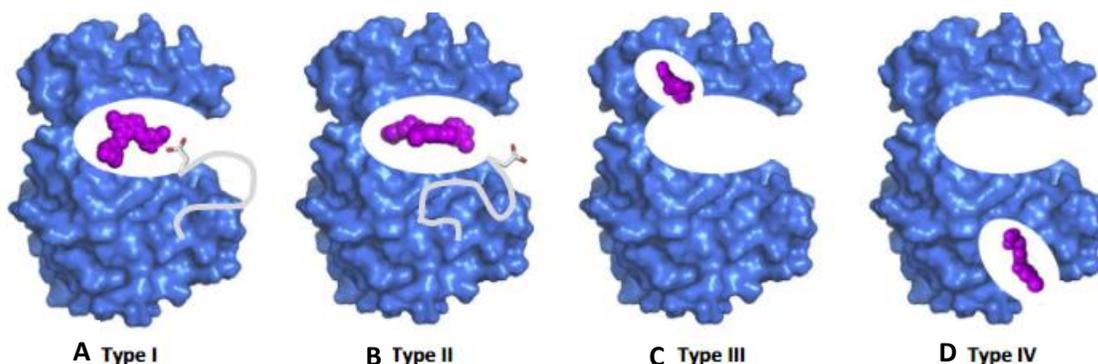


**Figura 17. Estructura química del ponatinib.** verde: estructura central; rojo y azul: grupo de sustituyentes). Tomado de (177).

El ponatinib (AP 24534, nombre IUPAC 3-(2-(imidazo(1,2-b) pyridazin-3-yl) ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-y-1-yl) methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl) benzamide). Es un inhibidor de la quinasa de tercera generación diseñado para tratar la mutación T315I de c-Abl. Estructuralmente, se superpone muy bien con nilotinib con solo pequeñas diferencias aparte del conector etinilo: el grupo metilimidazol se reemplaza por un resto metilpiperazina (como en imatinib). Además, en lugar del grupo piridina-pirimidina de nilotinib, ponatinib tiene una porción terminal de imidazo [1,2-b] piridazina en la misma posición para optimizar la formación de puentes de hidrógeno dentro del bolsillo hidrofílico en el que se aloja (**Figura 17**). Este fármaco es efectivo para BCR-ABL1 nativa y mutada ABL1. También, inhibe las quinasas de FGFR, FLT3 y TIE2 y se ha utilizado como terapia de segunda línea para el tratamiento de leucemias. Actualmente ponatinib está indicado para el tratamiento de la LMC y leucemia linfocítica aguda (LLA) especialmente en pacientes resistentes y/o intolerantes a los inhibidores de primera línea. Vale la pena destacar, que ponatinib se suspendió temporalmente en 2013 por la aparición de eventos tromboticos cardiovasculares (184).

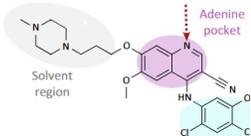
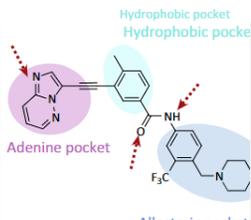
Los ITKs son clasificados según su modo de unión y se pueden agrupar en dos clases: irreversibles y reversibles. Los primeros tienden a unirse covalentemente con un residuo de cisteína nucleofílico reactivo próximo al sitio de unión de ATP, lo que resulta en el bloqueo del sitio de ATP y la inhibición irreversible. Este último puede clasificarse además en cuatro tipos principales según la conformación del bolsillo de unión y el motivo DFG: i) inhibidores de tipo I (**Figura 18A**), que se unen dentro y alrededor del bolsillo de la proteína quinasa catalíticamente activa, donde reconocen el aspartato en el motivo DFG mirando hacia el sitio activo de la quinasa. Dentro de este tipo de inhibidores, encontramos el subgrupo tipo I ½, los cuales se unen a los residuos de la bisagra, el bolsillo de unión a adenina, y el bolsillo hidrofóbico II, pero con la conformación interna DFG-Asp (no la conformación externa de DFG-Asp de inhibidores de tipo II). Los inhibidores de ii) tipo II o DFG-out (**Figura 18B**), son aquellos que se unen a una proteína quinasa inactiva, donde reconocen el residuo de aspartato del motivo DFG que sobresale hacia afuera del sitio de unión de ATP e inducen un cambio conformacional que involucra un bucle del motivo DFG llamado DFG-out. Cuando ocurre esta interacción, la quinasa no puede fosforilar porque el aspartato del dominio DFG se aleja del fosfato y. Dentro de este tipo de inhibidores tenemos los de tipo A, que son compuestos que se extienden más allá del residuo guardián de SH2 hacia la hendidura posterior; y los inhibidores tipo B que son agentes que no logran extenderse hacia la hendidura posterior. Según los hallazgos preliminares, la posible importancia de esta diferencia es que los antagonistas de tipo A se unen a su enzima diana por mayor tiempo que los antagonistas de tipo B. Ambos tipos de inhibidores residen parcialmente dentro del

bolsillo de unión de ATP, exhibiendo una inhibición competitiva en estado estacionario con respecto al ATP. Los inhibidores de iii) tipo III (**Figura 18C**) son aquellos que se unen a un sitio alostérico, un bolsillo adyacente al ATP (97). El grupo N-H de la columna vertebral del DFG-Asp (Abl Asp381) está disponible para formar un enlace de hidrógeno con un ligando que ocupa el bolsillo hidrofóbico III; estos compuestos son inhibidores no competitivos con respecto al ATP, porque el ATP no puede evitar su interacción con la enzima. Y el último grupo de los inhibidores alostéricos son los de iv) tipo IV, (**Figura 18 D**) que se unen a sitios distantes de los sitios de unión al sustrato; uniéndose covalentemente al bolsillo miristoilado en el lóbulo C del dominio quinasa Abl y siendo altamente selectivos para las quinazinas Abl (175, 185, 186).



**Figura 18. Clasificación de los inhibidores de quinasa.** Estructura del complejo medicamento-enzima de acuerdo con el tipo de unión. **A. Tipo I** son los inhibidores que se unen a la conformación activa de la quinasa con el residuo de aspartato (esqueleto blanco) del motivo DFG apuntando hacia el bolsillo de unión de ATP, **B. Tipo II** se unen y estabilizan la conformación inactiva de la quinasa con el residuo de aspartato invertido mirando hacia afuera del bolsillo de unión **C. Tipo III** ocupan un bolsillo alostérico adyacente al bolsillo de unión a ATP pero no se superpone con él y **D. Tipo IV** se unen a un bolsillo alostérico alejado del bolsillo de unión a ATP. Tomado de (187).

MEDICAMENTO	BLANCO	GENERACIÓN	AÑO APROBACIÓN	TIPO	ESTRUCTURA	PM
<i>IMATINIB</i>	BCR-Abl, Kit, PDGFR	Primera	2001	IIA		589.7
<i>DASATINIB</i>	BCR-Abl, Src, Lyn, Yes, Fyn, Lck	Segunda	2006	I		506

<i>NILOTINIB</i>	BCR-Abl, PDGFR, DDR1	Segunda	2007	IIA		584
<i>BOSUTINIB</i>	BCR-Abl, Src, Lyn, Hck	Segunda	2012	IIB		530.45
<i>PONATINIB</i>	BCR-Abl, BCR-Abl T315I, VEGFR, PDGFR, FGFR, EphR, Src familia, Kit, RET, Tie2, Flt3	Tercera	2012	IIA		532.57

**Tabla 2. Resumen de las principales características de los ITKs.** Nombre, blanco terapéutico, generación, año de aprobación por la FDA de manera ascendente, el tipo de Inhibidor, estructura química (bolsillo de adenina que es el que se une al bolsillo de ATP, bolsillo hidrofóbico que juega un papel importante en la selectividad del inhibidor, bolsillo alostérico y la región solvente son usados para aumentar la especificidad y selectividad del inhibidor) y su peso molecular (PM). Imágenes tomadas de (187).

#### 4.2. Metabolismo de los inhibidores de c-Abl

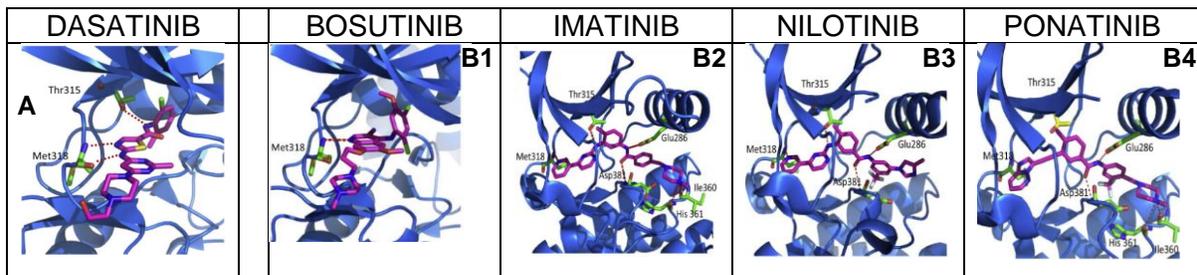
Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs, o tyrosine kinase inhibitors (TKIs)) son caracterizados por la variación interindividual de su farmacocinética. En términos generales, una vez los ITKs son administrados por vía oral, son absorbidos en el tracto gastrointestinal y alcanzan sus niveles plasmáticos máximos de 3 a 6 horas. La biodisponibilidad absoluta para imatinib es cercana al 100%. Los ITKs son solubles en un ambiente ácido y la solubilidad disminuye rápidamente a un pH por encima de 4 y 6. Se ha observado que los alimentos tienen un efecto sobre la biodisponibilidad de algunos inhibidores, por ejemplo, el nilotinib y el bosutinib aumentan notablemente con los alimentos. Estos se distribuyen ampliamente en los tejidos y se unen a proteínas, resultando en una extensa distribución y vida media prolongada. Por ejemplo, el imatinib se distribuye en los tejidos y se une predominantemente a la albúmina y a la glicoproteína  $\alpha$ 1 (AGP), con un volumen de distribución de 435L y una vida media de 18 horas. En el caso del dasatinib, este se distribuye ampliamente en el espacio extravascular y se une a proteínas cerca de un 94% al igual que el bosutinib, resultando en un gran volumen de distribución de 2505L con una vida media de 3-5 horas. En el caso de la distribución en el SNC, se ha demostrado que el nilotinib atraviesa la BHE mientras que el imatinib y el dasatinib presentan una penetrancia muy baja en humanos. Todos los inhibidores son metabolizados principalmente por el citocromo P450 3A4 (de forma abreviada CYP3A4) y por otras enzimas CYP (como es el caso del dasatinib) y en menor medida por las uridinadifosfato glucuroniltransferasa UGT. Los ITKs son transportados por los portadores de casete de unión de ATP de salida B1 y G2. Todos los

ITKs se excretan predominantemente con las heces y solo una pequeña fracción se elimina con la orina. La fracción de fármaco inalterado en las heces puede variar mucho entre ellos y puede ser el resultado de una fracción relativamente grande que no se absorbe y elimina directamente o por un metabolismo de baja eficiencia (188-192).

### 4.3. Mecanismo de acción de los inhibidores de quinasa c-Abl

Los mecanismos de acción de los inhibidores para ejercer su acción inhibitoria sobre la molécula diana c-Abl se clasifican en dos tipos: **Tipo I:** corresponde a los inhibidores que se unen al-BCR-Abl activo, como se ilustra en la (**Figura 19**). En el dasatinib (**Figura 19A**), el nitrógeno del núcleo de tiazol y el grupo amino adjunto forman enlaces de hidrógeno con el residuo Met318 de la c-Abl; el grupo toluidina terminal apunta hacia un bolsillo hidrofóbico que interactúa con la amida a través de un enlace de hidrógeno cerca del residuo Thr315 de la enzima y la cola larga de hidroxietilpiperazinilo queda expuesta hacia la región del solvente.

**Tipo II:** corresponden a los ITKs que unen al motivo DFG de BCR-Abl inactiva y adopta una conformación "out", utilizando tres bolsillos de unión como se describe en la (**Figura 19B**) (**B1**, **B2** y **B3**). Por ejemplo, en el caso del bosutinib (**Figura 19B1**) tiene un núcleo de anilinaquinolina que forma un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno de la quinolina y la amida del esqueleto del Met318. El grupo anilina sustituido ocupa el bolsillo hidrofóbico adyacente a Thr315 de c-Abl. El grupo nitrilo se extiende a otro bolsillo adyacente a Thr315, que puede albergar moléculas de agua para formar interacciones de enlaces de hidrógeno mediadas por agua conservadas con inhibidores de molécula. La fracción piridina-pirimidina del imatinib (**Figura 19B2**) forma un enlace de hidrógeno conservado con el residuo Met318 de la BCR-Abl y el grupo metilfenilo ocupa un bolsillo hidrofóbico y el grupo amino del resto del metilfenilo-amino-pirimidina forma un enlace de hidrógeno con el residuo Thr315 de la BCR-Abl. Asimismo, su grupo terminal piperazinilfenilo se une dentro de un bolsillo alostérico, formado debido a la conformación invertida del motivo DFG, donde la fenil piperazinil forma interacciones iónicas tanto con His361 como con Ile360. También, se forman enlaces de hidrógeno entre el enlace de conexión de amida y los residuos de Glu286 y de Asp 381 de la Abl. De igual forma, el nilotinib (**Figura 19B3**) comparte el resto de la estructura de la piridina-pirimidina-aminotolilo con el imatinib, cuya diferencia es la unión de la cadena larga dentro del bolsillo alostérico. El resto del trifluorometilo, hace posible que el nilotinib se una más fuertemente dentro del bolsillo alostérico. Mientras que el ponatinib (**Figura 19B4**) en lugar de tener un pirimidinamino tiene un enlazador alquino que supera el impedimento estérico debido a la mutación del residuo guardián. Además, el ponatinib lleva el grupo piperazinilfenilo de imatinib y el grupo trifluorometilo de nilotinib, lo que resulta en una interacción más compacta con el bolsillo alostérico (175, 183, 185, 186).



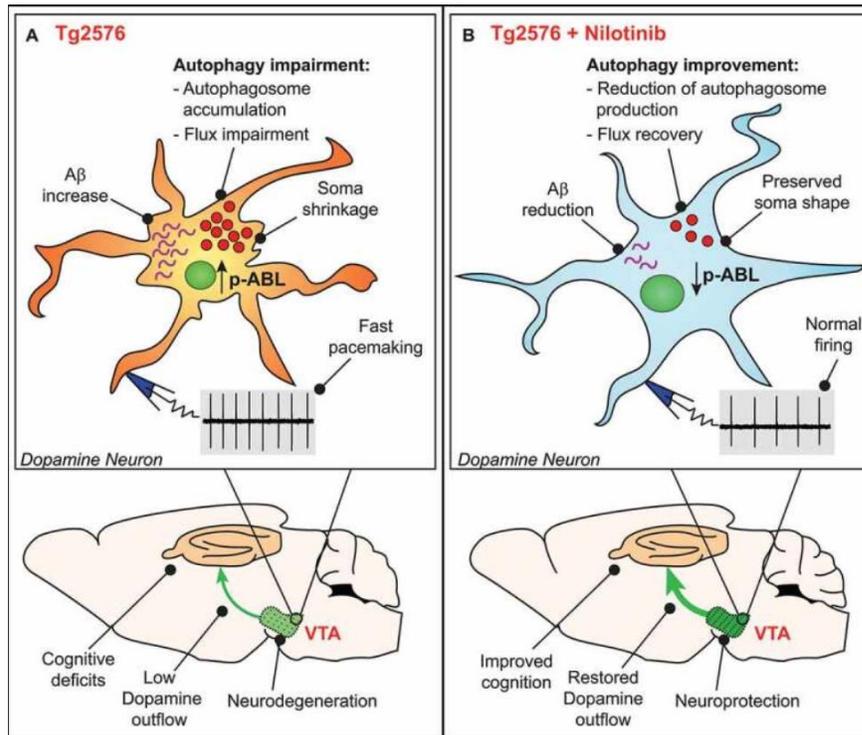
**Figura 19. Clasificación de los inhibidores de c-Abl según su mecanismo de acción. A.** Inhibidores tipo I que se unen a la conformación activa de la enzima. **A.** Estructura química de dasatinib y su modo de unión representado con BCR-Abl. **B.** Inhibidores tipo II que se unen al motivo DFG de la conformación inactiva de c-Abl. **B1.** Estructura química de bosutinib y su modo de unión representado con BCR-Abl. **B2.** Estructura química de imatinib y su modo de unión representado con BCR-Abl. **B3.** Estructura química de nilotinib y su modo de unión representado con BCR-Abl y **B4.** Estructura química de ponatinib y su modo de unión representado con BCR-Abl. Los inhibidores de molécula pequeña se muestran en la columna vertebral magenta, los enlaces de hidrógeno se indican mediante líneas discontinuas rojas y los residuos que interactúan con los inhibidores a través de enlaces de hidrógeno se muestran en la columna vertebral verde. Tomado de (187).

#### 4.4. Inhibidores de quinasa c-Abl en la EA

Los ITKs Abelson (Abl)/Src se encuentran aprobados por la FDA para tratar la leucemia mieloide crónica (LMC). Interesantemente, el Abl se encuentra elevado y se ha asociado al A $\beta$  y a la proteína TAU, marcadores neuropatológicos de la EA (193). Estos antecedentes terapéuticos permiten razonar sobre la posible reutilización o el reposicionamiento de fármacos empleados para el tratamiento contra las leucemias, como posibles terapias novedosas en otras entidades clínicas como la EA. La comprensión de las funciones de la proteína quinasa c-Abl en la modulación de una amplia gama de procesos celulares ha permitido el uso de inhibidores de esta enzima, como posibles agentes terapéuticos de reposicionamiento para la EA. Este desarrollo se ha convertido en uno de los retos farmacológicos más intensamente estudiados. En este contexto, se ha evidenciado que el imatinib administrado vía intraperitoneal en ratones con la mutación APP<sup>sw</sup>/PSEN1 $\Delta$ E9 y en el triple transgénico (ratones 3xTg) de la EA, puede disminuir los niveles de A $\beta$  en el cerebro y la fosforilación de la proteína TAU por inhibición de la proteína activadora de la  $\gamma$ -secretasa (193). Sin embargo, la baja capacidad para atravesar la BHE sigue siendo un impedimento importante para el uso de imatinib para el tratamiento de la EA. Para superar esta limitación del imatinib, recientemente, Adlimoghaddam y colaboradores utilizaron el nilotinib, que posee mayor capacidad para atravesar la BHE y llegar al cerebro, en el mismo modelo de ratones 3xTg-AD de la EA demostrando que el nilotinib mejoró las funciones cognitivas en el modelo transgénico, la recuperación del metabolismo mitocondrial, la biogénesis mitocondrial y aumentó la actividad de la ciclooxigenasa (COX) en la astrogliá cerebral en el modelo (163). De igual forma, se ha observado que el nilotinib previene la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (DA) en el área ventral tegmental (AVT), mantiene el flujo de la salida de DA y reduce la acumulación de autofagosomas y por consiguiente restablece el flujo de autofagia, evitando así la neurodegeneración y restableciendo el flujo de DA en las

áreas que proyectan el AVT y mejorando los fenotipos conductuales y cognitivos en un modelo transgénico de la EA (Figura 20) (194).

