

**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS 2D Y 3D PARA EL
ESTUDIO DE LA EAF (PSEN1 E280A) Y SU APLICACIÓN EN EL DISEÑO DE
TERAPIAS ALTERNATIVAS**

Tesis doctoral

Presentado por:

**Viviana Marcela Soto Mercado
Bacterióloga, Histocitotecnóloga, MSc.**

Tutora:

Marlene Jiménez Del Río, MSc., DSc

Comité tutorial:

Carlos Vélez Pardo, MSc., DSc.

Juan Álvaro López Quintero, MSc., PhD.

David Arboleda Toro, MSc., PhD.

CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2023

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	10
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABLAS	16
CAPÍTULO 1: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)	17
1.1. Definición y Clasificación	17
1.2. Manifestaciones clínicas	18
1.3. Epidemiología de la EA	19
1.4. Patología de la EA	20
1.5. Hipótesis que explican la patología de la EA	24
1.5.1. Hipótesis amiloide	24
1.5.2. Hipótesis de la taupatía	26
1.5.3. Hipótesis inflamatoria	27
1.5.4. Hipótesis colinérgica	28
1.5.5. Hipótesis emergente: Hipótesis ultratemprana	32
1.6. Etiología de la EA	34
1.6.1. Factores de riesgo de la EA	34
1.6.1.1. Edad	34
1.6.1.2. Genotipo APOE ϵ4	35
1.6.2. Factores genéticos causales de la EA	35
1.6.2.1. Mutaciones en la PPA	36
1.6.2.2. Mutaciones en los genes de las presenilinas (<i>PSEN1</i> y <i>PSEN2</i>)	37
CAPITULO 2: LA EA FAMILIAR (EAF) CAUSADA POR LA MUTACIÓN E280A EN EL GEN DE <i>PSEN1</i>	38
2.1. La PSEN1	38
2.1.1. Estructura molecular de la PSEN1	38
2.1.2. La PSEN1 y el péptido beta Amiloide (βA) en la EAF	39

2.2. La PSEN1 y la actividad de la γ-secretasa en la EAF	41
2.3. La EAF PSEN1 E280A: relación con el Estrés Oxidativo (EO) y la apoptosis	43
2.4. La EAF PSEN1 E280A en Colombia	49
CAPÍTULO 3: MODELOS <i>IN VITRO</i> 2D y 3D PARA EL ESTUDIO DE LA NEUROLOGÍA Y LA BÚSQUEDA DE TERAPIAS ALTERNATIVAS PARA LA EAF	52
3.1. CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES (CME) COMO MODELO 2D DE LA EAF PSEN1 E280A Y TAMIZAJE DE MOLÉCULAS	52
3.1.1. Historia	52
3.1.2. Definición	53
3.1.3. Fuentes	54
3.1.3.1. Gelatina de Wharton	54
3.1.3.2. Sangre menstrual	56
3.1.4. Potencial multipotente y de transdiferenciación de las CME	58
3.1.5. Transdiferenciación neuronal colinérgica a partir de las CME	59
3.2. MODELOS 2D PARA EL ESTUDIO DE PATOLOGÍAS CEREBRALES	62
3.3. ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES (3D) PARA EL MODELAMIENTO DE PATOLOGÍAS CEREBRALES	67
3.3.1. Historia y antecedentes	67
3.3.2. Diferencias entre los cultivos celulares 2D y 3D	71
3.3.3. Esferoide cerebral versus Organoide cerebral	74
3.3.3.1. Definición	74
3.3.3.2. Métodos para la obtención de estructuras 3D	75
3.3.3.2.1. Cultivos en suspensión líquida y gotas colgantes	76
3.3.3.2.2. Hidrogeles	77
3.3.3.2.3. Biorreactores	78
3.3.3.2.4. Andamios	79
3.3.3.2.5. Bioimpresión 3D	79

3.3.4. Características morfológicas del modelo 3D	82
3.3.5. Modelos 3D para el estudio de la EA	83
3.3.6. Esferoides cerebrales para el modelamiento de la EA: Ventajas y limitaciones	84
3.3.7. Esferoides cerebrales en el diseño de terapias para la EA	86
CAPÍTULO 4: TRATAMIENTOS PARA LA EA	88
4.1. Tratamientos convencionales y sus limitaciones en etapa preclínica	88
4.2. Alternativas terapéuticas emergentes en la EA: reposicionamiento	91
4.3. Los cannabinoides como alternativa terapéutica en la EA	92
4.3.1. Definición, clasificación y estructura	92
4.3.2. Los receptores de cannabinoides y su clasificación	94
4.3.3. Sistema endógeno de cannabinoides	94
4.3.4. Los cannabinoides naturales y sintéticos: Efectos farmacológicos	95
4.3.5. Los cannabinoides y la EA	96
4.4. La epigallocatequina-3-galato (EGCG) como alternativa terapéutica en la EA	99
4.4.1. Definición, estructura y clasificación	99
4.4.2. Efectos terapéuticos de la EGCG	100
4.4.3. La EGCG como agente terapéutico en la EA	102
4.5. La melatonina o N-acetil-5-metoxi-triptamina (aMT) como alternativa terapéutica en la EA	106
4.5.1. Definición y estructura	106
4.5.2. Funciones de la aMT	107
4.5.3. La aMT como agente terapéutico en la EA	108
CAPÍTULO 5: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	112
CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA HIPÓTESIS Y LOS OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	115
6.1. Hipótesis	115
6.2. Objetivos	115
6.2.1. Objetivo General	115

6.2.2. Objetivos específicos	115
CAPÍTULO 7. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO NEURONAL COLINÉRGICO 2D DERIVADO DE CME PSEN1 E280A PARA EL ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA EAF Y LA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS	116
7.1. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO NEURONAL COLINÉRGICO 2D DERIVADO DE CME PSEN1 E280A PARA EL ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA EAF	116
7.1.1. Introducción	116
7.1.2. Materiales y métodos	116
7.1.3. Resultados	116
7.1.4. Discusión	116
7.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MOLÉCULAS EN EL MODELO 2D DE LA EAF	117
7.2.1. EFECTO DEL CANNABINOIDE CP55940 EN EL MODELO 2D DE LA EAF	117
7.2.1.1. Introducción	117
7.2.1.2. Materiales y métodos	117
7.2.1.3. Resultados	117
7.2.1.4. Discusión	117
7.2.2. EFECTO DE LA EGCG EN EL MODELO 2D DE LA EAF	117
7.2.2.1. Introducción	117
7.2.2.2. Materiales y métodos	117
7.2.2.3. Resultados	118
7.2.2.4. Discusión	118
CAPITULO 8. GENERACION DEL MODELO 3D (ESFEROIDES CEREBRALES) DERIVADO DE CME E280A PARA EL ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA EAF Y LA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS	119

8.1. OBTENCIÓN DE CME A PARTIR DE SANGRE MENSTRUAL Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL 2D Y 3D	119
8.1.1. Introducción	119
8.1.2. Materiales y métodos	119
8.1.3. Resultados	119
8.1.4. Discusión	119
8.2. EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS EGCG Y MELATONINA EN EL MODELO 3D DE LA EAF	119
8.2.1. Introducción	120
8.2.2. Materiales y métodos	120
8.2.3. Resultados	120
8.2.4. Discusión	120
CAPÍTULO 9. DISCUSIÓN GENERAL	121
CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES	133
CAPÍTULO 11. PERSPECTIVAS	135
CAPÍTULO 12. APORTES CIENTÍFICOS	136
CAPÍTULO 13. ANEXOS	139
13.1. Folleto instructivo para el uso de copa menstrual	139
13.2. Obra científica inédita	139
13.3. Participación en eventos	139
13.4. Premio Mención de honor- Academia Nacional de Medicina	139
BIBLIOGRAFÍA	140

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente a mis tutores: la Dra. Marlene Jiménez del Rio y el Dr. Carlos Vélez Pardo por guiarme en este proceso de aprendizaje, por permitirme disfrutar el camino de la investigación, por su confianza en mí y por potenciar mis capacidades académicas e investigativas. A la Dra. Marlene por inspirarme, porque es sin duda alguna una gran representante mujer en la ciencia; que ella haya sido la promotora de este proyecto me llena de orgullo y me inspira a seguir por este hermoso camino, a ella también gracias por extenderme sus brazos y cobijarme cuando circunstancias familiares golpearon mi corazón. Gracias por guiarme durante estos años.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Juan Álvaro López Quintero y Dr. David Arboleda Toro gracias por sus consejos, sus sugerencias, por su nobleza al compartirme sus conocimientos, gracias por orientarme acertadamente para la ejecución de mi tesis Doctoral.