**Figura 20. Nilotinib ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas.** (A) Las neuronas DA AVT de ratones Tg2576 muestran niveles incrementados de c-Abl fosforilada y deterioro en la maquinaria de autofagia, lo que podría causar la acumulación de A $\beta$  intracelular y un aumento en la



frecuencia de disparo espontáneo, se produce una reducción de las células, y déficits cognitivos. (B) Las neuronas DA del AVT de ratones tratados con nilotinib muestran una disminución tanto de los niveles fosforilados de c-Abl como de la acumulación de autofagosomas. El aumento en la eficiencia de la autofagia promueve la reducción de A $\beta$  y mejora la salud neuronal y las funciones relacionadas con la memoria en ratones Tg2576. Tomada de la referencia (194).

El Bosutinib otro de los inhibidores de ABL, puede aumentar la autofagia y mejora la interacción funcional entre beclin-1 y parkina soluble mediando la degradación y la eliminación del péptido A $\beta$  en un modelo *in vivo* de la EA (195). Además, bosutinib ha demostrado tener efecto antiinflamatorio al aumentar los niveles de interleuquinas IL-10 y la quimioquina (C-X3-C motif) ligando 1 (CX3CL1) en sangre y modular la neuroinflamación (215). Las ventajas del bosutinib como la del nilotinib son su capacidad de atravesar la BHE, su seguridad, su tolerabilidad y su alta-efectividad a dosis bajas, lo que lo hace un candidato promisorio para el tratamiento de la EA (58, 196). Asimismo, en un modelo murino de la EA, Zhang y colaboradores demostraron que la combinación de dasanitib y quercetina, reducía la producción de citoquinas proinflamatorias y restaura las funciones cognitivas a través de la eliminación selectiva de células progenitoras de oligodendrocitos senescentes (197). Además, se evidenció que el dasatinib también es capaz de atravesar BHE (220). Actualmente se encuentra en ensayo clínico como terapia para combatir la progresión de la EA (198, 199). Por otra parte, recientemente Shakil demostró por medio de predicciones de modelos computacionales que el Ponatinib, otro de los ITKs, podía establecer una interacción química con la AChE en el cerebro humano (200).

Estos hallazgos preclínicos de los efectos neuroprotectores de los ITKs en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EA, permitieron que en la actualidad el bosutinib, dasatinib, nilotinib, se encuentren en ensayos clínicos para la EA.

De hecho, el nilotinib es uno de los inhibidores que se encuentra en un mayor número de ensayos clínicos para su aplicación en el tratamiento de la EA. Por ejemplo, Turner y colaboradores realizaron un estudio unicéntrico de fase II, para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la farmacocinética de nilotinib. El estudio incluyó 27 participantes, todas mujeres, con una mediana de edad de 70,7 años. El inhibidor redujo la carga amiloide del SNC especialmente en el lóbulo frontal y en el líquido cefalorraquídeo, el A $\beta$  42 se redujo a los 12 meses, y la pérdida de volumen del hipocampo se amenoró a los 12 meses. Estos resultados sugieren que el nilotinib es seguro y alcanza concentraciones de líquido cefalorraquídeo farmacológicamente relevantes. Además, los biomarcadores del A $\beta$  40/ A $\beta$  42 se redujeron en respuesta al tratamiento con nilotinib (201).

El reconocimiento de la complejidad de la EA sugiere que podría ser necesario la selección de más de una molécula de los ITKs para establecer un tratamiento exitoso de la EA.

## PARTE II: INVESTIGACIÓN

### CAPÍTULO 5: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

De acuerdo con el reporte de la Organización Mundial de la Salud, la EA es un trastorno neurodegenerativo que representa el 60-80% de los casos de demencia (4). Más que las muertes debidas al Alzheimer aumentaron por encima del 145% entre 2000-2019, sumado al impacto físico, psicológico, social y económico en pacientes, cuidadores, familias y la sociedad en general (2) convierten a la EA en un grave problema para los servicios de salud (6). En el departamento de Antioquia, se ha identificado el grupo más grande de personas con EAF de inicio temprano que está conformado por 25 familias de 5.000 miembros, de los cuales, alrededor de 1800 portan la mutación E280A en el gen de la *PSEN1* (9, 47).

La EA es un desorden neurodegenerativo progresivo y crónico, que se caracteriza clínicamente por una pérdida de la memoria y una disminución de las habilidades cognitivas, y neuropatológicamente por la presencia de placas seniles intra y extracelular, compuestas del péptido A $\beta$ , rodeadas frecuentemente de neuritas distróficas y la acumulación de NFTs, compuestos de proteína TAU hiperfosforilada (15). Todos estos hallazgos neuropatológicos pueden estar acompañados de daños sinápticos, disfunción mitocondrial, EO, activación de los astrocitos e inflamación, lo cual genera daño y muerte neuronal (18).

A pesar de que la EA ha sido caracterizada clínica y neuropatológicamente, los mecanismos moleculares que regulan estos procesos patológicos no han sido dilucidados completamente, lo que ha impedido que exista una intervención terapéutica efectiva. En la actualidad las intervenciones están orientadas a tratar la sintomatología asociada a la EA, más no previenen o revierten la progresión de esta. Por esta razón, muchos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en el estudio de los mecanismos moleculares de la EA para la búsqueda de terapias efectivas.

Dentro de esta búsqueda, se ha observado que el EO juega un papel fundamental dentro de la neuropatología. El EO ha sido definido como el desbalance entre la alta producción de EROs y los sistemas antioxidantes encargados de degradar estas moléculas (75). Se ha evidenciado que el EO induce deterioro neuronal por el daño causado a lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, y por el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, lo cual puede conducir a la muerte neuronal, alterando la función y estructura del sistema nervioso. Debido a la importancia del EO y las EROs en la EA, en las últimas décadas se ha propuesto la hipótesis mitocondrial (83). Es así como se ha descrito que los cambios mitocondriales asociados con la edad avanzada pueden llevar a una desregulación en la producción de EROS, lo cual podría iniciar un círculo vicioso en el que múltiples sistemas y mecanismos afectados por las EROs exacerbaban el daño mitocondrial, lo que lleva a más producción de EROS, acelerando el daño celular y provocando una disfunción sináptica. Estos cambios pueden llevar a la activación directa e indirecta de tirosina quinazas como GSK3- $\beta$ , Cdk5 y c-Abl, las cuales pueden regular la acumulación del péptido A $\beta$  y la hiperfosforilación de TAU, que a su vez incrementan el daño mitocondrial, y por lo tanto el daño neuronal (165, 167).

Dentro de las tirosinas quinasas implicadas, se ha destacado la importancia de c-Abl debido a su papel en diversas actividades celulares incluyendo la regulación de la actina del citoesqueleto, la regulación del ciclo celular, disfunción mitocondrial y apoptosis. Debido a esto, c-Abl ha sido propuesta recientemente como un posible blanco terapéutico dentro de la EA (167). De hecho, se ha evidenciado que los inhibidores de c-Abl pueden mostrar efectos prometedores en el proceso fisiopatológico de la EA, previniendo las alteraciones sinápticas inducidas por A $\beta$ , la fosforilación de TAU, y la neurodegeneración (201).

Nuestro grupo ha logrado establecer un modelo que por primera vez recapitula las principales características de la neuropatología de la EAF de forma natural sin manipulación genética en NC derivadas de CEM luego de 4 días post-transdiferenciación (202). Sin embargo, aún no se ha evaluado cual es la relación con la proteína c-Abelson y su regulación con inhibidores quinasa en un modelo neuronal colinérgico en condiciones de EO.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es inicialmente, establecer un protocolo de activación del c-Abl fosforilado en un modelo de neuronas Colinérgicas y posteriormente evaluar el efecto de los ITKs sobre la c-Abl total y fosforilada y el EO inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un modelo neuronal colinérgico.

Por lo tanto, este trabajo de investigación se plantea y se fundamenta en la búsqueda de respuestas a las siguientes preguntas de investigación:

**¿Se podrá activar la proteína quinasa c-Abl en un modelo de células semejante a neuronas Colinérgicas en condiciones de EO?**

**¿Podrán los ITKs disminuir la activación de c-Abl en un modelo de células semejante a neuronas Colinérgicas en condiciones de EO?**

## **CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y LOS OBJETIVOS DE INVESTIGACION**

### **6.1. Hipótesis**

La proteína quinasa c-Abl se activa en condiciones de EO y los ITKs reducen su activación y el EO en un modelo de NC expuestas al peróxido de hidrógeno.

### **6.2. Objetivos del proyecto**

#### **6.2.1. Objetivo General**

Evaluar los efectos de los inhibidores de la quinasa c-Abl inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un modelo neuronal colinérgico.

##### **6.2.1.1 *Objetivos específicos***

- 1.** Evaluar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en neuronas colinérgicas en función de los niveles de la proteína quinasa c-Abl fosforilada (p-Y412), DJ1 oxidado, del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y CASP 3.
- 2.** Evaluar el efecto del nilotinib en neuronas colinérgicas expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en función de los niveles de la proteína quinasa c-Abl fosforilada (p-Y412), del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) DJ1 oxidado y CASPASA 3 en neuronas colinérgicas.
- 3.** Evaluar el efecto de los inhibidores de la quinasa Abelson (c-Abl) (dasatinib, nilotinib imatinib, bosutinib y ponatinib en neuronas colinérgicas expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en función de la quinasa c-Abl fosforilada (p Y 412) y DJ1 oxidado.

## **CAPÍTULO 7: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN**

### **7.1. Aislamiento, caracterización y descongelamiento de CEM de Cordón Umbilical-Gelatina de Wharton (CU-GW).**

La recolección y el uso de cordones umbilicales de recién nacidos fue aprobado por el Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia y el Comité de Ética Médica del Hospital San Juan de Dios, Yarumal, Colombia. Se obtuvieron células a partir de cordones umbilicales humanos; las cuales fueron aisladas, cultivadas y caracterizadas como CEM silvestres por sus características morfológicas, de cariotipo, inmunofenotípicas y de diferenciación de acuerdo con el protocolo descrito por Mendivil-Pérez y colaboradores (203). En el análisis de genotipificación de APOE se demostró que las células tenían el genotipo APOE 3/3. Una vez caracterizadas las CEM fueron criopreservadas en nitrógeno líquido. Para la realización de este estudio utilizamos las CEM del código 54160 Pase 2. Los viales fueron descongelados en un baño maría a 37°C, se les realizó un lavado para quitar el excedente de DMSO, se resuspendieron en 1 ml de medio de descongelamiento que contiene DMEM con bajo contenido de glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D6046), Suero Bovino Fetal (SBF) al 20% (Lab G&M Ref. 0104) y antibióticos/antimicóticos al 1%: Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 100X (Sigma-Aldrich Ref. A5955). Se realizó viabilidad celular con azul de tripano y se dejaron en un medio de cultivo de mantenimiento a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.2. Prueba de transdiferenciación de CEM de CU-GW a neuronas Colinérgicas (NC)**

La prueba de transdiferenciación a NC se realizó de acuerdo con el protocolo establecido en el laboratorio (203). Se sembraron CEM silvestres con una densidad de  $1,5 - 2 \times 10^4 / \text{cm}^2$  en placas de cultivo tratadas con laminina durante 24 horas en medio de cultivo regular con SBF al 10%. Cuando alcanzaron la densidad esperada, las CEM se incubaron en un medio de cultivo de mantenimiento mínimo (mCM) que contenía DMEM con bajo contenido de glucosa, SFB al 1% más antibióticos/ antimicóticos al 1% o en medio de diferenciación colinérgica que contenía DMEM/F-12 (Gibco Ref. 11320-033), 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Sigma-Aldrich Ref. F0291), 50 µg/mL de heparina de sodio (Sigma-Aldrich Ref. H3149), 0,5 µM de ácido retinoico (Sigma-Aldrich Ref. R2625), Purmorfamida 10nM (Sigma-Aldrich Ref. SML0868) y SBF al 1% a 37°C durante 7 días.

### **7.3. Evaluación de marcadores de NC por inmunofluorescencia.**

Los marcadores relacionados con la diferenciación neuronal fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia. Se sembraron NC silvestres a una densidad de  $1,5 - 2 \times 10^4 / \text{cm}^2$  en placas de cultivo tratadas con laminina, se fijaron con paraformaldehído, después se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,1% y se bloquearon con 5% de SBF. Después se lavaron y se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP 1:200, Abcam Ref. AB68428), proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP2, 1:250, Invitrogen Ref. MA1-25044), β-tubulina III (TUB-III 1:500,

Invitrogen Ref.14-4510-82), colina-acetiltransferasa (ChAT, 1:200, Millipore Ref. AB144P), el transportador de acetilcolina vesicular (VACHT 1:500 Sigma-Aldrich Ref.SAB4200559) y neurofilamento (NF-L 1:500 Invitrogen Ref. MA5-14981). Luego del lavado, se incubaron con anticuerpos secundarios 1:500 (DyLight488 y 594 anti-rabbit y anti-goat and mouse, Ref. DI1088, DI1094 y DI2594, respectivamente). Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33342 y las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia (Marca Zeiss Modelo AxioVert.A1).

#### **7.4. Evaluación de la neurotoxicidad y activación de c-Abl por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las NC.**

Para determinar la concentración óptima para la activación de c-Abl por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las NC a una densidad de  $1,5 - 2 \times 10^4/\text{cm}^2$  se dejaron con un medio mínimo de cultivo (DMEM bajo en glucosa más SBF al 1%) o fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones incrementales de 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Para determinar el tiempo óptimo de activación de c-Abl expusimos las NC con 100  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0; 0,5; 1; 3; 6 y 12 horas a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y se procedió con los experimentos que se describen a continuación.

#### **7.5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) por microscopía de fluorescencia.**

Para el análisis de inmunofluorescencia para la determinación del  $\Delta\Psi\text{m}$ , las células NC expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron fijadas con formol. Después del lavado se incubaron con 20 nM de MitoTracker rojo (Invitrogen Ref. M22426) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS. Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33342 y la intensidad de fluorescencia del MitoTracker se determinó mediante el análisis de imágenes tomadas en un microscopio de fluorescencia (Marca Zeiss Modelo AxioVert.A1).

#### **7.6. Evaluación de activación de c-Abl y oxidación de DJ-1 oxidado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las NC por Inmunofluorescencia.**

Para el análisis de inmunofluorescencia de la activación de c-Abl y oxidación de DJ-1, las células NC expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron fijadas con formol. Después del lavado se incubaron con anticuerpos primarios contra ABL1 (phospho Y412, 1:200 Abcam Ref. ab4717), c-Abl (clona 8E9, 1:200 Invitrogen Ref. MA5-14398) y contra PARK7/DJ-1- oxidado (Cys106, 1:250 Abcam Ref. 169520). Luego del lavado, se incubaron con anticuerpos secundarios 1:500 (DyLight488 y 594 anti-rabbit y anti-goat and mouse, Ref. DI1088, DI1094 y DI2594, respectivamente). Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33342 y las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia (Marca Zeiss Modelo AxioVert.A1).

#### **7.7. Evaluación de la neurotoxicidad del nilotinib H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las NC**

Para determinar la inocuidad del nilotinib, las NC a una densidad de  $1,5 - 2 \times 10^4/\text{cm}^2$  se cultivaron en un medio de DMEM bajo en glucosa y con SBF al 1% en ausencia o en presencia del nilotinib a concentraciones incrementales de 0,5; 1; 10; 25; 50; 100; 250; 500;

1000 nM durante 4 días a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurridos los 4 días se realizó la metodología descrita en los numerales 7.5. Adicionalmente, para el análisis de inmunofluorescencia de la caspasa 3, las células NC expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fijadas con formol, fueron incubadas con anticuerpos primarios contra caspasa 3 (1:100 Santa Cruz Ref. sc-22171-R).

#### **7.8. Evaluación de las EROs intracelulares en NC.**

Para realizar la medición de los niveles de las EROs intracelulares, las NC con una densidad de  $1,5 - 2 \times 10^4/\text{cm}^2$  tratadas con nilotinib fueron incubadas con 5  $\mu\text{M}$  de la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína DCFH<sub>2</sub>-DA durante 0,5 hrs a 37°C en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 0,5  $\mu\text{M}$ . Las células se lavaron dos veces con PBS y la intensidad de fluorescencia de DCF se determinó mediante el análisis de imágenes tomadas en un microscopio de fluorescencia (Floyd Cells Imaging Station).

#### **7.9. Ensayo de inhibición de c-Abl por los ITKs en NC.**

Para este ensayo se tomaron las NC a una densidad de  $1,5 - 2 \times 10^4/\text{cm}^2$  y se trataron con 25 nM de cada inhibidor, dasatinib (DAS), imatinib (IMA), nilotinib (NIL), bosutinib (BOS) y ponatinib (PON), junto con 100  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se dejaron por 0,5 hrs a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se evaluó el estado del potencial de membrana mitocondrial con la metodología 7.5., la oxidación del sensor de estrés DJ-1 y la activación de c-Abl realizadas con la metodología descrita en el punto 7.6.

#### **7.10. Análisis estadístico de los datos.**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el análisis Student-t o ANOVA de una vía, seguido de la comparación post-hoc de Tukey calculada con el software científico GraphPad Prism 9 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.). La significancia estadística fue de \*p <0.05, \*\*p <0.005 y \*\*\*p <0.001. Los experimentos se realizaron 3 veces en experimentos independientes.

## CAPÍTULO 8: RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

### 8.1 Transdiferenciación de CEM-GW en Neuronas Colinérgicas (NC)

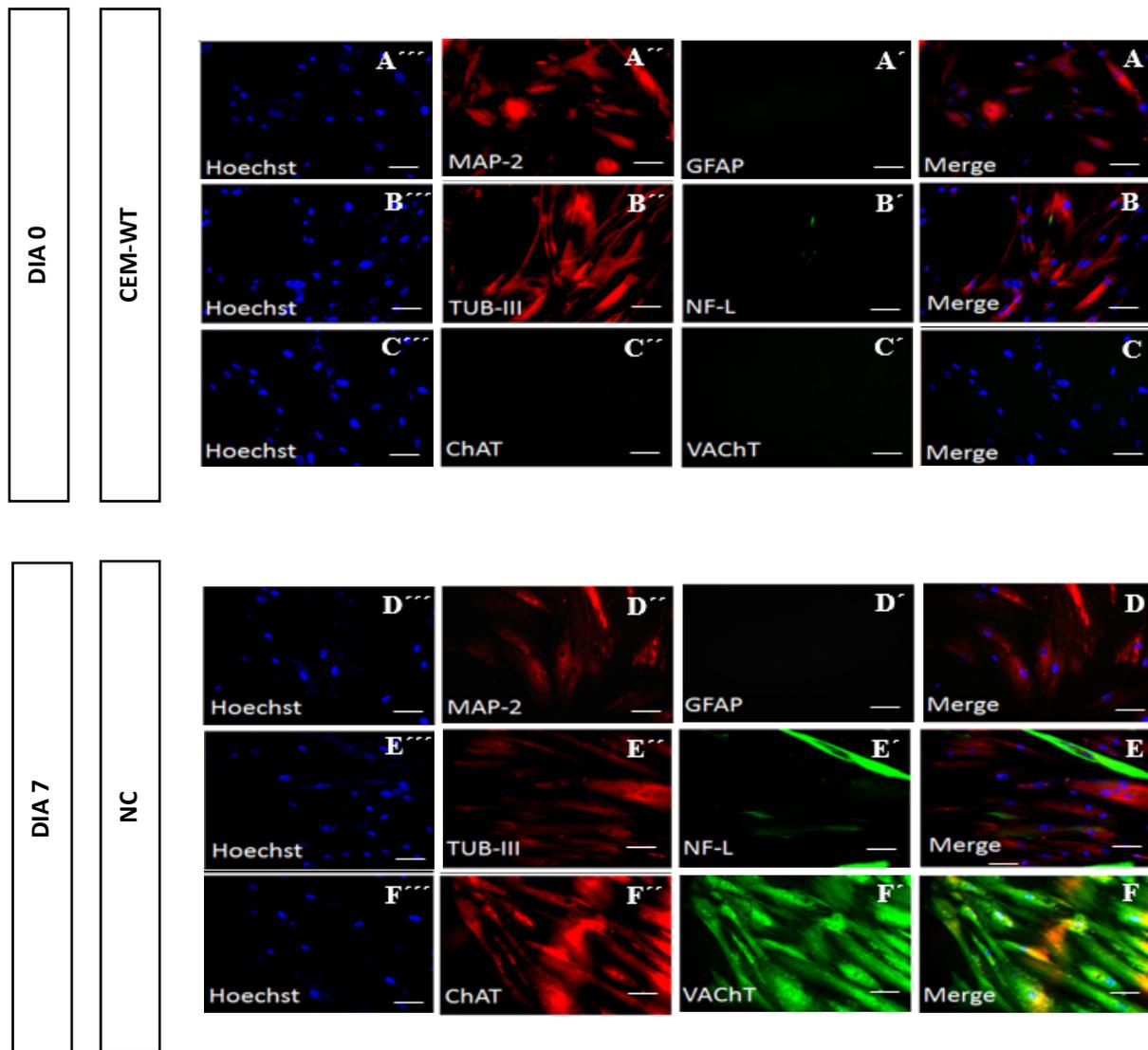
Las CEM-GW expuestas a un coctel de diferenciación demostraron su capacidad de transdiferenciarse en células semejantes a neuronas colinérgicas (NC) (**Figura 1**). Como se ilustra en la **Figura 1**, en las CEM-GW cultivadas en medio mínimo de mantenimiento, 96.5% mostraron la expresión de la proteína MAP2 (Microtubule associated protein 2, marcador de desarrollo neuronal) (**Fig. 1A'**), 89.5% la proteína TUB III (marcador precursor neuronal) (**Fig. 1B'**) y un 5.3% expresaron NF-L (Neurofilament Light Chain) (**Fig. 1B'**); mientras que no expresaron GFAP (**Fig. 1A'**) y ChAT (**Fig. 1C'**) y VAcHT (**Fig. 1C'**). Luego del proceso de transdiferenciación, las células NC mantuvieron su expresión de MAP2 (**Fig. 1D'**). Se ha demostrado que este anticuerpo es capaz de identificar las 3 isoformas de MAP2, por lo que puede identificar desde neuronas inmaduras, hasta formas maduras en donde MAP2 se localiza en dendritas (204). En el caso de TUB III, esta molécula se expresó en una proporción similar de células, pero con una menor intensidad de fluorescencia (**Fig. 1E'**). Por su parte, la proporción de células que expresaron NF-L aumentó a 67.9% (**Fig. 1E'**). Interesantemente, se evidenció el incremento del marcador neural acetilcolinérgico de la enzima acetil colina transferasa (enzima específica de las neuronas colinérgicas, Choline Acetyltransferase (ChAT)), y de la VAcHT (Vesicular Choline Acetyltransferase transporter), en todas las células en un 100% (**Fig. 1F'** y **F'** respectivamente). Entretanto, las NC para el marcador específico de linaje de células glía GFAP fueron negativas (**Fig. 1D'**). Estos resultados nos indican que las CEM-CU fueron exitosamente transdiferenciadas en Neuronas colinérgicas (NC).

### 8.2 Efecto tóxico del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en NC

Como primera aproximación investigativa se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de las concentraciones utilizadas y los estudios cinéticos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferentes modelos *in vitro*, con el objetivo de determinar la concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para nuestro modelo de EO en NC. En la (**Tabla 3**) se resumen los datos de las referencias bibliográficas: el título del artículo, el autor principal, el año de la investigación, las células utilizadas como modelo, las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evaluadas y el tiempo de exposición.

#### 8.2.1 El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 µM induce alteraciones del ΔΨ<sub>m</sub> en NC

En primer lugar, nos interesamos en evaluar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria de las NC, como se muestra en la **Figura 2**. Las NC tratadas con las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generan una alteración sobre el ΔΨ<sub>m</sub> de una manera concentración dependiente. La concentración de 50 µM alteró de manera leve el potencial de membrana mitocondrial (**Fig. 2B' - Fig. 2F**); y a partir de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó una alteración del ΔΨ<sub>m</sub> de NC (**Fig. 2C' - E' y Fig. 2F**). En este sentido, una vez demostrada la alteración mitocondrial, nos propusimos evaluar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre DJ-1, una proteína multifuncional sensible a oxidación – reducción.



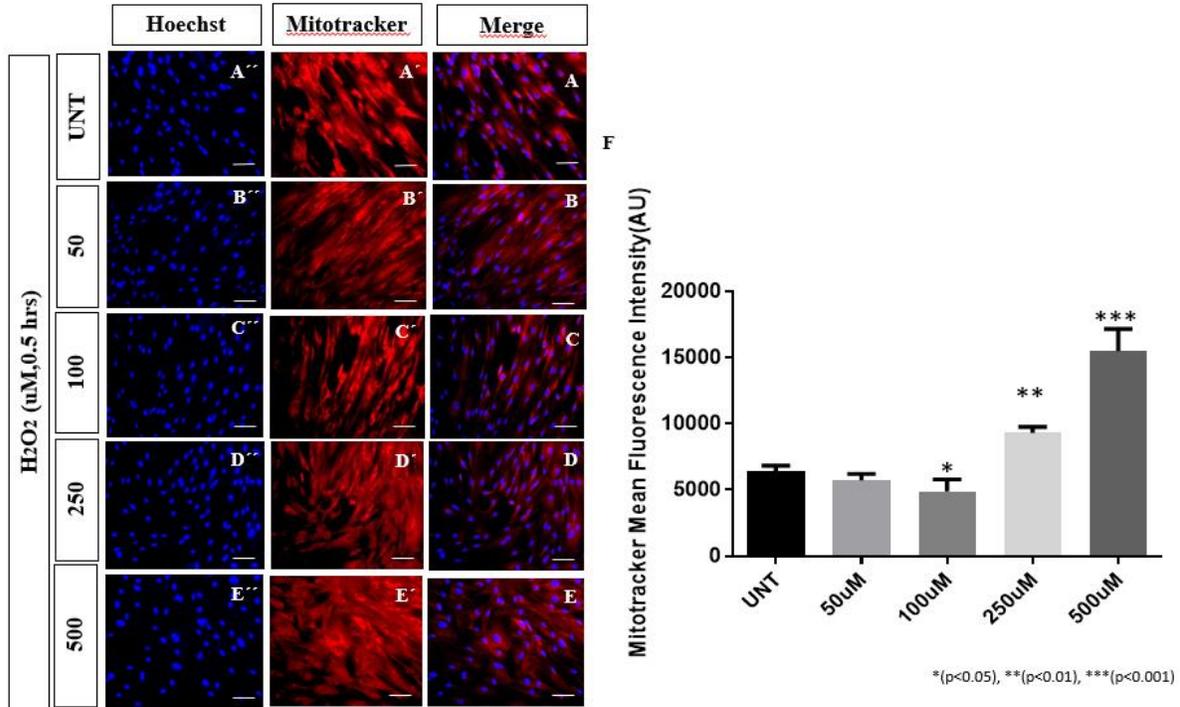
**Figura 1. Transdiferenciación de CEM-GW-CU en Neuronas Colinérgicas (NC).** Las CME-GW-CU se cultivaron en medio de diferenciación colinérgica como se describe en la sección Materiales y métodos durante 7 días. Las fotografías **A''''**, **B''''**, **C''''** muestran los núcleos teñidos de azul con Hoechst 33342 de las CME-CU sin diferenciar (día 0) y las fotografías **D''''**, **E''''**, **F''''** las diferenciadas (día7). Las CME-CU muestran positividad para el marcador precursor neuronal MAP-2 (**A''**) y  $\beta$ -tubulina III (**B''**); y negatividad para el marcador de las células de la glía GFAP (**A'**), de madurez neuronal, neurofilamento (NF-L) (**B'**), ChAT (**C'**) y VAcHT (**C'**). Mientras que las NC muestran positividad para la mayoría de los marcadores MAP-2,  $\beta$ -tubulina III, ChAT, NF-L y VAcHT (**D''**, **E''**, **F''**, **E'**, **F'** respectivamente), excepto para el marcador de las células de la glía GFAP (**D'**). Las imágenes representan uno de tres experimentos realizados independientemente.

**Tabla 3. Concentraciones y cinética del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas en diferentes modelos celulares**

Título	Autores	Año	Células utilizadas	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	Tiempo
Interaction between Protein Kinase C δ and the c-Abl Tyrosine Kinase in the Cellular Response to Oxidative Stress	Sun, et al.	1999	COS7	3mM	15 minutos
Activation of the Cytoplasmic c-Abl Tyrosine Kinase by Reactive Oxygen Species	Sun, et al.	2000	COS7 y DLD1	1mM	15 minutos
Targeting of the c-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in the Necrotic Cell Death Response to Oxidative Stress	Kumar, et al.	2001	U-937, MEFs y MCF-7	1mM	15m-3hr/30m-1h/1h-3h
Functional Interaction between the c-Abl and Arg Protein-tyrosine Kinases in the Oxidative Stress Response	Cao, et al.	2003	MEFs y MCF-7	0, 10, 40, 160 y 640 μM	3hrs
Catalase Activity Is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response	Cao, et al.	2003	U-937 y MCF-7	0,0.25, 0.5, 1 y 2mM	2hrs
Abrogation of the Cell Death Response to Oxidative Stress by the c-Abl Tyrosine Kinase Inhibitor STI571	Kumar, et al.	2003	MEFs	1mM	1hr
Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-β-peptide and reactive oxygen species	Álvarez, et al.	2004	Neuronas de hipocampo	100uM	15-240 min
Tyrosine 394 Is Phosphorylated in Alzheimer's Paired Helical Filament Tau and in Fetal Tau with c-Abl as the Candidate Tyrosine Kinase	Derkinderen, et al.	2005	COS7	4mM	20 min
Interaction between c-Abl and Arg Tyrosine Kinases and Proteasome Subunit PSMA7 Regulates Proteasome Degradation	Liu, et al.	2006	MCF-7	0,0.25, 0.5, 1 y 2mM	3 hr
Cooperative Roles of c-Abl and Cdk5 in Regulation of p53 in Response to Oxidative Stress	Lee, et al.	2008	Células de neuroblastoma (SH-SY5Y)	200uM	1hr
The c-Abl-MST1 Signaling Pathway Mediates Oxidative Stress-Induced Neuronal Cell Death	Xiao, et al.	2011	SH-SY5Y y células de hipocampo de ratón (HT-22)	200uM/0-100uM	1hr/12hr
The role of reciprocal activation of cAbl and Mst1 in the oxidative death of cultured astrocytes	Lee, et al.	2014	Cultivo astrocitos corticales	170uM (inducción muerte celular)	Toda la noche
Reactive oxygen species trigger motoneuron death in non-cell-autonomous models of ALS through activation of c-Abl signaling	Rojas, et al.	2015	Astrocitos/Neuronas motoras/Interneuronas	200uM	20 min
c-Abl-mediated Drp1 phosphorylation promotes oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and neuronal cell death	Zhou, et al.	2017	Neuronas corticales primarias/SH-SY5Y	100uM/1uM	30min/1hr
Oxidative stress-induced chromosome breaks within the ABL gene: a model for chromosome rearrangement in nasopharyngeal carcinoma	Tan, et al.	2018	NP69	0-100uM	16-24hr

### 8.2.2 El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 μM induce oxidación de la proteína DJ-1 en NC

Como se muestra en la **Figura 3**, en las NC tratadas con las diferentes dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se indujo la oxidación de DJ-1, el cual es un sensor de EO. Mediante la tinción con el anticuerpo primario contra DJ-1 oxidado, se demostró que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa EO en NC de una manera concentración-dependiente a partir de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o con valores superiores (**Fig. 3C'-E'** y **Fig. 3F**). El aumento de DJ-1 oxidado fue estadísticamente significativo en comparación con las células no tratadas, siendo de aproximadamente 7.5 veces más con 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 13.9 veces más con 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



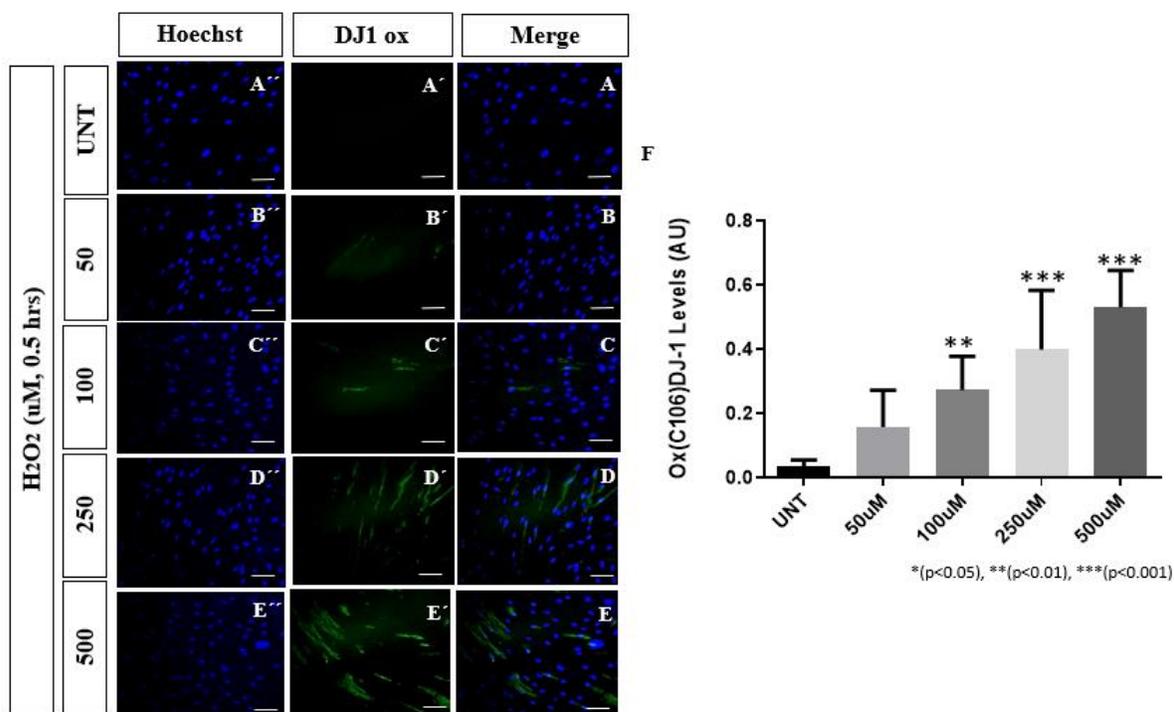
**Figura 2.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones superiores a 100 μM altera moderadamente el ΔΨ<sub>m</sub> de las NC. Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a concentraciones incrementales de 0 a 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0,5 hrs. Las microfotografías A'' - E'' muestran núcleos de las NC teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A' - E' muestran imágenes representativas con el marcaje de la sonda de mitotracker que evidencian alteraciones del potencial de membrana mitocondrial (fluorescencia roja opaca) (ΔΨ<sub>m</sub>) en NC. La gráfica (F) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la sonda mitotracker en NC previamente expuestas a concentraciones de 0 a 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0,5 hrs. Las imágenes representan microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\* (p<0.001).

### 8.2.3 El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 μM induce la activación de la proteína c-Abl en NC

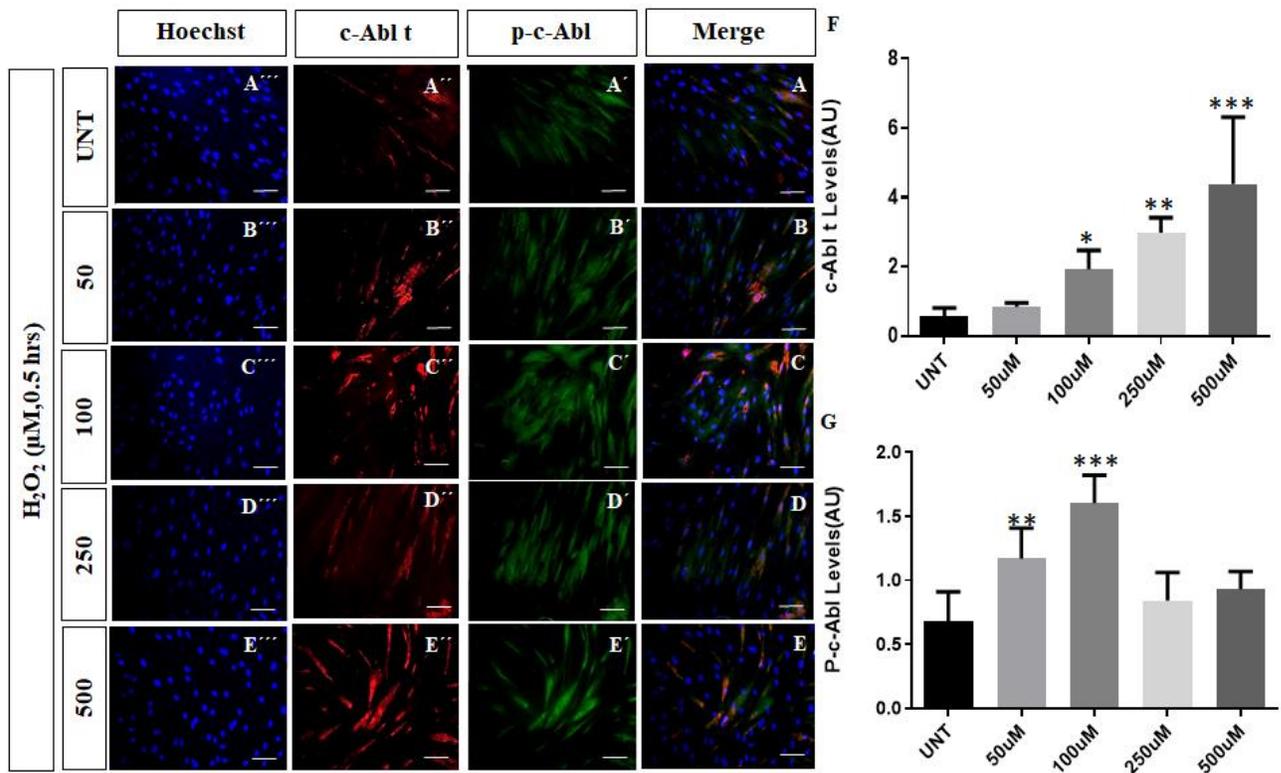
Con el propósito de determinar si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducía la activación de c-Abl, se evaluó las NC expuestas a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0.5hrs. Como se observa en la **Figura 4** se evidencia el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los niveles de c-Abl total y fosforilado en el residuo tirosina 412 (c-Abl-p-Y412). Al igual que para DJ1 oxidado, las concentraciones mayores de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentaron significativamente los valores totales de c-Abl cuando se compararon con NC no tratadas (**Fig. 4C'' - E''** y **Fig. 4F**). En relación con la activación de c-Abl, esta molécula fosforilada presentó un pico máximo con 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en NC (**Fig. 4C'** y **Fig. 4G**), el cual disminuyó con concentraciones mayores, alcanzando valores similares a los observados con células no tratadas (**Fig. 4A', D' - E'** y **Fig. 4G**).