Gracias a mis compañeros de grupo a los que permanecen y a los que hoy no están: Diani, Naty, Lau, Cathe, Jaz, Nico, y Dani por acompañarme en este camino, por ser mi apoyo, por sus consejos y por su disposición para el trabajo en equipo, lo que me hizo permanecer con empeño, dedicación y cariño, haciendo mucho más ameno mi proceso.

A Miguel, mi mejor compañía, mi ejemplo, mi guía, y sin duda mi inspiración: me ha enseñado tanto académicamente, pero me ha enseñado aún más que de nada vale saber mucho si este conocimiento no es compartido de forma bondadosa y amable. Gracias por tu lealtad, por ser mi soporte en los tiempos difíciles y mi gran compañero en el maravillo mundo de la ciencia. Ojalá nuestros caminos siempre se crucen en la vida personal y en la vida académica.

A mi hermana, mi compañera de risas, de alegrías, mi compañía en los momentos difíciles y un gran ejemplo de mujer. Gracias por mostrarme la espiritualidad durante todo este camino. Igualmente, a mí sobrina Isabella; llegaste a alegrar nuestras vidas, gracias mi Ishi por ser la luz y la sonrisa que ha acompañado gran parte de este proceso y de mi vida.

A mi familia, a mi mamá, a mis tías y a mi padre a ellos gracias por estar ayer por estar hoy y por permanecer, sus oraciones me han sostenido y sus consejos me han guiado y motivado

para ejecutar con gran pasión cada proyecto emprendido y este, por supuesto, no es la excepción. A mis familiares que no están en este plano, al gran patrocinador de sueños: mi abuelo Anselmo; siempre lo inmortalizaré en cada letra que escriba y este escrito también es la oportunidad.

Adicionalmente, agradezco a la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas (CCBB), al grupo Neurociencias de Antioquia, al Dr. Francisco Lopera, especialmente al área temática de Enfermedades Neurodegenerativas, Neuroquímica y Biología Molecular (NDEG), al Hospital San Juan de Dios de Yarumal. Gracias a las maternas donantes de los cordones umbilicales y a las mujeres donantes de sangre menstrual, al proyecto de Minciencias con código 111580762912 y al Programa de Becas de Excelencia Doctoral del Bicentenario por la financiación de mis estudios doctorales.

Para mi gran inspiración, mi gran motivación y mi gran maestra de vida: mi hija Julieta.

Gracias, mi Julieta por enseñarme tanto, por mostrarme que las batallas aparecen en cualquier momento pero que somos fuertes y que podemos salir adelante. Gracias por darle paso a la fe, a la esperanza y a la ilusión, gracias por decidir quedarte a mi lado, gracias por mostrarme que puedo ser tan guerrera como tú. Gracias porque el 9 de abril no solo nació una niña valiente, también nació una madre fuerte que cree firmemente en que Dios y la ciencia coexisten de una forma extraordinaria. Gracias mi niña por ser mi faro, mi brújula y mi puerto seguro en donde siempre quiero estar.

Mi Julietita con tus rizos marrón coco el tiempo con ella sabe a poco... te amo hoy y siempre.

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo de mayor prevalencia en el mundo. Se caracteriza clínicamente por pérdida progresiva de la memoria y alteraciones cognitivas y neuropatológicamente, por la presencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal. Dentro de las causas genéticas de la enfermedad se ha identificado la mutación en el gen *PRESENILINA 1 (PSEN1)* que resulta en el cambio de un ácido glutámico por una alanina en la posición 280 de la proteína (E280A), dando origen a la EA familiar (EAF) en Antioquia. La EAF está asociada con la presentación de marcadores histopatológicos como las placas seniles, las cuales están compuestas por el péptido β -amiloide de 42 aminoácidos (β A42) en la región cortical del cerebro, ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos por la proteína Tau hiperfosforilada, pérdida progresiva de neuronas colinérgicas del hipocampo y la gliosis o activación de la glia. Todos estos hallazgos neuropatológicos involucran el fenómeno de estrés oxidativo (EO), que finalmente conduce a la muerte neuronal. Hasta el presente, no existe un modelo que reproduzca el espectro completo de la neuropatología de la EAF con la mutación E280A en la PSEN1 de forma natural. Adicionalmente, no existe ningún tratamiento terapéutico eficaz o definitivo destinado a reducir o retardar la presentación clínica de la EAF. En este sentido, durante los últimos años, se ha postulado el potencial efecto neuroprotector de algunas moléculas naturales y/o sintéticas, como los cannabinoideos (v. gr. CP55940), la Epigallocatequina-3-galato (EGCG) y la melatonina. Sin embargo, su efecto neuroprotector no se ha estudiado aún en modelos *in vitro* específicos de la EAF PSEN1 E280A. Por lo tanto, en la presente tesis nos propusimos establecer y analizar dos modelos de estudio de la EAF; un modelo planar de cultivos 2D y uno tridimensional 3D de la EAF (PSEN1 E280A) a partir de Células mesenquimales estromales (CME) -provenientes de donantes voluntarios- a las que se les tamizó en búsqueda de la mutación (PSEN1 E280A); lo que nos permitiría la recapitulación neuropatológica de la enfermedad y la evaluación del efecto neuroprotector de moléculas como el cannabinoide CP55940, la EGCG y la melatonina. En este contexto, las CME silvestres (PSEN1 WT) y con la mutación (PSEN1 E280A) fueron aisladas de cordón umbilical y sangre menstrual, caracterizadas y transdiferenciadas a neuronas colinérgicas (NCL) y esferoides cerebrales (EC). Una vez obtenidos los cultivos 2D de NCL PSEN1 WT y PSEN1 E280A, se evaluaron los marcadores neuropatológicos de EO y de apoptosis (v.gr.

sAPP β fi / β A42e, Tau-P/Tau-T y DJ-1Ox) en presencia o ausencia de CP55940 y la EGCG y posteriormente, se evaluaron marcadores de EO y muerte celular. De igual manera, en el modelo 3D, los EC PSEN1 WT y PSEN1 E280A fueron cultivados en presencia o ausencia de EGCG y melatonina, después de lo cual se evaluaron marcadores de EO y muerte celular.