Por la razón anteriormente mencionada elegimos la concentración de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la realización de los siguientes experimentos, ya que a partir de esta concentración se

observan cambios drásticos en las NC como la disminución del 50 % del  $\Delta\Psi_m$  (**Fig. 2C' - E'** y **Fig. 2F**), aumento del DJ-1 oxidado en el residuo -Cys106SO<sub>3</sub> de ~7.5-f.c y un aumento de c-Abl-p de ~1.3-f.c, asociados con EO.



**Figura 3. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones iguales o superiores a 100 μM inducen la oxidación del DJ-1 en NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a concentraciones de 0 a 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0,5 hrs. Las microfotografías A''-E'' muestran los núcleos de las NC teñidos con Hoechst 33342 mientras que las microfotografías A'-E' muestran imágenes representativas con marcaje con el anticuerpo primario contra DJ-1 oxidado que evidencian el EO en NC. La gráfica (F) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del DJ-1 oxidado en NC previamente expuestas a concentraciones de 0 a 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0,5 hrs. Las imágenes representan microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).



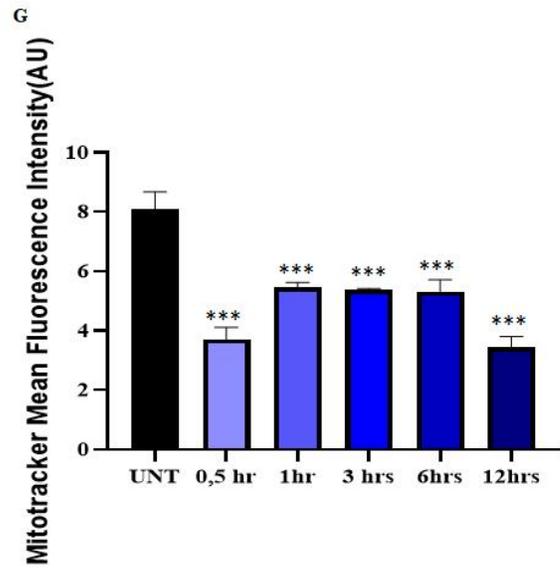
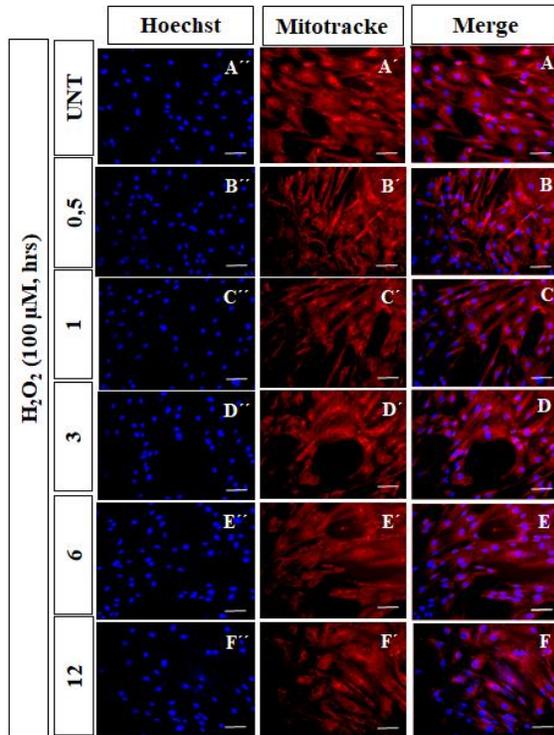
**Figura 4. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100μM induce el máximo pico de activación de c-Abl-p-Y412 en NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a concentraciones de 0 a 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0,5 hrs. Las microfotografías A'''-E''' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías de A''-E'' representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra c-Abl total y A'-E' con el anticuerpo primario contra c-Abl fosforilado. Las gráficas (F-G) muestran la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de c-Abl total y fosforilado respectivamente, en NC previamente expuestas a concentraciones de 0 a 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 0,5 hrs. Las imágenes representan microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\* (p<0.001).

### 8.3 Exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes intervalos de tiempo en NC

Con el propósito de determinar en qué momento el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración seleccionada de 100 μM, induce la alteración del ΔΨ<sub>m</sub>, la oxidación de la proteína DJ1, la activación de c-Abl y caspasa 3 en NC. Las NC fueron expuestas a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por diferentes intervalos de tiempo desde 0; 0,5; 1; 3; 6 hasta 12 hrs.

#### 8.3.1 La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes intervalos de tiempo induce alteración del ΔΨ<sub>m</sub> en NC.

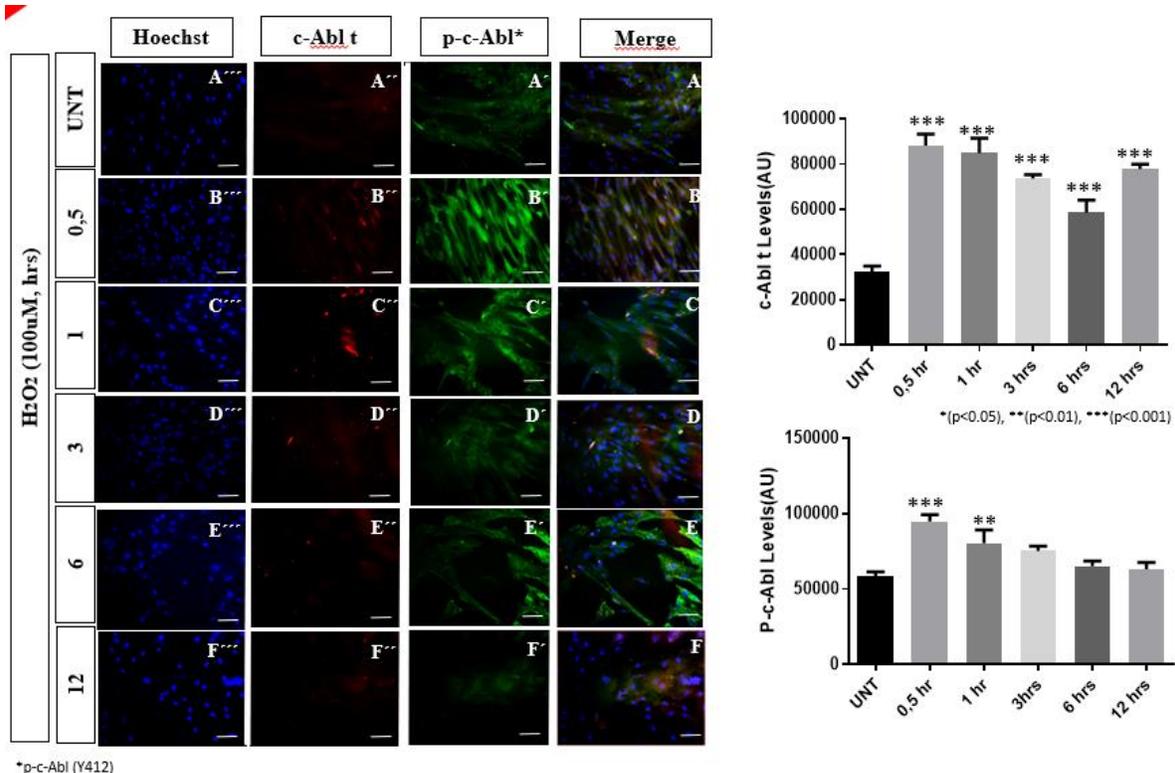
Como se observa en la **Figura 5**, las NC tratadas con 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evidenciaron una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ<sub>m</sub>) en los intervalos de tiempo evaluados desde 0,5; 1; 3; 6 hasta 12 hrs, encontrándose diferencias estadísticamente significativas al comparar las NC tratadas con las no tratadas (UNT) (**Fig. 5B'-F'** y **Fig. 5G**).



**Figura 5.** La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) a diferentes intervalos de tiempo induce una reducción del  $\Delta\Psi_m$  en NC. Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a una concentración de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se evaluó el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a las 0,5; 1; 3; 6 y 12 horas. Las microfotografías A''- F'' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A' - F' representan las NC que fueron teñidas con la sonda mitotracker. La gráfica (G) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del mitotracker en NC previamente expuestas a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los diferentes tiempos. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

### 8.3.2. La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5 hrs induce el valor máximo de la activación de c-Abl en NC.

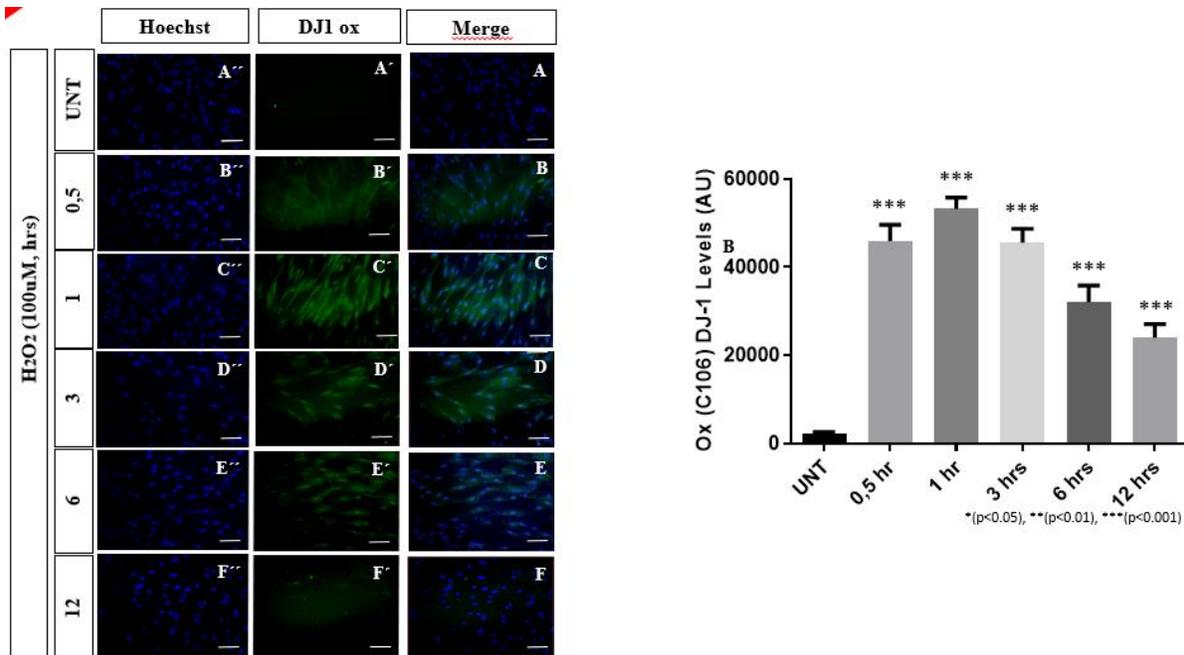
Como se muestra en la **Figura 6**, las NC tratadas con 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentaron los niveles de c-Abl total en los intervalos de tiempo evaluados desde 0,5; 1; 3; 6 hasta 12 hrs estadísticamente significativo comparadas con las NC no tratadas (**Fig. 6B'' - F''** y **Fig. 6G**). Sin embargo, en la activación de c-Abl p-Y412, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvo un efecto transitorio, induciendo un nivel máximo de fosforilación a las 0,5 hrs (30 minutos) (**Fig. 6B'** y **Fig.6H**).



**Figura 6. La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) a 0,5 hrs induce el valor máximo de activación de c-Abl-p-Y412 en NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se evaluó la activación de la proteína quinasa c-Abl a los 0,5; 1; 3; 6 y 12 horas. Las microfotografías A'''- F''' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A''- F'' representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra c-Abl total y A'-F' con el anticuerpo contra el c-Abl fosforilado. Las gráficas (G-H) muestran la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del c-Abl total y fosforilado respectivamente, en NC previamente expuestas a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los diferentes tiempos. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

### 8.3.3 La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1 hr induce el valor máximo la oxidación de DJ-1 en NC.

Como se observa en la **Figura 7**, en las NC tratadas con 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue similar a lo observado con c-Abl total. A partir de las 0,5 hrs se vio un aumento estadísticamente significativo que se mantuvo hasta las 12 horas, cuando se comparó con las NC sin tratar (**Fig. 7B'- F'** y **Fig. 7G**).

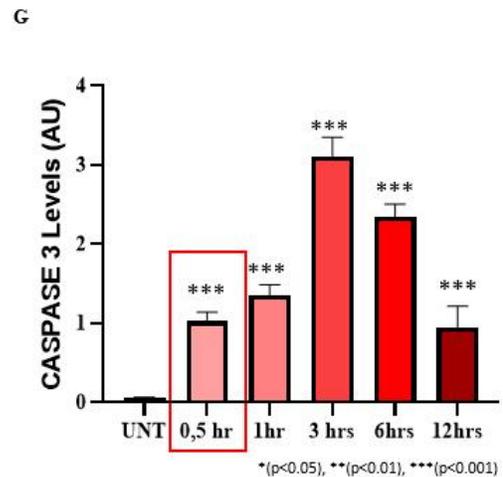
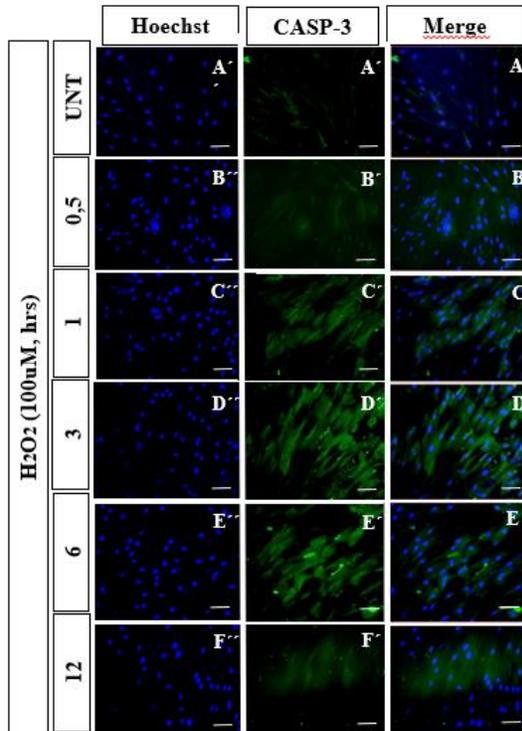


**Figura 7. La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) una 1 hr induce el valor máximo de oxidación de DJ-1 en NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a una concentración de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se evaluó la oxidación de DJ-1 a los 0,5; 1; 3; 6 y 12 horas. Las microfotografías A''- F'' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A' - F' representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra DJ-1-oxidado. La gráfica (G) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del DJ-1-oxidado en NC previamente expuestas a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los diferentes tiempos. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\* (p<0.001).

### 8.3.4 La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1 hrs induce el valor máximo la activación de caspasa 3 en NC.

Interesantemente, como se observa en la **Figura 8**, en las NC tratadas con 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó la activación de la caspasa 3 con valores estadísticamente significativos cuando se compara con las NC no tratadas, alcanzado valores máximos a las 1 hrs de tratamiento, luego de las cuales, los niveles de caspasa 3 disminuyen a niveles similares a los observados a las 0,5 hrs (**Fig. 8B' - F'** y **Fig. 8G**).

Con base en estos hallazgos, se seleccionó el intervalo de tiempo de 0,5 hrs (30 minutos) post tratamiento con 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para los experimentos siguientes, ya que a partir de este intervalo de tiempo se observan cambios asociados con la activación de c-Abl, EO y con la activación de marcadores de muerte como caspasa 3 en las NC. Específicamente, los cambios que ocurrieron muy tempranamente post exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron una disminución del ΔΨ<sub>m</sub> de ~-0.4-f.c, el aumento de la activación de c-Abl-p de ~0.6-f.c, y posteriormente a la hora un aumento de la proteína DJ-1oxidada-Cys106SO<sub>3</sub> de ~19-f.c, y un aumento de caspasa 3 de ~7.9-f.c.



**Figura 8. La exposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) 3 hr induce el valor máximo de la activación de caspasa 3 en NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a una concentración de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se evaluó la activación de la caspasa 3 a las 0,5; 1; 3; 6 y 12 horas. Las microfotografías A''' - F''' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A' - F' representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra CASP-3. La gráfica (G) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de caspasa 3 en NC previamente expuestas a 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los diferentes tiempos. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\* (p<0.01), \*\*\* (p<0.001).

#### 8.4. Efecto neuroprotector de los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) en función del ΔΨ<sub>m</sub>, la activación de la proteína c- Abl, la oxidación DJ-1 y la activación de la caspasa 3 en NC.

Con el conocimiento que el nilotinib ha sido postulado como un neuroprotector que puede restaurar la memoria en modelos de la EA (205), decidimos evaluar el efecto del nilotinib en las NC.

##### 8.4.1 El nilotinib es inocuo a concentraciones menores o iguales a 25nM en las NC.

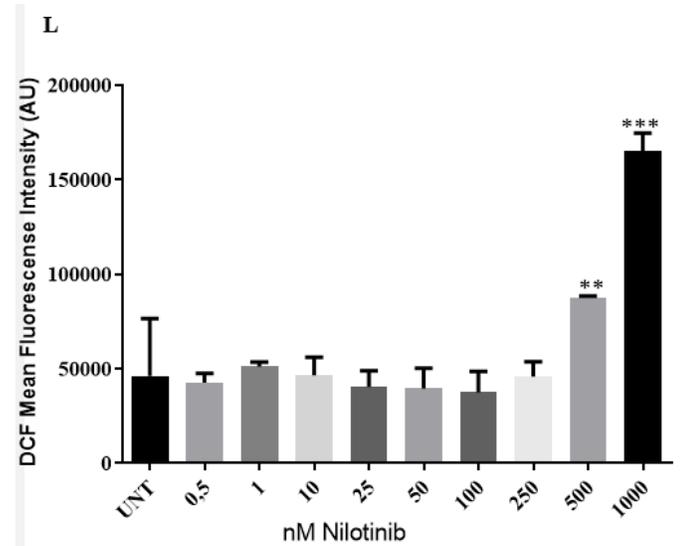
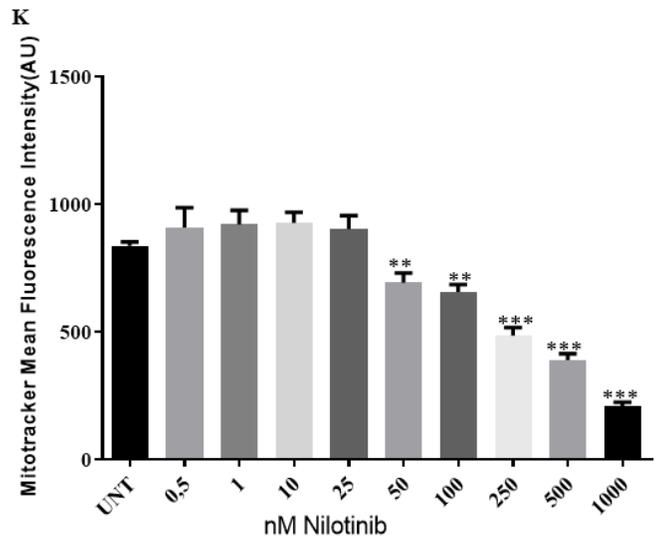
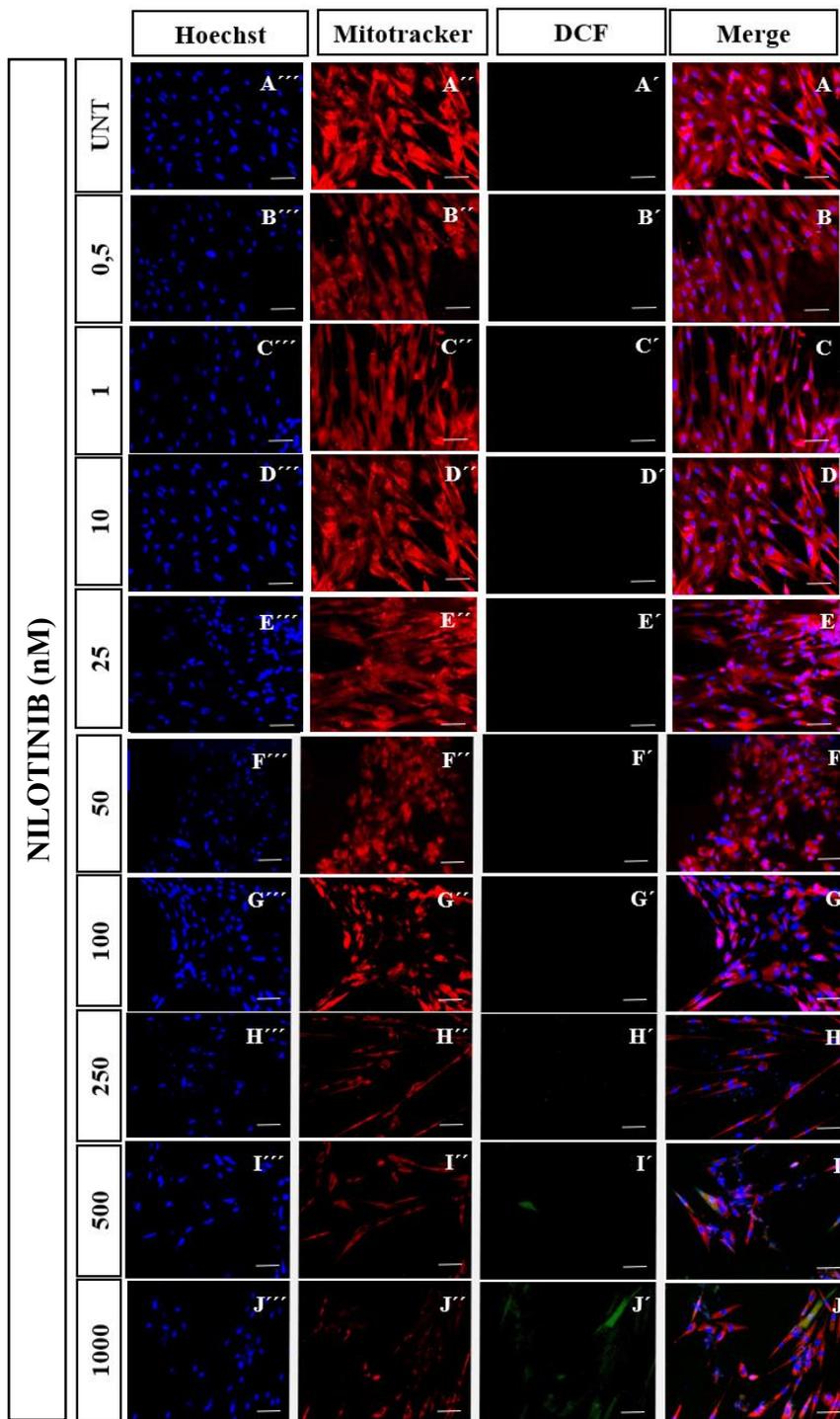
Como se observa en la **Figura 9**, las NC expuestas a concentraciones crecientes de 0,5 - 1000 nM de nilotinib por 4 días no mostraron, de acuerdo con las tinciones con Hoechst (**Figura 9 A''' - J'''**), MitoTracker (**Figura 9 A'' - J''**), y DCF (**Figura 9 A' - J'**), cambios morfológicos, ni nucleares por campo con respecto al control a concentraciones menores o iguales a 25nM del inhibidor (**Figura 9 A''' - E'''**, **A'' - E''**, **A' - E'**).

#### **8.4.2 El nilotinib mantiene el $\Delta\Psi_m$ , no genera EROs y regula caspasa 3 en NC.**

En la **Figura 9** se puede observar el efecto de las diferentes concentraciones de nilotinib sobre el  $\Delta\Psi_m$  y la producción de EROs. A partir del tratamiento con concentraciones incrementales de 50 nM de nilotinib se observó una disminución del potencial de membrana mitocondrial en NC (**Fig. 9F''- J''** y **Fig. 9K**). Estas alteraciones fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con las células no tratadas, donde la alteración fue mayor a concentraciones de 1000 nM del inhibidor, como era esperado. Sin embargo, la producción de EROs no se vio alterada en las NC, donde solo se observaron cambios cuando las células fueron tratadas con la concentración más elevada del nilotinib de 1000 nM (**Fig. 9J'** y **Fig. 9L**).

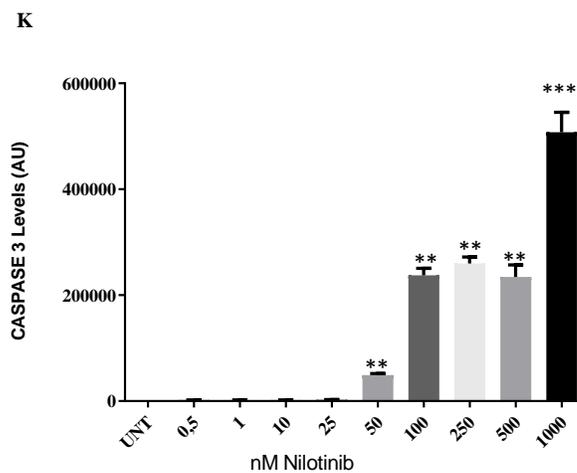
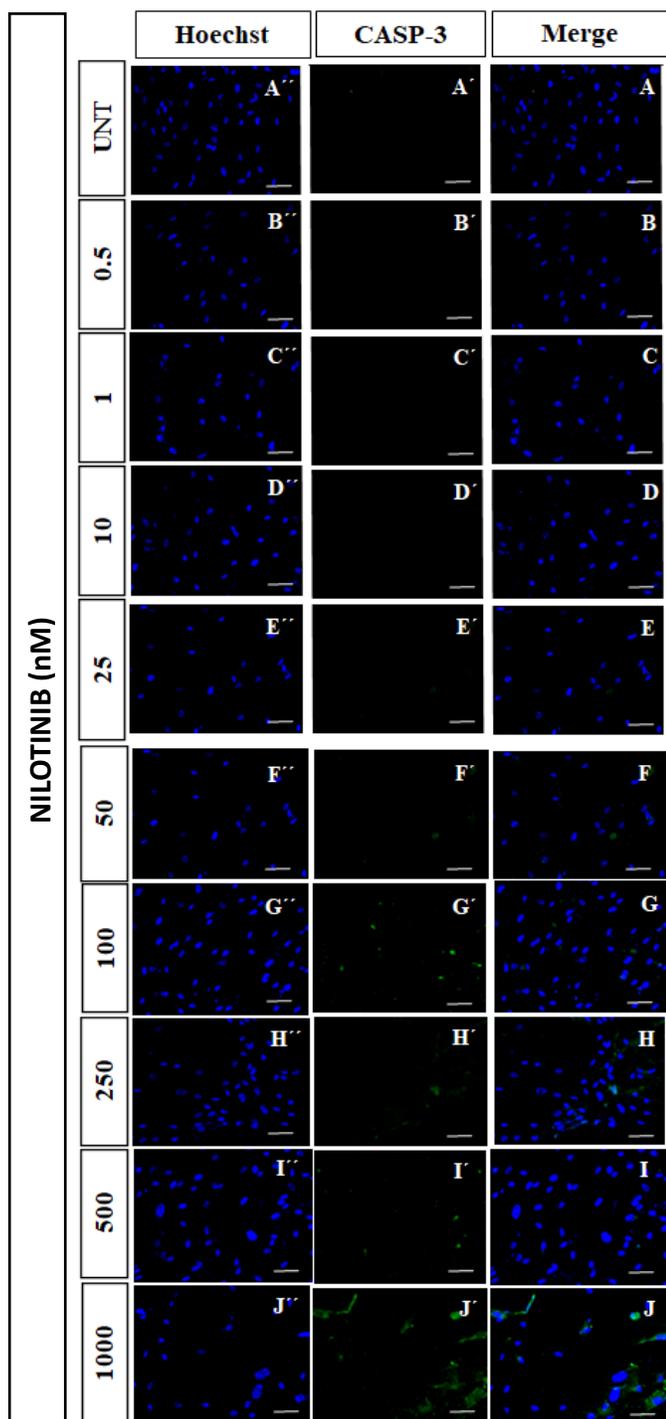
Adicionalmente, en la **Figura 10** se observa el efecto de nilotinib a diferentes concentraciones en función de la activación de caspasa 3, la cual es activada en procesos de muerte celular. Se evidenció que NC tratadas con nilotinib a concentraciones iguales o superiores de 50 nM aumentaron los niveles de CASPASA 3 (CASP3), que fueron estadísticamente significativos en comparación con las NC no tratadas. Los niveles de activación proteína CASP3 fueron incrementándose a partir de concentraciones de 50 nM y el aumento fue mayor en concentraciones de 100, 250 y 500 nM, alcanzando su valor máximo a concentraciones de 1000 nM (**Fig. 10F'- J'** y **Fig. 10F**).

Con base en estos resultados, elegimos la concentración de 25 nM de nilotinib para los experimentos posteriores, tanto para este inhibidor como para los otros inhibidores de tirosina quinasa, ya que concentraciones menores o iguales a 25nM no se observaron cambios asociados con citotoxicidad, aunque estudios adicionales con los otros inhibidores a concentraciones menores de 25nM y mayores se sugieren para confirmar su efectividad e inocuidad.



**Figura 9. El nilotinib a concentraciones menores e iguales a 25 nM son inocuas para las NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a concentraciones desde 0 nM a 1000 nM de nilotinib y se evaluó el  $\Delta\Psi_m$  y la producción de EROs después de 4 días. Las microfotografías A'''- J''' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342,

mientras que las microfotografías A'' - J'' representan las NC que fueron teñidas con la sonda mitotracker y A'-J' con la sonda DCF. Las gráficas (K-L) muestran la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de mitotracker y DCF respectivamente, en NC previamente expuestas a concentraciones de 0 a 1000 nM de nilotinib por 4 días. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media ± SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*\*(p<0.001).



**Figura 10. El nilotinib a concentraciones menores de 50 nM regulan la activación de caspasa 3 en NC.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a concentraciones desde 0 nM a 1000 nM de nilotinib y se evaluó la activación de caspasa 3 después de 4 días. Las microfotografías **A''- J''** muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías **A' - J'** representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra CASP-3. La gráfica (**K**) muestran la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de caspasa 3 en NC previamente expuestas a concentraciones de 0 a 1000 nM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4 días. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La “media ± SD” se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

### **8.5. Los ITKs (imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib y ponatinib) protegen a las NC expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

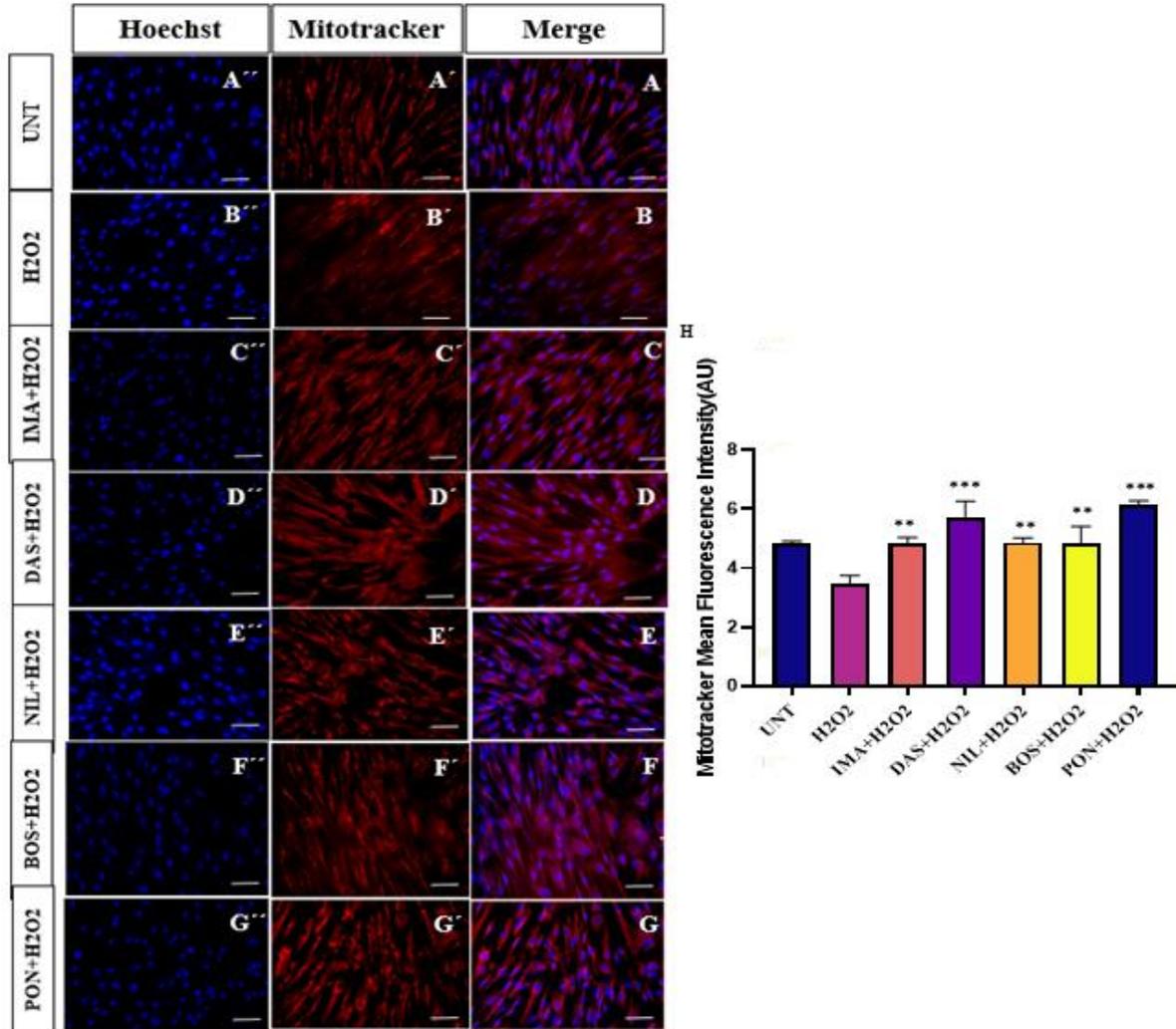
Una vez establecido el protocolo experimental de inducción de activación del c-Abl por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en NC y seleccionada la concentración inocua del nilotinib de 25nM, como ITKs con mayor capacidad neuroprotectora de los ITKs y evaluadas las condiciones necesarias para nuestro modelo de EO con activación de c-Abl en neuronas colinérgicas, nos interesamos en evaluar si los ITKs protegían a las NC del daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con este propósito las NC fueron tratadas con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en combinación con 25 nM de cada ITK por 0,5 hrs y se determinó el efecto de cada inhibidor en el potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\Psi_m$ , la oxidación de DJ1 y la activación de c-Abl.

#### **8.5.1. Los ITKs restauran y mantienen el $\Delta\Psi_m$ contra el EO inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en NC.**

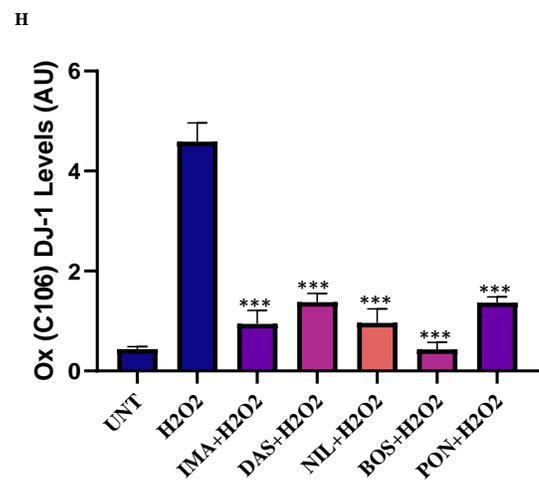
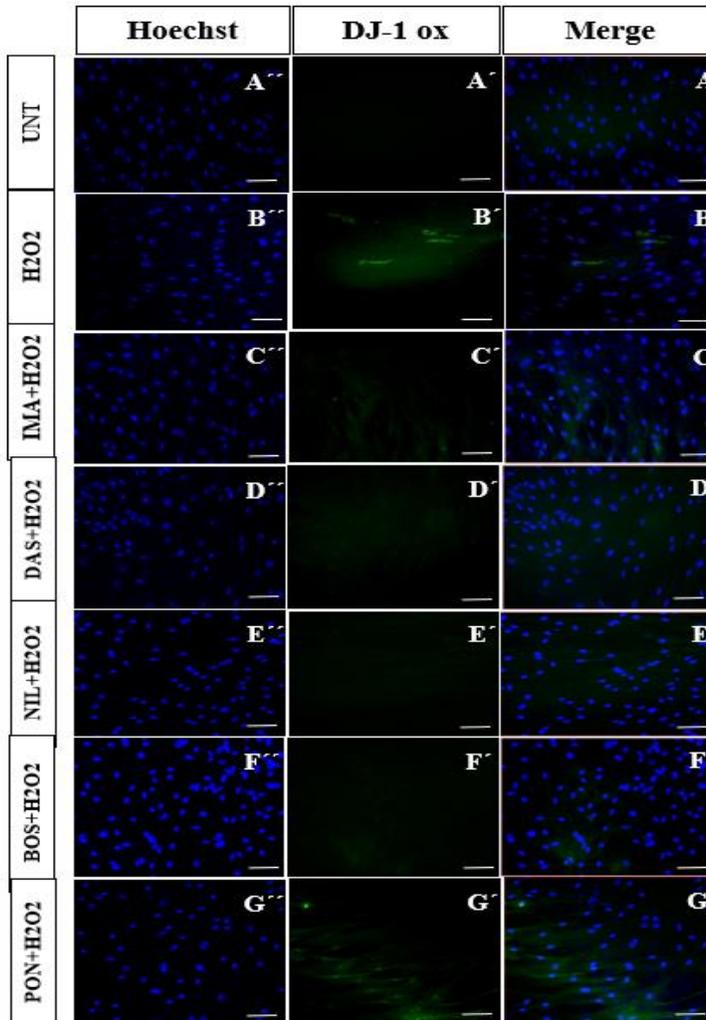
En la **Figura 11** se puede observar el efecto de los diferentes ITKs sobre el  $\Delta\Psi_m$  de NC en condiciones de EO. Como se había observado previamente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera el potencial de membrana mitocondrial en NC (**Fig. 11B'**). Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y simultáneamente con cada uno de los inhibidores, esta alteración no fue observada (**Fig. 11C' - G'**). Cuando se comparan los niveles de mitotracker, se observó que los cinco inhibidores evaluados restauraron el potencial de membrana de las NC manera estadísticamente significativa (**Fig. 11H**). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre las NC no tratadas y las NC tratadas en presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los ITKs.