Como resultados de este trabajo, se logró el aislamiento de las CME de la gelatina de Wharton y sangre menstrual, la caracterización del fenotipo, diferenciación y transdiferenciación a NCL en 2D y 3D de las CME PSEN1 WT y PSEN1 E280A. Así mismo, se demostró, en ambos modelos, la recapitulación de la neuropatología de la EAF PSEN1 E280A con el aumento del sAPP β f/ β A42 endógeno y la fosforilación de Tau en las células PSEN1 E280A, comparadas con las silvestres. Además, se evidenció que las células PSEN1 E280A poseen niveles altos de EO y de marcadores de muerte (v.gr. p53, c-JUN, PUMA y CASPASA3), junto con pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) y fragmentación del ADN. Igualmente, los cultivos 2D y 3D mutados mostraron una desregulación del flujo de Ca^{2+} y una actividad deficiente de acetilcolinesterasa (AChE) en comparación con los WT. Destacándose en el modelo 3D la activación en un menor tiempo -y mucho más notoria- de los marcadores neuropatológicos de la EAF en tan solo 11 días. Se evidenció que el CP55940, la EGCG y la melatonina disminuyen el EO, los niveles de expresión del sAPP β f/ β A42 y restituye el $\Delta\Psi$ m, y regula el flujo de Ca^{2+} en las células PSEN1 E280A. Estos resultados contribuyen, por primera vez con: 1) el establecimiento y validación de modelos preclínicos 2D y 3D derivados de CME con la mutación E280A PSEN1 para el estudio de la fisiopatología de la EAF 2) la validación del uso de estos modelos en el diseño de terapias alternativas en la EAF, con lo que adicionalmente, en estos modelos se evaluó y evidenció el potencial efecto neuroprotector de CP55940, EGCG y melatonina como antioxidantes y anti-amiloidogénicos reduciendo los niveles de los marcadores neuropatológicos, de EO y de muerte en este modelo pre-clínico de la EAF en Antioquia.

Palabras clave: Células Mesenquimales Estromales, Enfermedad de Alzheimer Familiar, polifenoles, cannabinoides, melatonina, mutación E280A, Estrés oxidativo, cultivos 2D, esferoides cerebrales, organoides.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder in the world. It is characterized clinically by progressive memory loss and cognitive alterations and neuropathologically, by the presence of senile plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss. Within the genetic causes of the disease has been identified the mutation in the gene PRESENILIN 1 (*PSEN1*) that results in the change of a glutamic acid by an alanine at position 280 of the protein (E280A) and gives rise to familial AD (FAD) in Antioquia. FAD is associated with the presentation of histopathological markers such as senile plaques, which are composed of the 42-amino acid peptide, β -amyloid (β A42) in the cortical region of the brain, intracellular neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated Tau protein, progressive loss of cholinergic neurons of the hippocampus and gliosis or glia activation. All of these neuropathological findings involve the phenomenon of oxidative stress (OS), which ultimately leads to neuronal death. To date, there is no model that replicates the full spectrum of FAD neuropathology with the E280A mutation in *PSEN1* naturally. Additionally, there is no effective or definitive therapeutic treatment aimed at reducing or delaying the clinical presentation of FAD. In this sense, in recent years, the potential neuroprotective effect of some natural and/or synthetic molecules, such as cannabinoids (e.g., CP55940), Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and melatonin, has been postulated. However, its neuroprotective effect has not yet been studied in specific *in vitro* models of PSEN1 E280A FAD. Therefore, in this thesis we proposed to establish and analyze two models of study for the FAD, a planar model of 2D cultures and one three-dimensional (3D) (PSEN1 E280A) from mesenchymal stromal cells (MSC) -from voluntary donors- who had been tested for the mutation (PSEN1 E280A); that would allow us to recapitulate the neuropathological disease and evaluate the neuroprotective effect of molecules such as the cannabinoid CP55940, EGCG and melatonin. In this context, wild (PSEN1 WT) and mutated (PSEN1 E280A) MSC were isolated from umbilical cord and menstrual blood, characterized and transdifferentiated to cholinergic neurons (CLN) and cerebral spheroids (CS). Once the 2D cultures of WT and PSEN1 E280A CLN were obtained, the neuropathological markers of OS and apoptosis (v.gr. sAPP β fi / β A42e, TAU-P/TAU-T and Ox DJ-1) were evaluated in the presence or absence of CP55940 and EGCG and subsequently, markers of EO and cell death were evaluated. Similarly, in the 3D model, WT and PSEN1 E280A CS were cultured in the

presence or absence of EGCG and melatonin, after which markers of OS and cell death were evaluated.

As a result of this work, the isolation of the MSC from Wharton's jelly and menstrual blood was achieved, the characterization of the phenotype, differentiation and trans-differentiation to CLN (2D) and CS (3D) of the WT and PSEN1 E280A MSC. Likewise, it was demonstrated, in this model, the recapitulation of the neuropathology of the PSEN1 E280A FAD with the increase of endogenous sAPP β / β A42 and the phosphorylation of TAU in PSEN1 E280A cells, compared to WT ones. In addition, it was shown that PSEN1 E280A cells have high levels of OS and death markers (v.gr. p53, c-JUN, PUMA and CASPASE3), along with loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and DNA fragmentation. Similarly, mutated 2D and 3D cultures showed dysregulation of Ca²⁺ flow and deficient acetylcholinesterase (AChE) activity compared to WT. Remarkable in the 3D model the activation of FAD neuropathological markers in a shorter time -and more notably-. It was evidenced that CP55940, EGCG and melatonin decrease OS, sAPP β / β A42 expression levels and restore $\Delta\Psi_m$, and regulate the flow of Ca²⁺ in PSEN1 E280A cells. These results contribute, for the first time, to 1) the establishment and the validation of a preclinical model of 2D and 3D neuronal models derived from CME with the E280A PSEN1 mutation for the study of the pathophysiology of FAD and 2) the validation of the use of this model in the design of alternative therapies for FAD, additionally, this model evaluated and evidenced the potential neuroprotective effect of CP55940, EGCG and melatonin as antioxidants and anti-amyloidogenic reducing the levels of neuropathological markers, OS and death in this pre-clinical model of FAD in Antioquia.

Keywords: Mesenchymal Stromal Cells, Familial Alzheimer's Disease, polyphenols, cannabinoids, melatonin, E280A mutation, Oxidative stress, 2D cultures, brain spheroids, organoids

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Placas amiloides formadas por el péptido β A**
- Figura 2. Ovillos neurofibrilares y su localización en el hipocampo**
- Figura 3. Hipótesis de la cascada amiloide**
- Figura 4. Hipótesis colinérgica de la EA**
- Figura 5. Hipótesis ultratemprana de la EA**
- Figura 6. Estructura de la PSEN1**
- Figura 7. Vías de procesamiento de la PPA y generación del péptido β A**
- Figura 8. Retención del complejo γ -secretasa en endosomas tardíos/lisosomas y migración intracelular de la PPA para el corte y producción elevada de β A42 intracelular**
- Figura 9. Vía de señalización de apoptosis inducida por la fracción tóxica del β A42**
- Figura 10. Estructura del cordón umbilical**
- Figura 11. Localización de las células mesenquimales estromales de flujo menstrual**
- Figura 12. Línea de tiempo de los descubrimientos y establecimientos de protocolos relacionados con el diseño de cultivos 3D**
- Figura 13. Esquemización del cultivo celular en monocapa bidimensional tradicional (2D) y de los sistemas de cultivo celular tridimensional (3D)**
- Figura 14. Cuatro técnicas utilizadas para la generación de cultivos en 3D**
- Figura 15. Esferoides vs. Organoides**
- Figura 16. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocanabinol**
- Figura 17. La EGCG y sus efectos moduladores en los agregados del β A producidos en la EA**
- Figura 18. Principales funciones neuroprotectoras y neurorestauradoras de la EGCG**
- Figura 19. Principales funciones neuroprotectoras de la aMT**
- Figura 20. Análisis de Docking molecular entre el monómero de β A42 y la EGCG**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las EROs

Tabla 2. Protocolos de transdiferenciación colinérgica de CME obtenidas de varias fuentes

Tabla 3. Estructuras 3D, técnicas de cultivo y fuentes

Tabla 4. Cannabinoides sintéticos y su afinidad por los receptores CB1 y CB2

CAPÍTULO 1: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

1.1. Definición y Clasificación

La EA (MIM #104300) es una enfermedad crónica, progresiva y el trastorno neurodegenerativo de mayor prevalencia en el mundo que afecta principalmente al adulto mayor, a partir de los 65 años en la mayoría de los casos. La EA es la causa más común de demencia. Se caracteriza por pérdida de la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas que afectan la capacidad de una persona para realizar actividades cotidianas. Neuropatológicamente la EA se caracteriza por presentar ovillos neurofibrilares, pérdida neuronal y depósitos de placas de beta amiloide (β A) acompañado de daño generado por estrés oxidativo (EO). La EA fue descrita por primera vez por el médico alemán Alois Alzheimer en 1906, a partir del caso de una paciente llamada Auguste Deter, una mujer de 55 años que había presentado de manera progresiva cambios de personalidad, desorientación espaciotemporal y lapsus durante los últimos meses [1,2]. Actualmente, la EA es considerada como el trastorno neurodegenerativo crónico más común representando el 60% de los casos de demencia en el mundo [3].

Existen dos formas principales de Alzheimer: esporádico y genético. El Alzheimer esporádico es la forma más común y representa aproximadamente el 95% de todos los casos. Se cree que esta forma de Alzheimer es causada por una combinación de factores genéticos y ambientales. Los estudios epidemiológicos han identificado algunos factores de riesgo para el Alzheimer esporádico, como la edad avanzada, antecedentes familiares de la enfermedad, el género (las mujeres tienen un mayor riesgo) y ciertos factores de estilo de vida, como la falta de actividad física, la obesidad y el tabaquismo [4].

La apolipoproteína E (APOE) desempeña un papel crucial en el desarrollo del Alzheimer esporádico. El gen de la APOE tiene tres variantes principales: APOE2, APOE3 y APOE4. Estas variantes genéticas determinan la estructura de la proteína y están asociadas con diferentes riesgos de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. La variante APOE4 se considera el factor de riesgo genético más importante para el Alzheimer esporádico. Las personas que heredan una copia de la variante APOE4 tienen un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad, y aquellos que heredan dos copias tienen un riesgo aún mayor. La

presencia de la variante APOE4 también está relacionada con una aparición más temprana y una progresión más rápida de los síntomas. La forma en que la APOE4 contribuye al Alzheimer esporádico no se comprende completamente, pero se cree que está involucrada en la acumulación y el procesamiento anormal de la proteína beta-amiloide en el cerebro. La APOE4 parece facilitar la formación de placas de beta-amiloide y también afecta la eliminación de estas placas, lo que contribuye a la neurodegeneración y la disfunción cognitiva observada en el Alzheimer. Además, se ha demostrado que la variante APOE4 interactúa con otros factores de riesgo, como la inflamación crónica, el estrés oxidativo y la presencia de lesiones vasculares cerebrales, exacerbando el daño neuronal y la progresión de la enfermedad [3].

Por otro lado, el Alzheimer genético es una forma menos común pero más temprana y agresiva de la enfermedad. Se debe a mutaciones heredadas en los genes específicos relacionados con el Alzheimer, como el gen de la proteína precursora del amiloide (*APP*), de la presenilina 1 (*PSEN1*) y de la presenilina 2 (*PSEN2*). Estas mutaciones genéticas causan una acumulación anormal de proteínas beta-amiloide y Tau en el cerebro, lo que lleva a la formación de placas y ovillos neurofibrilares, características distintivas del Alzheimer. La epidemiología del Alzheimer genético se caracteriza por una aparición más temprana de los síntomas, a menudo antes de los 65 años, y una mayor probabilidad de que varios miembros de una familia se vean afectados debido a la herencia autosómica dominante de las mutaciones genéticas relacionadas con el Alzheimer [4].

1.2. Manifestaciones clínicas

Los síntomas de la EA son heterogéneos y varían entre los pacientes. El síntoma inicial más común es el deterioro gradual de la capacidad para recordar información reciente o episódica. Esto ocurre porque las primeras neuronas que inician el proceso de muerte están usualmente en la región del hipocampo encargada de la formación de nuevos recuerdos. A medida que la enfermedad avanza las neuronas en otras regiones del cerebro son afectadas y destruidas como la corteza cerebral. Los principales síntomas de la EA incluyen: **i)** la pérdida de memoria que interrumpe la vida cotidiana, **ii)** desafíos en la planificación o resolución de problemas, **iii)** dificultad para completar tareas familiares en el hogar, en el trabajo o en el

tiempo libre, **iv)** confusión con el tiempo o el lugar, **v)** dificultad para entender imágenes visuales y relaciones espaciales, **vi)** problemas con las palabras al hablar o escribir, ubicar mal las cosas y perder la capacidad de volver sobre los pasos **vii)** disminución del juicio o mal juicio, **viii)** ausentismo del trabajo o actividades sociales, **ix)** cambios en el estado de ánimo y la personalidad, incluyendo la apatía y la depresión, **x)** aumento de la ansiedad, agitación y trastornos del sueño. [3,5,6]. A medida que la enfermedad progresa, las capacidades cognitivas y funcionales disminuyen y los pacientes necesitan ayuda con las actividades básicas de la vida diaria lo cual los hace más vulnerables a las infecciones, como la neumonía que contribuye a la muerte de los pacientes con la EA [7].

1.3. Epidemiología de la EA

Según la investigación del World Alzheimer Report en el año 2018, se estimó que más de 50 millones de personas vivían con demencia, y que la cifra aumentará a 152 millones para el año 2050 [8]. Lo alarmante de este reporte es que el 58% de las personas afectadas viven en países de ingresos bajos y medios, en donde el aumento será de 68% para el año 2050, lo cual constituye un grave problema de salud pública. En Estados Unidos se estimó que 5.4 millones de personas tenían la EA en 2016 [9], cifra que ha aumentado en el último año a 6,7 millones [10].

Colombia no es la excepción a esta dinámica epidemiológica. Investigaciones realizadas de manera colaborativa por el Grupo de Neurociencias de Antioquia (GNA) lograron identificar una mutación conocida como PSEN1 E280A (Glu280Ala) [11]. Dicha mutación afecta a la familia más grande conocida de EAF, ubicados en Antioquia, Colombia. Se estima que este grupo familiar tiene aproximadamente 5.000 miembros vivos, incluidos aproximadamente 1.800 portadores de la mutación. Aproximadamente el 30% de los portadores de la mutación actualmente experimentan síntomas de la EA con edades promedio de 44 años para el inicio del deterioro cognitivo leve (DCL) y 49 años para el inicio de la demencia [12]. Estos portadores muestran evidencia de manifestaciones preclínicas de la EA varios años y décadas anteriores a su inicio clínico estimado, incluido niveles del β A cortical elevado, tasas metabólicas cerebrales más bajas para la glucosa, volúmenes más pequeños del hipocampo, signos característicos de la EA [13].