#### **8.5.2. Los ITKs disminuye los niveles del sensor de EO, la proteína DJ-1 oxidada en NC.**

Con el objetivo de evaluar el efecto de los ITK en función de la oxidación de DJ-1, las NC fueron cultivadas en presencia de 25nM de los 5 ITKs y expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la **Figura 12** se muestra que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevó el nivel de DJ-1 oxidado (**Fig. 12B'**), pero que cuando las NC se incubaron con cada uno de los diferentes ITKs y expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los niveles de la proteína DJ-1 oxidado fueron reducidos a valores similares de NC no tratadas (**Fig. 12C' - G'**). Esta disminución fue estadísticamente significativa, con niveles de DJ-1 oxidado equiparables a los observados en NC no tratadas (**Fig. 12H**), siendo los ITKs más eficaces con un valor mayor en la disminución los inhibidores de quinasa bosutinib y nilotinib.



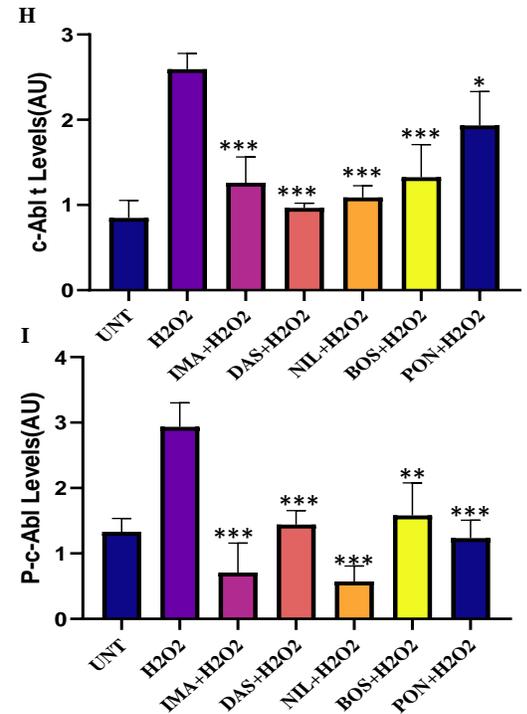
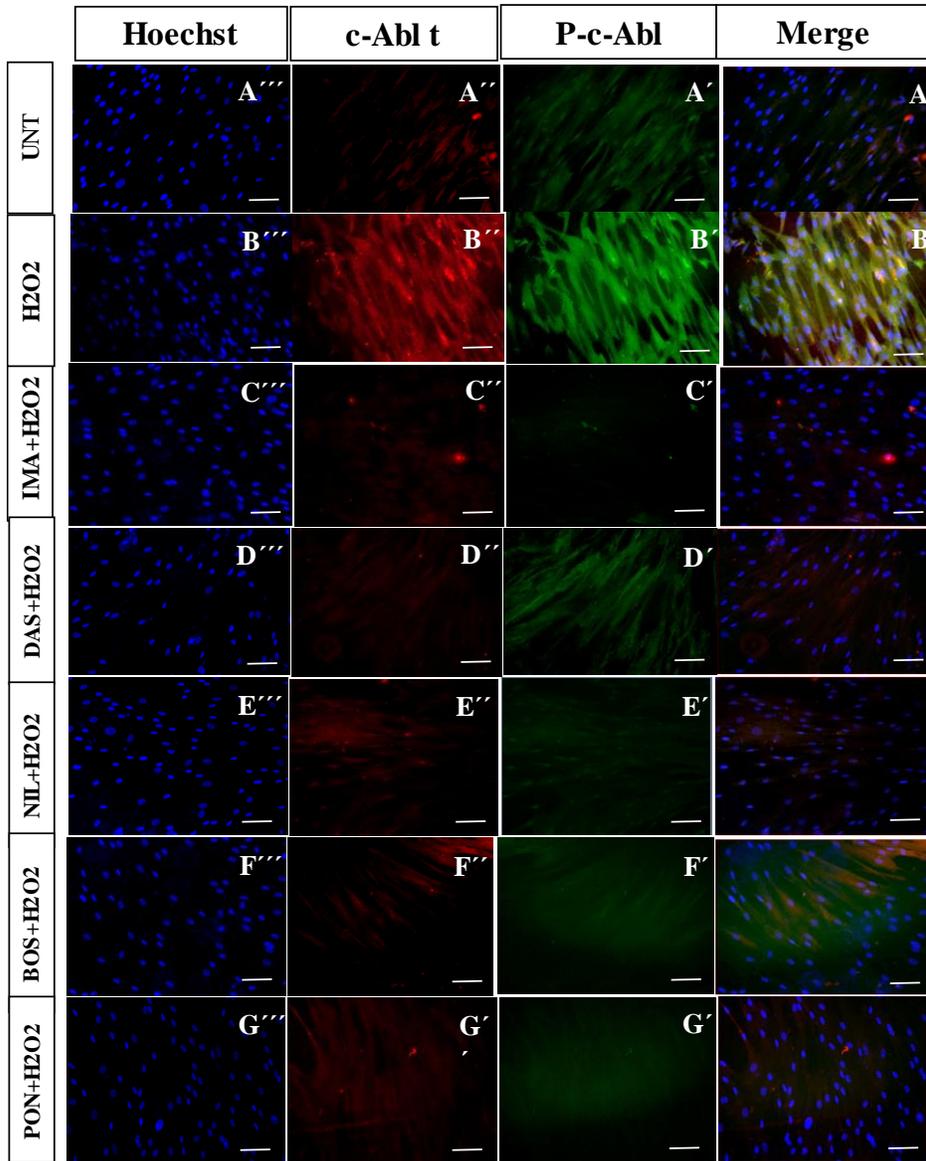
**Figura 11. Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) restauran el  $\Delta\Psi_m$  de las NC expuestas al  $H_2O_2$ .** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a una concentración de 25 nM de cada inhibidor (imatinib (IMA), dasatinib (DAS), nilotinib (NIL), bosutinib (BOS), ponatinib (PON)) acompañado de 100  $\mu M$  durante 0,5 hrs (30 minutos) y se evaluó el potencial de membrana mitocondrial. Las microfotografías **A'' - G''** muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías **A' - G'** representan las NC que fueron teñidas con sonda mitotracker. La gráfica (**H**) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de mitotracker en NC previamente expuestas a 25 nM de IMA, DAS, NIL, BOS o PON más 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$  durante 0,5 hrs. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media  $\pm$  SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).



**Figura 12. Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) reducen la oxidación de DJ-1 de las NC expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a una concentración de 25 nM de cada inhibidor (imatinib (IMA), dasatinib (DAS), nilotinib (NIL), bosutinib (BOS), ponatinib (PON)) acompañado de 100  $\mu$ M durante 0,5 hrs (30 minutos) y se evaluó la oxidación de DJ-1. Las microfotografías A'' - G'' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A' - G' representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra DJ-1-oxidado. La gráfica (H) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de DJ-1-oxidado en NC previamente expuestas a 25 nM de IMA, DAS, NIL, BOS o PON más 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 0,5 hrs. Las imágenes son microfotografías representativas de uno de tres experimentos realizados independientemente. La "media  $\pm$  SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

### 8.5.3. Los ITKs reducen los niveles de la proteína c-Abl fosforilada en NC.

Con los previos hallazgos que los ITKs reducen el EO reflejado en la disminución de los niveles de DJ-1 oxidado nos propusimos evaluar su efecto en la reducción de los niveles de c-Abl-p en condiciones de EO; como se muestra en la **Figura 13** las NC cultivadas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaron aumento en los niveles de c-Abl total (**Fig. 13B''**) y fosforilado-Y412 (**Fig. 13B'**), mientras que en las NC cultivadas en presencia de 25nM de cada uno de los inhibidores expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los niveles de c-Abl total (**Fig. 13C''-G''**) y fosforilado (**Fig. 13C'-G'**) fueron reducidos de manera estadísticamente significativa (**Fig. 13H, I**). Si bien todos los inhibidores reducen los niveles de c-Abl total, este efecto se vio más marcado con los inhibidores dasatinib, nilotinib e imatinib (**Fig. 13H**). Interesantemente, también todos los inhibidores redujeron la activación de c-Abl-p, pero los más potentes fueron el nilotinib y el imatinib que tuvieron un efecto más marcado (**Fig. 13I**). El ponatinib, tuvo un efecto moderado en los niveles de c-Abl total (**Fig. 13H**), a diferencia del c-Abl-p que lo redujo a valores similares al control (NC no tratadas).



**Figura 13. Los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) reducen la activación de c-Abl-p-Y412 en las NC expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Después de 7 días de transdiferenciación, las NC fueron expuestas a una concentración de 25 nM de cada inhibidor (imatinib (IMA), dasatinib (DAS), nilotinib (NIL), bosutinib (BOS), ponatinib (PON)) acompañado de 100  $\mu$ M durante 0,5 hrs (30 minutos) y se evaluó la activación de c-Abl. Las microfotografías A''' - G''' muestran los núcleos de las NC que fueron teñidos con Hoechst 33342, mientras que las microfotografías A'' - G'' representan las NC que fueron teñidas con el anticuerpo primario contra c-Abl total y A' - G' con el anticuerpo contra el c-Abl fosforilado p 4. Las gráficas (H-I) muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del c-Abl total y fosforilado respectivamente, en NC previamente expuestas a 25 nM de IMA, DAS, NIL, BOS o PON más 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 0,5 hrs. Las imágenes son representativas de uno de los tres experimentos realizados independientemente. La "media  $\pm$  SD" se presenta como la media de la desviación estándar de los datos. \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

Con estos resultados podemos concluir que el tratamiento con imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib o ponatinib evitan las alteraciones sobre el  $\Delta\Psi_m$ , la oxidación de DJ-1 y la activación de c-Abl de las NC expuestas al  $H_2O_2$ . Los inhibidores bosutinib nilotinib e imatinib fueron los más efectivos en la reducción de DJ-1 oxidada-Cys106SO<sub>3</sub> ( $\sim$ -0.91-f.c,  $\sim$ -0.87-f.c y  $\sim$ -0.86-f.c respectivamente), mientras que nilotinib, imatinib y ponatinib fueron los más efectivos en la reducción de la activación de c-Abl ( $\sim$ -0.80-f.c,  $\sim$ -0.68-f.c y  $\sim$ -0.54-f.c respectivamente).

## CAPÍTULO 9: DISCUSIÓN

En este estudio se estableció por primera vez en el laboratorio un protocolo de detección de la activación de la c-Abl-fosforilada (c-Abl-p Y412) inducida por EO, específicamente por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en un modelo neuronal colinérgico de la EA con aplicación en la regulación de la proteína c-Abelson como diana terapéutica en la EA.

Interesantemente, se ha identificado una asociación entre el EO y la proteína tirosina quinasa c-Abl en enfermedades neurodegenerativas. Se ha evidenciado que el EO puede activar a c-Abl en células neuronales, desencadenar diversas cascadas de señalización celular que van desde la regulación de la actina del citoesqueleto, regulación del ciclo celular en respuesta al EO celular (apoptosis o arresto del ciclo celular) y regulación negativa de las enzimas de defensa antioxidante como la catalasa (165). Además, se ha demostrado que c-Abl está involucrada en la regulación de procesos neuropatológicos claves de la EA, como el procesamiento de APP y la fosforilación directa e indirecta de TAU. Tomando en conjunto los hallazgos anteriormente descritos, se ha postulado a la proteína c-Abl como una excelente candidata de blanco terapéutico para el diseño de tratamientos para la EA.

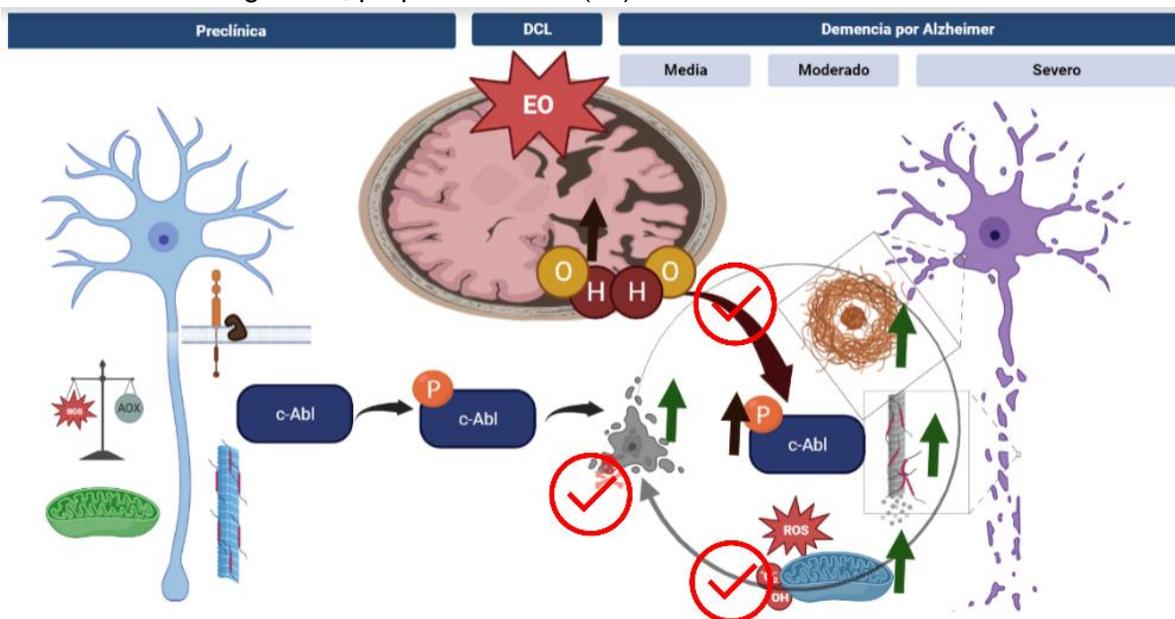
Por lo tanto, es clave contar con un modelo de NC estandarizado de activación de c-Abl que nos permita evaluar el comportamiento de esta molécula en ausencia y presencia de inhibidores de esta quinasa en condiciones de EO. En este estudio se logró establecer, en un modelo neuronal colinérgico derivado de CME-GW-UC, el protocolo de la activación de c-Abl por la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El proceso de transdiferenciación hacia linaje neuronal colinérgico fue exitoso, ya que nuestras células expresaron en un 100% la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y la proteína transportadora de acetilcolina vesicular (VACHT), además de la expresión de altos niveles de marcadores de proteínas neuronales específicas como lo son NF-L, MAP2 y  $\beta$ -tubulina, siendo negativas para el marcador glial GFAP. Estos resultados sugieren que CEM-GW-CU podrían comportarse como células precursoras neuronales (203) con capacidad de transdiferenciación a ectodermo (206). Una vez establecido el protocolo de NC se logró en este modelo la activación de c-Abl inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde nuestros resultados presentan similitudes al estudio realizado por Kumar y colaboradores donde encontraron la presencia de c-Abl a partir los 30 minutos (0,5hrs) post inducción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (207). Adicionalmente, se evidenció que concentraciones de 100uM y superiores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generan eventos de EO que se reflejan en la alteración de  $\Delta\Psi_m$  y la oxidación de la proteína DJ-1. Es importante anotar que la proteína DJ-1 exhibe propiedades de chaperona molecular, proteasa, glioxalasa, y regulador transcripcional que protege a las mitocondrias del EO. Dadas sus propiedades biológicas, el DJ-1 en condiciones de EO aumenta la expresión de dos proteínas de desacoplamiento mitocondrial (UCP 4 y UCP5), que disminuyen el potencial de la membrana mitocondrial y conducen a la supresión de la producción de EROs, optimizando varias funciones mitocondriales y ayudando a la supervivencia de las células neuronales (208). En este sentido, y con el conocimiento de la asociación del EO y la activación de la proteína c-Abelson, se han propuesto los inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) como moléculas efectivas para reducir la activación de c-Abl inducida por el EO.

Al evaluar los ITKs, se logró demostrar que los diferentes inhibidores (imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib y ponatinib) son efectivos para reducir el daño asociado al EO y la activación de c-Abl inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nuestro modelo neuronal colinérgico de EO. En este contexto, se demostró que los 5 inhibidores fueron significativamente capaces de proteger a las NC del daño del  $\Delta\Psi_m$  y disminuir los niveles de c-Abl-p, siendo los más potentes el nilotinib, imatinib y ponatinib ( $\sim$ -0.80-f.c,  $\sim$ -0.68-f.c y  $\sim$ -0.54-f.c respectivamente), comparados con el tratamiento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo, y que los inhibidores nilotinib, imatinib y bosutinib fueron los más efectivos en la reducción significativa de la oxidación de la proteína DJ-1Cys106SO<sub>3</sub> ( $\sim$ -0.91-f.c,  $\sim$ -0.87-f.c y  $\sim$ -0.86-f.c respectivamente), en las NC expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas observaciones están en concordancia con Álvarez y colaboradores (12), en donde se evaluó el efecto del imatinib sobre la actividad de c-Abl en neuronas de hipocampo tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como inductor de EO. Al respecto, se encontró que imatinib previno la muerte neuronal inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (la viabilidad celular a 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 55% comparado con el control, mientras que con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 10  $\mu$ M imatinib fue de 100% comparado con el control). En conjunto, nuestros resultados son compatibles con la postulación de estos inhibidores como moléculas alternativas de reposicionamiento para el tratamiento de la EA (209).