1.4. Patología de la EA

Se ha demostrado que la neuropatología de la EA inicia a los 20 años antes de que aparezcan los primeros síntomas de quejas de memoria [14,15]. Sin embargo, estos primeros síntomas no son detectados tempranamente, debido a que el cerebro tiene mecanismos de compensación y plasticidad, lo que permite que las personas continúen cognitivamente normales. A medida que avanza la enfermedad, los individuos muestran un deterioro cognitivo evidente, incluidos síntomas como la pérdida de la memoria y las funciones corporales básicas hasta que el individuo queda completamente dependiente de sus familiares o acompañantes.

La EA se caracteriza neuropatológicamente por lesiones cerebrales que pueden ser detectables en tejido *post mortem* a nivel tanto macroscópico como microscópico. A nivel macroscópico se observa reducción del volumen del cerebro con predominio del lóbulo temporal medio, y ensanchamiento de los cuernos temporales [16]. A nivel microscópico, los principales cambios histopatológicos en la EA son los depósitos de β A o placas seniles (**Figura 1**), los ovillos neurofibrilares y la pérdida neuronal [17]. Las placas seniles son estructuras que se forman por la acumulación del péptido β A, el cual es su principal componente y al que se le ha atribuido la *hipótesis del beta amiloide*. Esta hipótesis propone que los depósitos de β A son el evento iniciador y desencadenante de la enfermedad, argumentando con evidencias experimentales que: **i)** el β A es el principal componente de las placas seniles, que su **ii)** acúmulo ocurre previo a otros eventos neuropatológicos como la formación de ovillos neurofibrilares y la pérdida neuronal; asimismo, que **iii)** el β A de 42 aminoácidos es capaz de inducir EO y la muerte neuronal *in vitro* [18,19]. De hecho, se ha demostrado que el β A es importante en la fisiopatología de la EA, debido a que su acumulación induce alteración de la homeostasis iónica, EO y activación de cascadas de muerte celular. El péptido β A es un fragmento proteico con una estructura secundaria predominante de lámina plegada beta que le confiere la capacidad de unirse al colorante rojo Congo y producir refringencia cuando se ilumina con luz polarizada; ajustándose a la definición física de un amiloide, de ahí su nombre [20]. El β A se acumula en los espacios extracelulares, formando depósitos parenquimatosos. Adicionalmente, se ha demostrado que

las placas seniles no son la única forma en que el péptido β A se involucra en la neurodegeneración, este también tiende a depositarse y acumularse en las paredes de arterias pequeñas y arteriolas, y dentro de la sustancia gris de la corteza cerebral. Este tipo de depósito causa una lesión denominada angiopatía amiloide, reconocida en los últimos años como otra presentación patológica importante de la enfermedad [21].

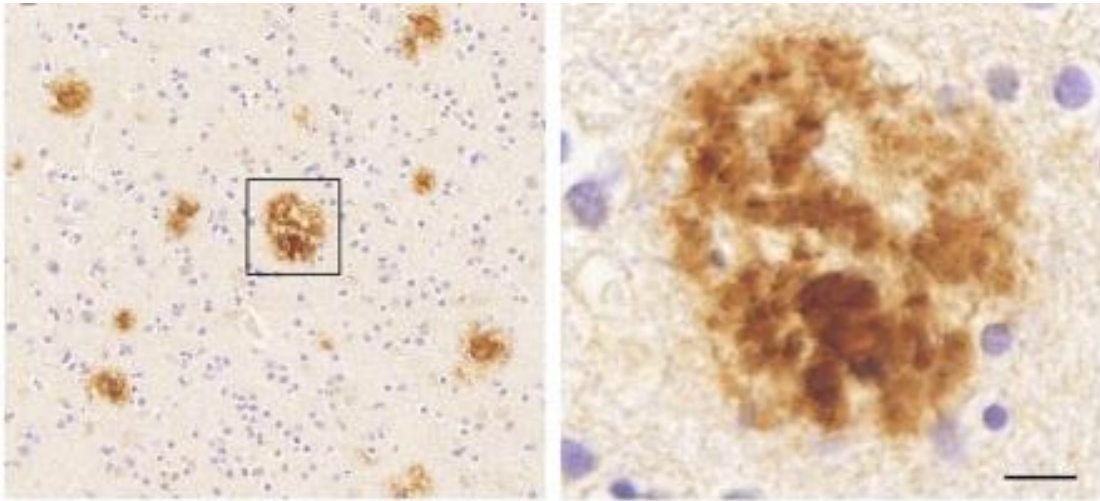


Figura 1. Placas amiloides formadas por el péptido β A. Las imágenes fueron tomadas de la ref. [22].

Otra de las principales características neuropatológicas principales de la EA son los ovillos neurofibrilares [23]. Estos consisten en estructuras en forma de haces citoplasmáticos que se extienden por la dendrita en las neuronas piramidales, cuando el ovillo neurofibrilar se produce dentro de una neurona con una configuración más redondeada, la inclusión aparece como fibras entrelazadas en forma de remolino, y aquí adquieren el nombre de ovillo neurofibrilar [24] (**Figura 2**).

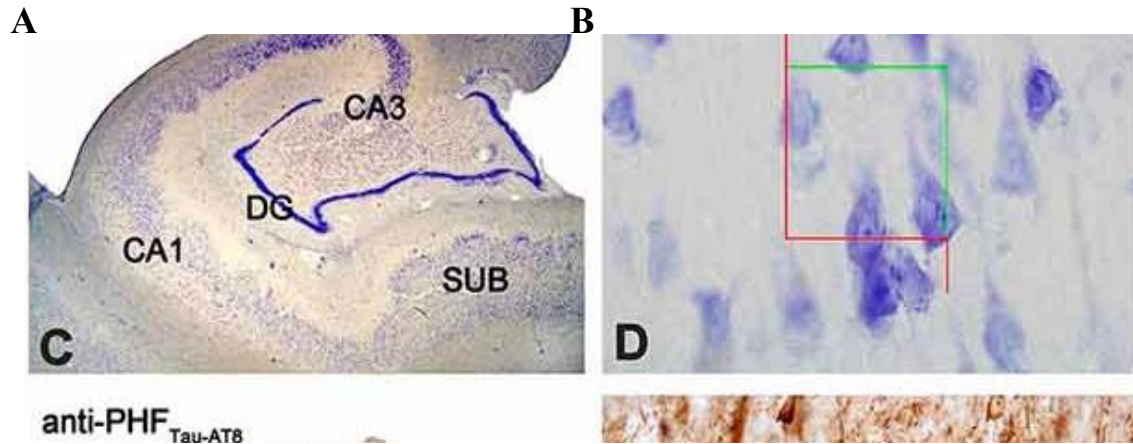


Figura 2. Ovillos neurofibrilares y su localización en el hipocampo. (A) microfotografía de la inmuno-reactividad (color marrón) del tejido para la identificación de fosfo-Tau con el anticuerpo AT8 (Ser202, Thr205). (B) Ampliación que muestra la reactividad intraneuronal. Las imágenes en fueron tomadas de la ref. [25].

Estudios ultraestructurales han revelado que la confirmación de los ovillos neurofibrilares son fibras entrelazadas en forma de remolino cuyo principal componente son las fibrillas de la proteína asociada a microtúbulo denominada Tau. Dichas fibrillas miden alrededor de 10 nm de diámetro, se presentan en pares y están enrolladas de forma helicoidal con una periodicidad regular de 80 nm, llamados filamentos helicoidales pareados. Adicionalmente, se han identificado otros componentes proteicos asociados a los ovillos neurofibrilares, como la ubiquitina, la enzima colinesterasa y el β A [26,27].

La proteína Tau se encuentra normalmente en el sistema nervioso central (SNC) asociada a la tubulina estabilizando el citoesqueleto neuronal. La proteína Tau puede sufrir modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación, metilación, glicosilación y ubiquitinación. La modificación post-traduccionales más frecuente de la proteína Tau es la fosforilación que se debe a que Tau contiene 85 sitios de fosforilación, 45 residuos de serina, 35 residuos de treonina y 5 residuos de tirosina, que corresponden al 53, 41 y 6% de los residuos fosforilables, respectivamente. Dado el gran número de posibles sitios de fosforilación en Tau, no es sorprendente que la fosforilación tenga un impacto dramático en

su función fisiológica. De hecho, en condiciones patológicas, la fosforilación de Tau aumenta, lo que reduce su afinidad por los microtúbulos y a su vez se incrementa la desestabilización del citoesqueleto. En el proceso de fosforilación de Tau han sido implicadas varias enzimas como la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3), la quinasa 5 dependiente de ciclina y la quinasa reguladora de la afinidad de microtúbulos. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que Tau se acumula en el compartimento somatodendrítico cuando la neurona está expuesta a oligómeros de β A. La acumulación de Tau fosforilada en las espinas dendríticas tiene consecuencias perjudiciales sobre la plasticidad sináptica [28].

Otro de los principales hallazgos en los cerebros de los pacientes con la EA es la atrofia cerebral causada por la pérdida excesiva de neuronas colinérgicas, especialmente en el hipocampo y la neocorteza que se ha relacionado directamente con el declive cognitivo en la EA [29]. De igual forma, a esta pérdida neuronal, se ha asociado la disminución de la enzima colina acetiltransferasa, -enzima encargada de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina- (ChAT), durante las diferentes etapas de progresión de la EA [30]. La acetilcolina se considera uno de los neurotransmisores más importantes en la fisiopatología de la enfermedad por su íntima relación con la memoria. Asimismo, aunque hay una reducción generalizada en varios tipos celulares que contienen neurotransmisores en la etapa final de la EA, las pérdidas más consistentes a lo largo de la progresión de la EA se observan en las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal. Las neuronas colinérgicas dentro del núcleo basal y el complejo de la banda diagonal septal proporcionan la mejor fuente de inervación colinérgica para la corteza cerebral y el hipocampo, que son regiones importantes en los procesos de la memoria [31-33].

La investigación de los mecanismos de la pérdida de neuronas colinérgicas asociados a la reducción de ChAT, ha sido uno de los principales retos científicos en los estudios neuropatológicos de la EA. Observaciones experimentales realizadas en modelos *in vitro* de cultivos primarios de neuronales colinérgicos demostraron la susceptibilidad y vulnerabilidad a la neurodegeneración por inductores citotóxicos como β A y el daño oxidativo [34]. Se ha demostrado, en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EA, la existencia de marcadores de EO y de muerte neuronal, por ejemplo: **i)** el daño en el ADN, **ii)** la inducción de vías moleculares de muerte celular y **iii)** la inducción de formación de cuerpos apoptóticos.

De hecho, se ha demostrado que el exceso de β A desempeña un papel central en la muerte neuronal puesto que desencadena EO y la activación de cascadas de muerte celular [35-37].

1.5. Hipótesis que explican la patología de la EA

1.5.1. Hipótesis amiloide

Una de las principales hipótesis que se ha planteado para dar respuesta al inicio y progresión de la EA es la hipótesis amiloide, cuya materialización inició con los hallazgos de Glenner y Wong en los años 1980s, gracias al aislamiento de una proteína purificada, derivada de las fibrillas laminares plegadas en forma beta, provenientes de cerebros con amiloidosis cerebrovascular asociada con la enfermedad de Alzheimer mediante cromatografía líquida de alta resolución. Cuyo posterior análisis reveló que esta proteína no tenía homología con ninguna proteína secuenciada hasta el momento. Interessantemente, ellos propusieron que esta proteína pudiera derivarse de un precursor único que podría proporcionar una prueba de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y un recurso para comprender su patogénesis. Sin embargo, solo hasta la década de los 1990s (1992), Hardy y Higgins consolidaron lo que hoy conocemos como la “Hipótesis de la cascada amiloide”, señalando que el procesamiento de la PPA ocurre por dos vías, una de las cuales producía un péptido que no precipitaba para formar amiloide, y otra mediante la cuál se precipitaba el péptido amiloide, conllevando ello a la producción de ovillos neurofibrilares y la muerte celular [35]. Esta hipótesis tuvo su punto más álgido con la identificación de mutaciones en la PPA que aumentaban la frecuencia de los cortes amiloidogénicos e inducían EA de inicio temprano[38].

Con posterioridad, se ha podido identificar que mutaciones en la proteína precursora de amiloide (PPA) y las presenilinas codificada en humanos por el gen PSEN1 y PSEN2, favorecen su clivaje amiloidogénico que promueve la acumulación patológica de péptidos $A\beta$, generando fibrillas y activación microglial y astrocítico en un proceso neuroinflamatorio. Esta hipótesis está basada en múltiples investigaciones a nivel genético, molecular, bioquímico y neuropatológico. Sin embargo, su principal fundamento deriva de estudios genéticos con mutaciones EAF que mantienen un fenotipo similar: nivel incrementado de β A cerebral en la posición 42, siendo el β A42 más tóxico y proclive a la formación de amiloide fibrilar. Es decir, según esta hipótesis, el desarrollo de la patología de la EA es consecuencia

de la acumulación y deposición de agregados de placas $A\beta$ en el cerebro como resultado del desequilibrio sostenido entre la producción y la remoción de fragmentos $A\beta_{40-42}$ por la β - y γ - secretasa que desencadenan una serie de eventos negativos que desembocan en taupatías, procesos de neuroinflamación, pérdida sináptica y muerte neuronal [38]. De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la EA comienza en el cerebro acumulando y agregando péptidos $A\beta$ y formando fibrillas de β -amiloide. Sin embargo, en ensayos clínicos, la reducción de la producción de péptido $A\beta$ y la formación de amiloide en el cerebro no desaceleró el deterioro cognitivo ni mejoró la vida diaria en pacientes con EA. Los estudios de prevención en personas sin deterioro cognitivo con alto riesgo o genéticamente destinadas a desarrollar EA tampoco han frenado el deterioro cognitivo. Estas observaciones argumentan en contra de la hipótesis amiloide de la etiología de la EA, su desarrollo y los mecanismos de la enfermedad [39].