En el caso del  $\Delta\Psi_m$ , el efecto de los ITKs podría ser explicado por el hecho de que c-Abl ejerce una regulación negativa de enzimas involucradas en los sistemas antioxidantes. Por esta razón, la inhibición de c-Abl podría llevar a la restauración del sistema antioxidante, ayudando a establecer el balance oxido-reducción celular. En este aspecto es importante destacar que a pesar de que todos los inhibidores redujeron significativamente la activación de c-Abl, esta reducción fue drástica en los inhibidores tipo II (nilotinib, imatinib y ponatinib), los cuales al unirse a la forma inactiva de c-Abl podrían impedir su fosforilación y posterior activación, a diferencia de los inhibidores tipo I que necesitan que c-Abl este en su forma activa para unirse a la molécula.

Otra de las observaciones importantes es que los ITKs fueron efectivos en reducir la oxidación del DJ-1 en el residuo C106 sensible al EO. Este hallazgo ha sido correlacionado con el incremento en la progresión de la EP, donde el EO juega un papel fundamental y recientemente se ha asociado como un evento temprano de pérdida dopaminérgica en modelos *in vivo* con la EA (205). Por tal motivo, es razonable pensar que la inhibición de c-Abl podría ayudar al restablecimiento del balance oxido-reductor, disminuyendo la oxidación de DJ-1, lo cual podría relacionarse directamente con su función. Es importante resaltar, que los inhibidores bosutinib, nilotinib e imatinib fueron los más efectivos en la reducción de la proteína DJ-1 oxidada- Cys106SO<sub>3</sub>. En el caso particular de bosutinib, esta disminución del DJ-1 oxidado fue de  $\sim$  91%. Según el estudio de Hassanjani, et al. esta efectividad de este ITK bosutinib a concentraciones menores a 10uM, podría ser debida a que el inhibidor disminuye la dimerización de DJ-1 silvestre y mutado (E64D) y evitaba su oxidación a pesar del EO (210). Estas observaciones y nuestros hallazgos (este trabajo) nos permiten sugerir estudios futuros con la utilización de concentraciones menores de 25nM para todos los inhibidores y especialmente para el bosutinib que mostró ser muy eficaz al reducir el EO en el modelo NC expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En conjunto, los resultados demuestran la importancia de la proteína c-Abl como diana terapéutica, y su impacto en la asociación con el EO, la oxidación de la proteína DJ-1, la alteración del  $\Delta\Psi_m$  y la apoptosis en el modelo de NC de la EA esporádica. Además, se evidencia la relevancia del modelo NC propuesto para el estudio del efecto de los inhibidores de tirosina quinasa nilotinib, dasatinib, ponatinib, imatinib y bosutinib. Sumado a lo anterior, en la EA esporádica, existe una teoría alternativa llamada la hipótesis de la cascada mitocondrial, que integra los factores neuropatológicos de la EA alrededor del EO. En esta, se propone que la disfunción mitocondrial y la producción de ROS pueden iniciar un círculo vicioso en el que participan múltiples sistemas y mecanismos (**Figura 21**). En términos generales, la edad avanzada, factores de riesgo genéticos y estrés ambiental pueden llevar a una pérdida de las dinámicas y funciones mitocondriales (pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y producción energética) que se ve reflejada en el aumento de ROS de origen mitocondrial. Si la defensa antioxidante se encuentra alterada (como es el caso de los pacientes con EA), puede desencadenarse una acumulación del daño oxidativo, el cual puede afectar el metabolismo celular y procesos asociados, como el procesamiento de APP. En este escenario, puede darse la acumulación de péptido A $\beta$  y TAU fosforilado, además de la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas, procesos que a su vez pueden aumentar los niveles de ROS y exacerbar el daño. Es aquí donde procesos como el tráfico axonal y la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> pueden verse alterados, llevando a procesos de excitotoxicidad, daño nuclear y del ADN mitocondrial y procesos inflamatorios, que en conjunto conducen a la disfunción sináptica y las alteraciones cognitivas, propias de la EA (83).



**Figura 21. Círculo de activación de c-Abl.** Durante la DCL se ha evidenciado un aumento de EO que desencadena una serie de eventos dentro de los que se destaca la activación de c-Abl asociada con los marcadores neuropatológicos característicos de la EA.

En resumen, este trabajo tiene una importante aplicación como protocolo establecido por primera vez de activación de c-Abl en un modelo NC de la EA esporádica, adicionado a la

oportunidad de evaluar moléculas con actividad biológica anti-quinasas o ITKs. Este modelo sirve de plataforma experimental para evaluar la activación del c-Abl en el modelo neuronal colinérgico genético de PSEN 1 E280A de la EAF, establecido en el grupo a partir CEM-GW-CU transdiferenciadas en NC con la mutación. De hecho, en este modelo, las NC derivadas de CME mutadas mostraron cambios neuropatológicos, como acumulación intracelular del fragmento sAPP $\beta$ , hiperfosforilación de TAU, secreción aumentada del péptido A $\beta$ -42, aumento de EROs, de marcadores de EO, apoptosis y alteración neuronal funcional (100, 202). Dentro de estos hallazgos, fue llamativo el aumento significativo de las células positivas para DCF (indicativo de la producción de EROS), y la activación del factor de transcripción c-JUN en las NC. Lo anterior llevó a proponer la siguiente secuencia de activación: A $\beta$  42 (oligómeros) – producción EROs (especialmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  $\beta$  - c- JUN y  $\beta$  que son los primeros eventos patológicos detectables en las NC PSEN1 E280A. Además, se postula la toxicidad oligomérica intracelular del A $\beta$ 42 como un evento temprano y lento que podría ir deteriorando las células en una forma dependiente de la producción de EO, llevando finalmente a las NC a la muerte celular. En ese sentido, se han sugerido diversos mecanismos por los cuales A $\beta$ 42 genera neurotoxicidad: i) mecanismos de óxido-reducción de las reacciones de transferencia de radicales libres, que resulta en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ii) A $\beta$ 42 unido con metales es capaz de catalizar la formación y producción de ROS (127); y iii) podría ir directamente a las mitocondrias formando complejos intermedios de translocación estables con translocasa de la membrana externa (TOM) afectando la actividad de los complejos, y su acumulación evita la importación de otras proteínas y, por lo tanto, afecta la función mitocondrial iv) los oligómeros de bajo peso molecular inhiben la citocromo c oxidasa de una manera dependiente del cobre (98, 211, 212). Estos hallazgos sugieren que la acumulación del péptido A $\beta$  y el EO son unos de los eventos moleculares preponderantes y desencadenantes de la neuropatología en el modelo genético de EA.

Por esta razón, al aplicar nuestro modelo experimental de neuronas colinérgicas a partir de CEM-GW-CU esporádico (inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y compararlo con el genético natural con la mutación PSEN1 E280A en donde ocurre acumulación intracelular del fragmento sAPP $\beta$ , hiperfosforilación de TAU, secreción aumentada del péptido A $\beta$ -42, aumento de EROs, apoptosis demostrada en la activación de CASP3 y alteración de la funcional del flujo de calcio (100, 202); se podría predecir que también se presentará la activación de c-Abl, además del efecto positivo de los inhibidores de tirosina quinasa reduciendo los marcadores neuropatológicos de la EA, asociados al EO.

## CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La EA es el trastorno neurodegenerativo de mayor prevalencia e importancia en el mundo, y la causa más común de demencia. Las estrategias terapéuticas actuales pueden mejorar temporalmente los síntomas o retardar su progresión, sin embargo, no hay ningún tratamiento que cure la EA o que altere la evolución de la enfermedad. En este sentido, los resultados de este trabajo de investigación permitieron la estandarización de un protocolo de activación de la quinasa c- Abl inducida por el EO específicamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un modelo *in vitro* Neuronal colinérgico de la EA. El tratamiento con 100 μM durante 0,5 hrs permitió observar cambios asociados con EO, además de la activación de c -Abl. En comparación con las NC no tratadas, se observó un aumento hasta de 19 veces más de la oxidación de DJ-1, un aumento de 1.3 veces más de c- Abl y una disminución del ΔΨ<sub>m</sub> de ~ 50%.

Igualmente, en este trabajo se estandarizó un protocolo de activación de la quinasa c-Abl por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un modelo neuronal colinérgico. También se evidenció que los inhibidores de quinasas nilotinib, dasatinib, ponatinib, imatinib y bosutinib son neuroprotectores y restauradores de la funcionalidad mitocondrial vía disminución de los niveles de la c-Abl-p y reducen la DJ-1 oxidada. Estos hallazgos permiten sugerir a la proteína c-Abl como un blanco terapéutico de estudio, que nos brindan una opción promisoriosa para el tratamiento de la EA. Los inhibidores bosutinib nilotinib e imatinib fueron los más efectivos en la reducción de DJ-1 oxidada (reducción entre 86- 90%, comparada con las NC tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin inhibidor), mientras que nilotinib, imatinib y ponatinib fueron los más efectivos en la reducción de la activación de c-Abl (reducción fosforilación entre 54 – 80 %, comparada con las NC tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin inhibidor). En este punto, vale la pena destacar el reposicionamiento de los ITKs, moléculas aprobadas para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y aprobadas por la FDA. Al ser moléculas previamente aprobadas, se puede disminuir los tiempos de las etapas de descubrimiento, optimización y desarrollo, mejorando de esta manera las probabilidades de éxito, ya que se conocen las respuestas biológicas, la farmacocinética y farmacodinámica de estos inhibidores.

Estos hallazgos nos brindan una opción promisoriosa para el tratamiento de la EA con inhibidores de tirosina quinasa, que permitan regular a c-Abl y algunos de los procesos en los que esta molécula está implicada dentro del desarrollo de la enfermedad. Para esto, es necesario extrapolar estos resultados a los modelos provenientes de pacientes con la mutación PSEN1-E280A, de cultivos 2D y 3D los cuales recapitulan los principales marcadores patológicos de EA.

## CAPÍTULO 11. CONTRIBUCIONES O APORTES CIENTÍFICOS

En este estudio se estandarizó un protocolo de activación de la quinasa c- Abl en el contexto de EO inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un modelo *in vitro* Neuronal colinérgico 2D de la EA. El tratamiento con 100 µM durante 0,5 hrs permitió observar cambios asociados con EO (disminución del  $\Delta\Psi_m$ , y oxidación de DJ-1), además de la fosforilación de c -Abl. Este modelo NC 2D de la EA, constituye una plataforma experimental para su utilización en estudios de modelos genéticos con la mutación PSEN1-E280A, de cultivos 2D y 3D.

De igual manera, usando este protocolo se evaluaron diferentes ITKs (nilotinib, dasatinib, ponatinib, imatinib y bosutinib), donde se evidenció que estos inhibidores son neuroprotectores y restauradores de la funcionalidad mitocondrial vía disminución de los niveles de la c-Abl-p, reducción de DJ-1 oxidado en el modelo 2D de NC de la EA esporádica. Los resultados obtenidos a partir de este protocolo permiten sugerir a la proteína c-Abl como un blanco terapéutico de estudio para la EA.

Los resultados de investigación han contribuido al desarrollo de uno de los objetivos del proyecto de investigación: “Desarrollo de cultivos 3D de pacientes con Alzheimer PSEN1 E280A con aplicación en diseños terapéuticos” 111580762912 cto749-2018.

Adicionalmente, se contribuyó en la realización de un producto de apropiación social del conocimiento, un folleto para la donación de sangre menstrual utilizando la copa menstrual titulado: “Apóyanos a comprender las Neurodegenerativas. Dona Esperanza...”

## BIBLOGRAFÍA

1. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2019;14(1):32.
2. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2022;18(4):700-89.
3. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25(24).
4. Demencia <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>: Organización Mundial de la Salud; 2021
5. Gauthier S R-NP, Morais JA, & Webster C. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. *Alzheimer's Disease International*. 2021;2022(30 Mayo).
6. Romero-Vanegas SJ, Vargas-González JC, Pardo R, Eslava-Schmalbach J, Moreno-Angarita M. El sistema de salud colombiano y el reconocimiento de la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Salud Pública*. 2021;23.
7. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia 2019 15 noviembre 2021.
8. Ortega Lenis D, Mendez F. Survey on Health, Well-being and Aging. *SABE Colombia 2015: Technical Report*. Colombia Médica. 2019;50:128-38.
9. Sepulveda-Falla D, Glatzel M, Lopera F. Phenotypic profile of early-onset familial Alzheimer's disease caused by presenilin-1 E280A mutation. *J Alzheimers Dis*. 2012;32(1):1-12.
10. Lopera F, Ardilla A, Martínez A, Madrigal L, Arango-Viana JC, Lemere CA, et al. Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *Jama*. 1997;277(10):793-9.
11. Aranda M, Calabria A. Impacto económico-social de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología Argentina*. 2019;11(1):19-26.
12. Zvěřová M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin Biochem*. 2019;72:3-6.
13. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59-70.
14. Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung GY, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, et al. Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci*. 2012;39(4):436-45.
15. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):32.
16. Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*. 2017;145:325-37.
17. Oboudiyat C, Glazer H, Seifan A, Greer C, Isaacson RS. Alzheimer's disease. *Semin Neurol*. 2013;33(4):313-29.
18. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329-44.
19. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5541-54.
20. Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology*. 2020;40(1):22-9.
21. Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2009;47(4):289-99.
22. Kojro E, Fahrenholz F. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem*. 2005;38:105-27.
23. Ting LL, Lu HT, Yen SF, Ngo TH, Tu FY, Tsai IS, et al. Expression of AHI1 Rescues Amyloidogenic Pathology in Alzheimer's Disease Model Cells. *Mol Neurobiol*. 2019;56(11):7572-82.
24. Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(1-2):1-8.
25. Wilkins HM, Swerdlow RH. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull*. 2017;133:71-9.
26. Eftekharzadeh B, Daigle JG, Kapinos LE, Coyne A, Schiantarelli J, Carlomagno Y, et al. Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2018;99(5):925-40.e7.
27. Marcus JN, Schachter J. Targeting post-translational modifications on tau as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *J Neurogenet*. 2011;25(4):127-33.
28. Baas PW, Rao AN, Matamoros AJ, Leo L. Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2016;73(9):442-60.
29. Salomone S, Caraci F, Leggio GM, Fedotova J, Drago F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;73(4):504-17.
30. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013;12(1):289-309.
31. Monsalvo-Maraver L, Maya-López M, Rangel-López E, Túnez I, Tinkov AA, Skalny A, et al. Amyloid Beta Peptide-Mediated Alterations in Mitochondrial Dynamics and its Implications for Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2022.
32. R AA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2019;57(2):87-105.
33. Caruso A, Nicoletti F, Mango D, Saidi A, Orlando R, Scaccianoce S. Stress as risk factor for Alzheimer's disease. *Pharmacol Res*. 2018;132:130-4.
34. Litke R, Garcharna LC, Jiwani S, Neugroschl J. Modifiable Risk Factors in Alzheimer Disease and Related Dementias: A Review. *Clin Ther*. 2021;43(6):953-65.
35. Hersi M, Irvine B, Gupta P, Gomes J, Birkett N, Krewski D. Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. *NeuroToxicology*. 2017;61:143-87.
36. Seifert I, Wiegelmann H, Lenart-Bugla M, Łuc M, Pawłowski M, Rouwette E, et al. Mapping the complexity of dementia: factors influencing cognitive function at the onset of dementia. *BMC Geriatr*. 2022;22(1):507.
37. Herrup K. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci*. 2010;30(50):16755-62.
38. Campdelacreu J. Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia*. 2014;29(9):541-9.
39. Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *J Mol Biol*. 2019;431(9):1843-68.
40. Colomina MT, Peris-Sampedro F. Aluminum and Alzheimer's Disease. *Adv Neurobiol*. 2017;18:183-97.

41. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis.* 2021;8(3):313-21.
  42. Hunter S, Brayne C. Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry.* 2018;23(1):81-93.
  43. Dorszewska J, Prendecki M, Oczkowska A, Dezor M, Kozubski W. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research.* 2016;13(9):952-63.
  44. Nadendla S, Mohiuddin SS. *Biochemistry, Presenilin.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
45. Li Y, Bohm C, Dodd R, Chen F, Qamar S, Schmitt-Ulms G, et al. Structural biology of presenilin 1 complexes. *Mol Neurodegener.* 2014;9:59.
  46. Lalli MA, Cox HC, Arcila ML, Cadavid L, Moreno S, Garcia G, et al. Origin of the PSEN1 E280A mutation causing early-onset Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014;10(5 Suppl):S277-S83.e10.
  47. Lopera F, Arcos M, Madrigal L, Kosik K, Cornejo W, Ossa J. Demencia tipo Alzheimer con agregación familiar en Antioquia, Colombia. *Acta Neurologica Colombiana.* 1994;10.
  48. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):8098-102.
  49. Oyama F, Shimada H, Oyama R, Ihara Y. Apolipoprotein E genotype, Alzheimer's pathologies and related gene expression in the aged population. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;29(1):92-8.
  50. Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, et al. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl J Med.* 1995;333(19):1242-7.
  51. Marottoli FM, Katsumata Y, Koster KP, Thomas R, Fardo DW, Tai LM. Peripheral Inflammation, Apolipoprotein E4, and Amyloid- $\beta$  Interact to Induce Cognitive and Cerebrovascular Dysfunction. *ASN Neuro.* 2017;9(4):1759091417719201.
  52. Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2021;20(1):68-80.
  53. Chen Y, Strickland MR, Soranno A, Holtzman DM. Apolipoprotein E: Structural Insights and Links to Alzheimer Disease Pathogenesis. *Neuron.* 2021;109(2):205-21.
  54. Barragán Martínez D, García Soldevilla MA, Parra Santiago A, Tejeiro Martínez J. Enfermedad de Alzheimer. *Medicine.* 2019;12(74):4338-46.
  55. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res.* 2018;7.
  56. Kishi T, Matsunaga S, Oya K, Nomura I, Ikuta T, Iwata N. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimers Dis.* 2017;60(2):401-25.
  57. Müller P, Fendt M, Müller NG. Drug treatment of Alzheimer's dementia : Status quo and perspectives. *Der Internist.* 2019.
  58. Fowler AJ, Hebron M, Missner AA, Wang R, Gao X, Kurd-Misto BT, et al. Multikinase Abl/DDR/Src Inhibition Produces Optimal Effects for Tyrosine Kinase Inhibition in Neurodegeneration. *Drugs R D.* 2019;19(2):149-66.
  59. Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res.* 2013;36(4):375-99.
  60. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep.* 2019;20(2):1479-87.
  61. Machauer R, Lueoend R, Hurth K, Veenstra SJ, Rueeger H, Voegtle M, et al. Discovery of Umibecestat (CNP520): A Potent, Selective, and Efficacious  $\beta$ -Secretase (BACE1) Inhibitor for the Prevention of Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 2021;64(20):15262-79.
  62. Mouchlis VD, Melagraki G, Zacharia LC, Afantitis A. Computer-Aided Drug Design of  $\beta$ -Secretase,  $\gamma$ -Secretase and Anti-Tau Inhibitors for the Discovery of Novel Alzheimer's Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
  63. Hur J-Y.  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's disease. *Experimental & Molecular Medicine.* 2022;54(4):433-46.
  64. Pettus LH, Bourbeau MP, Bradley J, Bartberger MD, Chen K, Hickman D, et al. Discovery of AM-6494: A Potent and Orally Efficacious  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Inhibitor with in Vivo Selectivity over BACE2. *Journal of medicinal chemistry.* 2020;63(5):2263-81.
  65. Ugbaja SC, Sanusi ZK, Appiah-Kubi P, Lawal MM, Kumalo HM. Computational modelling of potent  $\beta$ -secretase (BACE1) inhibitors towards Alzheimer's disease treatment. *Biophys Chem.* 2021;270:106536.
  66. Imbimbo BP, Lozupone M, Watling M, Panza F. Discontinued disease-modifying therapies for Alzheimer's disease: status and future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(9):919-33.
  67. Shoshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shtenfer-Kuzmine A, Gupta R. VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Res.* 2018;131:87-101.
  68. Velez-Pardo C, Del Rio MJ. Avoidance of A $\beta$ (25-35) / (H $_2$ O) $_2$  -induced apoptosis in lymphocytes by the cannabinoid agonists CP55,940 and JWH-015 via receptor-independent and PI3K-dependent mechanisms: role of NF-kappaB and p53. *Med Chem.* 2006;2(5):471-9.
  69. Serrano MP, Herrero-Labrador R, Futch HS, Serrano J, Romero A, Fernandez AP, et al. The proof-of-concept of ASS234: Peripherally administered ASS234 enters the central nervous system and reduces pathology in a male mouse model of Alzheimer disease. *J Psychiatry Neurosci.* 2017;42(1):59-69.
  70. Kuo YC, Lee YJ. Rescuing cholinergic neurons from apoptotic degeneration by targeting of serotonin modulator-and apolipoprotein E-conjugated liposomes to the hippocampus. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:6809-24.
  71. Du H, Yan SS. Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(5):560-72.
  72. Matthews RT, Yang L, Browne S, Baik M, Beal MF. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8892-7.
  73. Sies H. 1 - Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress.* London: Academic Press; 1985. p. 1-8.
  74. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology.* 1997;82(2):291-5.
  75. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.

76. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981-90.
77. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-75.
78. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2019;36:91-100.
79. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13659.
80. Lushchak VI, Storey KB. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *Excli j*. 2021;20:956-67.
81. Vargas F, Carlos R, Abdoel N, Zoltan T. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*, ISSN 1856-5301, Vol 2, Nº 2, 2007, pags 3-15. 2007;2.
82. Bhardwaj V, He J. Reactive Oxygen Species, Metabolic Plasticity, and Drug Resistance in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
83. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-21.
84. Readnower RD, Sauerbeck AD, Sullivan PG. Mitochondria, Amyloid  $\beta$ , and Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:104545.
85. Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1604-16.
86. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):913-22.
87. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(3):148-60.
88. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:5080843.
89. Magnani F, Mattevi A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Curr Opin Struct Biol*. 2019;59:91-7.
90. Konno T, Melo EP, Chambers JE, Avezov E. Intracellular Sources of ROS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. *Cells*. 2021;10(2).
91. Xavier JM, Rodrigues CM, Sola S. Mitochondria: Major Regulators of Neural Development. *Neuroscientist*. 2015.
92. Lanzillotta C, Di Domenico F, Perluigi M, Butterfield DA. Targeting Mitochondria in Alzheimer Disease: Rationale and Perspectives. *CNS Drugs*. 2019;33(10):957-69.
93. Misrani A, Tabassum S, Yang L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:617588.
94. Jia K, Du H. Mitochondrial Permeability Transition: A Pore Intertwines Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Cells*. 2021;10(3).
95. Cenini G, Voos W. Mitochondria as potential targets in Alzheimer disease therapy: an update. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:902.
96. Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2013;8(21):2003-14.
97. Luca M, Di Mauro M, Di Mauro M, Luca A. Gut Microbiota in Alzheimer's Disease, Depression, and Type 2 Diabetes Mellitus: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:4730539.
98. Pavlov PF, Hansson Petersen C, Glaser E, Ankarcróna M. Mitochondrial accumulation of APP and A $\beta$ : significance for Alzheimer disease pathogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009;13(10):4137-45.
99. Velez-Pardo C, Ospina GG, Jimenez del Rio M. A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> peptide and iron promote apoptosis in lymphocytes by an oxidative stress mechanism: involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, caspase-3, NF- $\kappa$ B, p53 and c-Jun. *Neurotoxicology*. 2002;23(3):351-65.
100. Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:163913.
101. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
102. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*. 2018;28(1):9-21.
103. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*. 2015;16(9):907-17.
104. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*. 2021;81(4):1133-43.
105. Yanumula A, Cusick JK. *Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

106. Suhaili SH, Karimian H, Stellato M, Lee TH, Aguilar MI. Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. *Biophys Rev*. 2017;9(4):443-57.
107. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic Acid. *Neoplasia*. 2005;7(2):162-70.
108. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(8):539-48.
109. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):205-18.
110. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
111. Hollville E, Romero SE, Deshmukh M. Apoptotic cell death regulation in neurons. *Febs j*. 2019;286(17):3276-98.
112. Foster TC. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell*. 2007;6(3):319-25.
113. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.
114. Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*. 2002;54(3):469-525.
115. Casley C, Canevari L, Land J, Clark J, Sharpe M. ??-Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *Journal of neurochemistry*. 2002;80:91-100.
116. Bell SM, Barnes K, De Marco M, Shaw PJ, Ferraiuolo L, Blackburn DJ, et al. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Biomarker of the Future? *Biomedicine*. 2021;9(1).

117. Buizza L, Cenini G, Lanni C, Ferrari-Toninelli G, Prandelli C, Govoni S, et al. Conformational Altered p53 as an Early Marker of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*. 2012;7(1):e29789.
118. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996;274(5284):99-102.
119. Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10417-22.
120. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1121-9.
121. Ziegler-Waldkirch S, d'Errico P, Sauer JF, Erny D, Savanthrapadian S, Loreth D, et al. Seed-induced Abeta deposition is modulated by microglia under environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Embo j*. 2018;37(2):167-82.
122. Saito Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *J Clin Biochem Nutr*. 2014;54(3):138-44.
123. Greenough MA, Camakaris J, Bush AI. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2013;62(5):540-55.
124. Prouse J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem*. 2007;79:2325-38.
125. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(7):592-607.
126. La Penna G, Hureau C, Andreussi O, Faller P. Identifying, by first-principles simulations, Cu (amyloid-beta) species making Fenton-type reactions in Alzheimer's disease. *J Phys Chem B*. 2013;117(51):16455-67.
127. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018;14:450-64.
128. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(12):2977-92.
129. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749-62.
130. Averbek D, Rodriguez-Lafrasse C. Role of Mitochondria in Radiation Responses: Epigenetic, Metabolic, and Signaling Impacts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20).
131. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(2):85-100.
132. Dadsena S, Zollo C, García-Sáez AJ. Mechanisms of mitochondrial cell death. *Biochem Soc Trans*. 2021;49(2):663-74.
133. Schlatterer SD, Acker CM, Davies P. c-Abl in neurodegenerative disease. *J Mol Neurosci*. 2011;45(3):445-52.
134. Wang JY, Ledley F, Goff S, Lee R, Groner Y, Baltimore D. The mouse c-abl locus: molecular cloning and characterization. *Cell*. 1984;36(2):349-56.
135. Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smithgall TE. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J Biol Chem*. 2013;288(8):5443-50.
136. Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretzschmar J, Dorey K, Kuriyan J, et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*. 2003;112(6):845-57.
137. Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*. 2003;112(6):859-71.
138. Shaul Y. c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ*. 2000;7(1):10-6.
139. Mayer BJ, Baltimore D. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1994;14(5):2883-94.
140. Dölker N, Górna MW, Sutto L, Torralba AS, Superti-Furga G, Gervasio FL. The SH2 domain regulates c-Abl kinase activation by a cyclin-like mechanism and remodulation of the hinge motion. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(10):e1003863.
141. Tremblay MA, Acker CM, Davies P. Tau phosphorylated at tyrosine 394 is found in Alzheimer's disease tangles and can be a product of the Abl-related kinase, Arg. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):721-33.
142. Dai Z, Pendergast AM. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev*. 1995;9(21):2569-82.
143. Shi Y, Alin K, Goff SP. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev*. 1995;9(21):2583-97.
144. Smith KM, Van Etten RA. Activation of c-Abl Kinase Activity and Transformation by a Chemical Inducer of Dimerization\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(26):24372-9.
145. Khatri A, Wang J, Pendergast AM. Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J Cell Sci*. 2016;129(1):9-16.
146. Wang JY. The capable ABL: what is its biological function? *Mol Cell Biol*. 2014;34(7):1188-97.
147. David-Cordonnier MH, Hamdane M, Bailly C, D'Halluin JC. The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures. *Biochemistry*. 1998;37(17):6065-76.
148. Wang JY, Ki SW. Choosing between growth arrest and apoptosis through the retinoblastoma tumour suppressor protein, Abl and p73. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(Pt 6):666-73.
149. Perez de Arce K, Varela-Nallar L, Farias O, Cifuentes A, Bull P, Couch BA, et al. Synaptic clustering of PSD-95 is regulated by c-Abl through tyrosine phosphorylation. *J Neurosci*. 2010;30(10):3728-38.
150. Courtney KD, Grove M, Vandongen H, Vandongen A, LaMantia AS, Pendergast AM. Localization and phosphorylation of Abl-interactor proteins, Abi-1 and Abi-2, in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 2000;16(3):244-57.
151. Jones SB, Lu HY, Lu Q. Abl tyrosine kinase promotes dendrogenesis by inducing actin cytoskeletal rearrangements in cooperation with Rho family small GTPases in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2004;24(39):8510-21.
152. Cancino GI, Perez de Arce K, Castro PU, Toledo EM, von Bernhardt R, Alvarez AR. c-Abl tyrosine kinase modulates tau pathology and Cdk5 phosphorylation in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2011;32(7):1249-61.
153. Alvarez AR, Sandoval PC, Leal NR, Castro PU, Kosik KS. Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species. *Neurobiol Dis*. 2004;17(2):326-36.

154. Vargas LM, Leal N, Estrada LD, González A, Serrano F, Araya K, et al. EphA4 activation of c-Abl mediates synaptic loss and LTP blockade caused by amyloid- $\beta$  oligomers. *PLoS One*. 2014;9(3):e92309.
155. Reichenstein M, Borovok N, Sheinin A, Brider T, Michalevski I. Abelson Kinases Mediate the Depression of Spontaneous Synaptic Activity Induced by Amyloid Beta 1–42 Peptides. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2021;41.
156. Perkinton MS, Standen CL, Lau KF, Kesavapany S, Byers HL, Ward M, et al. The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signaling. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22084-91.
157. Vázquez MC, Vargas LM, Inestrosa NC, Alvarez AR. c-Abl modulates AICD dependent cellular responses: transcriptional induction and apoptosis. *J Cell Physiol*. 2009;220(1):136-43.
158. Zambrano N, Bruni P, Minopoli G, Mosca R, Molino D, Russo C, et al. The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *J Biol Chem*. 2001;276(23):19787-92.
159. Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, et al. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev*. 2003;43(1):1-16.
160. Sun X, Wu F, Datta R, Kharbanda S, Kufe D. Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7470-3.
161. Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene*. 1998;17(25):3309-18.
162. Ito Y, Pandey P, Mishra N, Kumar S, Narula N, Kharbanda S, et al. Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2001;21(18):6233-42.
163. Adlimoghaddam A, Odero GG, Glazner G, Turner RS, Albensi BC. Nilotinib Improves Bioenergetic Profiling in Brain Astroglia in the 3xTg Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Aging Dis*. 2021;12(2):441-65.
164. Cao C, Leng Y, Kufe D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29667-75.
165. Gonfloni S, Maiani E, Di Bartolomeo C, Diederich M, Cesareni G. Oxidative Stress, DNA Damage, and c-Abl Signaling: At the Crossroad in Neurodegenerative Diseases? *Int J Cell Biol*. 2012;2012:683097.
166. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neurosci Ther*. 2011;17(5):514-24.
167. Estrada LD, Zanlungo SM, Alvarez AR. C-Abl tyrosine kinase signaling: a new player in AD tau pathology. *Curr Alzheimer Res*. 2011;8(6):643-51.
168. Lebouvier T, Scales TM, Williamson R, Noble W, Duyckaerts C, Hanger DP, et al. The microtubule-associated protein tau is also phosphorylated on tyrosine. *J Alzheimers Dis*. 2009;18(1):1-9.
169. Derkinderen P, Scales TM, Hanger DP, Leung KY, Byers HL, Ward MA, et al. Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci*. 2005;25(28):6584-93.
170. Jing Z, Caltagarone J, Bowser R. Altered subcellular distribution of c-Abl in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009;17(2):409-22.
171. Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2011;14(3):285-93.
172. Ait-Bouziad N, Chiki A, Limorenko G, Xiao S, Eliezer D, Lashuel HA. Phosphorylation of the overlooked tyrosine 310 regulates the structure, aggregation, and microtubule- and lipid-binding properties of Tau. *J Biol Chem*. 2020;295(23):7905-22.
173. Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga S. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:65.
174. Perkinton MS, Standen CL, Lau KF, Kesavapany S, Byers HL, Ward M, et al. The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(21):22084-91.
175. Roskoski R, Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2022 update. *Pharmacol Res*. 2022;175:106037.
176. Rodon Ahnert J, Gray N, Mok T, Gainor J. What It Takes to Improve a First-Generation Inhibitor to a Second- or Third-Generation Small Molecule. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:196-205.
177. Rossari F, Minutolo F, Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):84.
178. Cohen P, Cross D, Jänne PA. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(7):551-69.
179. Manley PW, Druce P, Fendrich G, Furet P, Liebetanz J, Martiny-Baron G, et al. Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(3):445-53.
180. Mahul-Mellier AL, Fauvet B, Gysbers A, Dikiy I, Oueslati A, Georgeon S, et al. c-Abl phosphorylates  $\alpha$ -synuclein and regulates its degradation: implication for  $\alpha$ -synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2014;23(11):2858-79.
181. Karuppagounder SS, Brahmachari S, Lee Y, Dawson VL, Dawson TM, Ko HS. The c-Abl inhibitor, nilotinib, protects dopaminergic neurons in a preclinical animal model of Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2014;4:4874.
182. Doan V, Wang A, Prescott H. Bosutinib for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Am J Health Syst Pharm*. 2015;72(6):439-47.
183. Roskoski R, Jr. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res*. 2016;103:26-48.
184. Massaro F, Molica M, Breccia M. Ponatinib: A Review of Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(9):847-56.
185. Roskoski R, Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*. 2015;100:1-23.
186. Roskoski R, Jr. Hydrophobic and polar interactions of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors with their target enzymes. *Pharmacol Res*. 2021;169:105660.
187. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(7):422-39.

188. Ye YE, Woodward CN, Narasimhan NI. Absorption, metabolism, and excretion of ponatinib after a single oral dose in humans. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;79(3):507-18.
189. Di Gion P, Kanefendt F, Lindauer A, Scheffler M, Doroshyenko O, Fuhr U, et al. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(9):551-603.
190. Abbas R, Hsyu PH. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bosutinib. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55(10):1191-204.
191. Josephs DH, Fisher DS, Spicer J, Flanagan RJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: implications for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2013;35(5):562-87.
192. van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(8):692-706.
193. Chu J, Lauretti E, Craige CP, Praticò D. Pharmacological modulation of GSAP reduces amyloid- $\beta$  levels and tau phosphorylation in a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(3):729-37.
194. Nobili A, La Barbera L, D'Amelio M. Targeting autophagy as a therapeutic strategy to prevent dopamine neuron loss in early stages of Alzheimer disease. *Autophagy*. 2021;17(5):1278-80.
195. Lonskaya I, Hebron ML, Desforgues NM, Franjie A, Moussa CE. Tyrosine kinase inhibition increases functional parkin-Beclin-1 interaction and enhances amyloid clearance and cognitive performance. *EMBO Mol Med*. 2013;5(8):1247-62.
196. Pagan FL, Torres-Yaghi Y, Hebron ML, Wilmarth B, Turner RS, Matar S, et al. Safety, target engagement, and biomarker effects of bosutinib in dementia with Lewy bodies. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2022;8(1):e12296.
197. Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I, Gottimukkala K, Cutler RG, Zhang S, et al. Senolytic therapy alleviates A $\beta$ -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*. 2019;22(5):719-28.
198. Gonzales MM, Garbarino VR, Marques Zilli E, Petersen RC, Kirkland JL, Tchkonja T, et al. Senolytic Therapy to Modulate the Progression of Alzheimer's Disease (SToMP-AD): A Pilot Clinical Trial. *J Prev Alzheimers Dis*. 2022;9(1):22-9.
199. Porkka K, Koskenvesa P, Lundán T, Rimpiläinen J, Mustjoki S, Smykla R, et al. Dasatinib crosses the blood-brain barrier and is an efficient therapy for central nervous system Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Blood*. 2008;112(4):1005-12.
200. Shakil S. Molecular interaction of anti-cancer ligands with human brain acetylcholinesterase. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(5):2254-63.
201. Turner RS, Hebron ML, Lawler A, Mundel EE, Yusuf N, Starr JN, et al. Nilotinib Effects on Safety, Tolerability, and Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*. 2020;88(1):183-94.
202. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Lopera F, Jimenez-Del-Rio M. Cholinergic-like neurons carrying PSEN1 E280A mutation from familial Alzheimer's disease reveal intraneuronal sAPP $\beta$  fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca<sup>2+</sup> dysregulation: Therapeutic implications. *PLoS One*. 2020;15(5):e0221669.
203. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Direct transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells into cholinergic-like neurons. *J Neurosci Methods*. 2019;312:126-38.
204. Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol*. 2002;158(3):541-9.
205. La Barbera L, Vedele F, Nobili A, Krashia P, Spoleti E, Latagliata EC, et al. Nilotinib restores memory function by preventing dopaminergic neuron degeneration in a mouse model of Alzheimer's Disease. *Prog Neurobiol*. 2021;202:102031.
206. Bonilla-Porras AR, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Fast transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurospheres and nerve-like cells. *J Neurosci Methods*. 2017;282:52-60.
207. Kumar S, Bharti A, Mishra NC, Raina D, Kharbanda S, Saxena S, et al. Targeting of the c-Abl Tyrosine Kinase to Mitochondria in the Necrotic Cell Death Response to Oxidative Stress\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(20):17281-5.
208. Dolgacheva LP, Berezhnov AV, Fedotova EI, Zinchenko VP, Abramov AY. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2019;51(3):175-88.
209. Nykamp MJ, Zorumski CF, Reiersen AM, Nicol GE, Cirrito J, Lenze EJ. Opportunities for Drug Repurposing of Serotonin Reuptake Inhibitors: Potential Uses in Inflammation, Infection, Cancer, Neuroprotection, and Alzheimer's Disease Prevention. *Pharmacopsychiatry*. 2022;55(1):24-9.
210. Hassanjani M. Molecular characterization of the Parkinson's associated protein DJ-1. In: Leicester Uo, editor. <https://hdl.handle.net/2381/396402015>.
211. Kaminsky YG, Tikhonova LA, Kosenko EA. Critical analysis of Alzheimer's amyloid-beta toxicity to mitochondria. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20(1):173-97.
212. Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, et al. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):13145-50.