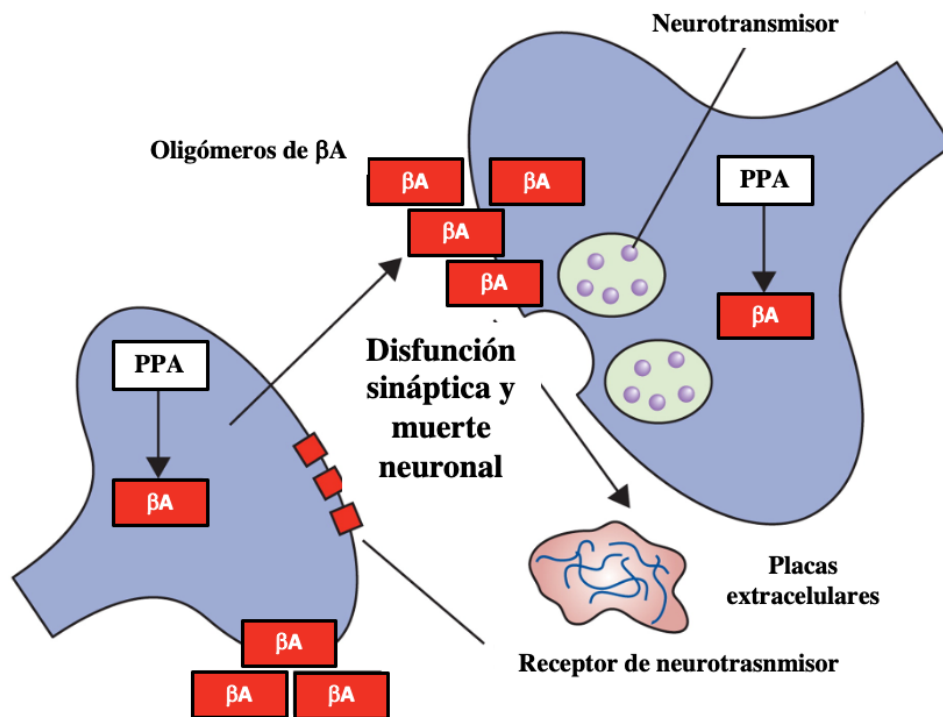


Figura 3. Hipótesis de la cascada amiloide. La Proteína Precursora del Amiloide (PPA) es procesada en el péptido βA , que se acumula dentro de las células neuronales y extracelularmente, donde se agrega en placas. En la hipótesis de la cascada amiloide, estos depósitos de $A\beta$ son tóxicos y causan disfunción sináptica y muerte de células neuronales. La imagen fue adaptada de la ref. [40].

1.5.2. Hipótesis de la taupatía

Otra de las hipótesis vinculadas a la EA es la que postula que la proteína Tau es el centro del deterioro neuronal. Esta, propone que la lesión cerebral más característica de la enfermedad de Alzheimer es la acumulación de filamentos helicoidales pareados (PHF) en las neuronas afectadas. En este sentido, según la solubilidad en los detergentes, existen dos poblaciones generales de PHF, los tipos fácilmente solubles (PHF I) y escasamente solubles (PHF II). Los principales polipéptidos de PHF son la proteína Tau asociada a microtúbulos. Tau en PHF está presente en formas anormalmente fosforiladas. Además de los PHF, la Tau anormal también está presente en forma no polimerizada en el cerebro de pacientes con EA. Sumado a ello, pequeñas cantidades de ubiquitina están asociadas con PHF II, pero no con PHF I ni con la Tau anormalmente fosforilada no polimerizada en el cerebro con EA. Además, las neuronas pre-enredadas pueden inmunomarcarse fácilmente para Tau anormalmente fosforilada pero no para ubiquitina. Finalmente, el nivel de Tau en el neocórtex es varias veces más alto que en los casos de control de edad avanzada con EA, pero este aumento es en forma de proteína anormalmente fosforilada [41].

En individuos sanos, las neuronas del sistema nervioso central expresan en una mayor proporción la proteína asociada a microtúbulos (MAP) denominada proteína Tau, codificada por el gen MAPT en el cromosoma 17 y localizada usualmente en el axón. La función de esta fosfoproteína es el favorecimiento del ensamblaje a partir de subunidades de tubulina y la estabilización de los microtúbulos para el transporte axonal de proteínas, vesículas y/o demás sustancias. La proteína Tau es altamente hidrofílica y flexible; usualmente se encuentra de manera desplegada, pero interacciones entre sus dominios con distinta carga pueden inducir plegamientos y conformaciones de lámina β que actúan como impulsores del autoensamblaje anormal de la proteína. Además, la funcionalidad de Tau está mediada por su grado de fosforilación, por el equilibrio entre la acción de las kinasas y fosfatasas sobre la proteína; lo que puede ocasionar que una alteración de esta homeostasis aumente la hiperfosforilación de Tau y la patología de la EA.

De hecho, en la EA, Tau está hiperfosforilada de manera anómala en sus seis isoformas de Tau que se agregan intracelularmente en forma de ovillos neurofibrilares de filamentos helicoidales apareados (PHF) y en ocasiones, se presenta en conjunto con filamentos rectos (SF). Estos agregados se disponen en las neuritas distróficas alrededor de su núcleo amiloideo que generan cambios neurofibrilares en la corteza entorrinal y la región de CA1 en el hipocampo [42]. En el envejecimiento cerebral normal existe la misma cantidad de Tau citosólico que en el envejecimiento cerebral de un paciente con la EA, la diferencia radica en que, en este último, el nivel de Tau total está incrementado hasta ocho veces. Una vez Tau está polimerizada en la EA (p-Tau), esta es aparentemente inerte y puede ensamblarse a la tubulina para promover la estabilización de microtúbulos, pero secuestra a la Tau normal y a otras proteínas asociadas (MAP1 A/B y MAP2) para inhibir su ensamblaje y promover la formación de agregados amorfos (PHF/SF) [41]. Además, los núcleos estructurales de los ovillos neurofibrilares con formación de Tau presentan truncamientos característicos en las regiones C y N-terminal, con tres repeticiones de separación y un desplazamiento de 15 aminoácidos en comparación con sus repeticiones nativas, lo que resulta producto de la interacción Tau-Tau presente en los PHF de los núcleos de los ovillos. Este patrón inhibe la proteólisis por proteasas citosólicas, facilitando su transporte a terminales axónicas, su propagación y subsecuente desestabilización citoesquelética que reduce la expresión de proteínas presinápticas y generan un daño cognitivo asociado con muerte celular [43]. Finalmente, aunque la hiperfosforilación de Tau se ha considerado un evento previo a la formación de los ovillos neurofibrilares como consecuencia de la acumulación de β A, recientes estudios preclínicos con neuroimagen funcional han sugerido que la patología Tau puede progresar de manera independiente de la patología amiloide y presentar una mayor implicación en la neurodegeneración y el deterioro cognitivo [44].

1.5.3. Hipótesis inflamatoria

Se ha postulado que los procesos inflamatorios ocurren en los cerebros de los pacientes con la EA como respuesta a las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares. La respuesta inflamatoria está mediada predominantemente por células de la microglia, que son los macrófagos específicos del cerebro y que constituyen aproximadamente el 15 % de todas las células cerebrales. Se ha demostrado que la respuesta inflamatoria de la microglia desempeña

un papel importante en el desarrollo de la neuropatología de la EA [45]. Estas observaciones en los pacientes, se evidenciaron, con el aumento en la concentración de microglía agregada cerca de las neuronas, de 2 a 5 veces, indicativo de una mayor actividad de las células de microglia en la EA [46]. Así mismo, el β A puede unirse a las células de la microglía, a través del complejo del receptor CD36-TLR4-TLR6 (del inglés **Toll-Like Receptors**) y el complejo inflamatorio NLRP3 (del inglés **NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3**); y liberar factores de inflamación y provocar respuestas inmunitarias [47]. Los niveles de factores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-12 e IL-8 se han vinculado al aumento del daño en los cerebros de los pacientes con EA [48]. Adicionalmente, se ha demostrado que los genes que codifican los receptores de las células inmunitarias, como el receptor del complemento tipo 1: CR1, CLU, Siglec-3 o CD33 y TREM2, están asociados con la EA [49]. También, se ha identificado que la respuesta inmune innata mediada por el complejo IFITM3 (proteína transmembrana 3 inducida por interferón)- γ -secretasa puede contribuir a la producción de β A [50].

1.5.4. Hipótesis Colinérgica

La hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer se centra en la pérdida progresiva de la inervación colinérgica límbica y neocortical. Se cree que la degeneración neurofibrilar en el cerebro anterior basal es la causa principal de la disfunción y muerte de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior, dando lugar a una denervación colinérgica presináptica generalizada [51]. Se ha demostrado en neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (NCPB de la sigla en inglés, **BFCN**) inmunopositividad intraneuronal para el β A42, incluido el amino terminal de β A, estaba presente en estas neuronas de cerebros jóvenes (de 20 a 66 años), así como en casos mayores de la EA en ausencia de demencia. La tinción con un anticuerpo β A42 reveló una tinción punteada granular consistente con la presencia de β A42 en el interior del compartimento vesicular (**Figura 4A**) y altamente reactiva en las regiones corticales y la magnocelular en el globo pálido. Interesantemente, los homogeneizados de NCPB demostraron especies oligoméricas de β A de tamaños entre ~35 y 44 kDa de cerebros con la EA [52]. La presencia de β A en el interior del endosoma primario sugiere este evento como el inicio de la patogénesis que esta acompañado de la alteración del tamaño del endosoma por el aumento de los niveles de APP y de los fragmentos de C99. Estos últimos

eventos moleculares producen una reducción en el tráfico endosomal [53] y el transporte retrógrado de los endosomas alterando la señalización del factor de crecimiento nervioso (FCN, de su sigla en inglés NGF) y su función trófica en las NCPB (**Figura 4B**). Adicional, a esta señalización alterada también se pueden generar eventos tóxicos mediados por el β A y Tau, en donde la microglía se activaría en respuesta al β A, migrando hacia a las placas para fagocitar y eliminar el β A.

Es importante resaltar que otros factores de las NCPB-amplifican el efecto de los niveles de oligómeros tóxicos de β A y Tau durante la progresión de la patogénesis. Estos factores son: En primer lugar, la imposición para las NCPB de demandas metabólicas considerables por su participación en la neurotransmisión sináptica [54]. En segundo lugar, la exigencia de una señalización continua del NGF para mantener el estado diferenciado de las NCPB [55]. En tercer lugar, la notable longitud de los axones de las NCPB y su arborización generalizada en los sitios blanco crea la necesidad de mover señales tróficas a distancias muy largas en axones no mielinizados relativamente delgados, de hecho, una NCPB humana, con quizás más de 1000 puntos de ramificación por árbol, cubre un volumen muy grande de corteza. Sumado a esto, los árboles convergen en un único axón proximal relativamente largo (10 cm) cuyo diámetro es de $\sim 0,3 \mu\text{m}$ [56]. En cuarto lugar, las arborizaciones axonales complejas conllevarían al tráfico de señales del NGF dentro de endosomas anormales agrandados. En quinto lugar, la presencia del receptor p75^{NTR} describir la sigla en los axones de las NCPB y la evidencia puede servir de unión e internalización de β A soluble e insoluble y oligómeros de β A [57]. Sexto, con el transporte retrógrado fallido de las señales del NGF y la expresión reducida de los receptores TrkA, como se ha demostrado, compromete aún más la capacidad de respuesta de las NCPB a la síntesis del NGF y su señalización. Todos estos eventos conducirían a un compromiso significativo y cada vez más grave de la capacidad de las NCPB para mantener la señalización sináptica de los árboles axonales. Otro de los factores importantes en esta etapa de la enfermedad, que se han sugerido es la activación sostenida de las células microgliales, a través de una combinación de fagocitosis defectuosa de β A y liberación de citocinas proinflamatorias que podrían exacerbar la EA [58]. El efecto acumulativo de estos cambios moleculares y estructurales conducirían a la atrofia y eventual pérdida de las NCPB.

Uno de los argumentos mas fuertes de la hipótesis colinérgica que trata de explicar la vulnerabilidad de las NCPB se fundamenta en su fenotipo colinérgico como productor del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Este neurotransmisor regula la excitabilidad neuronal en todo el sistema nervioso al actuar sobre los canales del receptor de ACh nicotínico activado por ligando (nAChR) y los receptores de ACh muscarínicos acoplados a proteína G (mAChR). Especialmente en el hipocampo que es un área importante del cerebro por ser la entrada colinérgica primaria que surge del tabique medial y la banda diagonal de Broca, cuya activación puede activar a su vez tanto los nAChR como los mAChR y regular la comunicación sináptica y la función cognitiva, el aprendizaje y la memoria [59]. Es por esto que, la disfunción en el sistema colinérgico del hipocampo se ha relacionado con déficits cognitivos y una variedad de trastornos y enfermedades neurológicas, incluida la EA. En este sentido, en la EA temprana, existe un deterioro en la memoria episódica basada en el hipocampo que mejora a través de la mejora de la transmisión colinérgica, lo que indica que el compromiso de la conectividad septo-hipocampal subyace a la sintomatología temprana [60]. En condiciones normales, las neuronas de proyección colinérgica del prosencéfalo basal proporcionan la principal fuente de inervación colinérgica a estas regiones y desempeñan un papel clave en la mediación de la atención y la función de la memoria. En la EA, las NCPB acumulan preferencialmente péptido amiloide mal plegado y ovillos neurofibrilares que contienen Tau, lo que posiblemente explique la vulnerabilidad selectiva de esta población neuronal [51,61].

Interesantemente, en los últimos años se ha demostrado que el subtipo $\alpha 7$ de receptores nAChR, nAChR $\alpha 7$, al menos durante la etapa temprana de la enfermedad, cumplen una función neuroprotectora al preservar el fenotipo colinérgico en el prosencéfalo basal (PB) y en el hipocampo que es una de sus regiones de proyección. Sin embargo, en los estadios avanzados de la EA, cuando la acumulación del péptido βA a evolucionado a oligómero -por el mal plegamiento- estos cambios conducen a la desregulación de los mecanismos de señalización en donde los nAChR $\alpha 7$ ya no pueden cumplir con el mantenimiento asociado con el fenotipo colinérgico, lo que conlleva a la disfuncionalidad de este grupo poblacional

neuronal colinérgico [62-64]. Otros de los receptores relacionados con la EA son los AChR muscarínicos. Estos se han dividido en cinco subtipos de receptores, M1-M5. Los subtipos de receptores muscarínicos M1, M2 y M4 están adecuadamente presentes en el cerebro, mientras que M3 y M5 están escasamente distribuidos. Los receptores M1, M3 y M5 son receptores estimulantes que interactúan con la familia de proteínas G_q y están involucrados en la estimulación de la fosfolipasa C y la instigación de la cascada de trifosfato de fosfatidilinositol, lo que resulta en la movilización del Ca^{2+} intracelular y la activación de la proteína quinasa C. Por el contrario, los receptores inhibidores M2 y M4 interactúan con la familia G_o/i (proteína G reguladora inhibitoria (G_i)) de proteínas G. Este conjunto de receptores es responsable de inhibir la adenilil ciclasa y de activar los canales de potasio activados por proteínas G [65]. La acción inhibitoria de la adenilato ciclasa reduce los niveles de proteína quinasa A, lo que finalmente disminuye los niveles de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) en la célula. Dentro del grupo de receptores muscarínicos, el receptor del subtipo M1 se extiende por todo el cerebro y se encuentra principalmente en el hipocampo, la corteza cerebral, la amígdala y el cuerpo estriado. Debido a que las placas amiloide y los ovillos neurofibrilares se desarrollan en la corteza cerebral y el hipocampo y dado que los receptores M1 se expresan mucho en estas secciones, el receptor muscarínico M1 ha sido un objetivo terapéutico potencial para restaurar la señalización colinérgica. Mas aún cuando los receptores muscarínicos M1 están asociados con numerosas funciones fisiológicas, incluida la excitación neuronal, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria basada en el hipocampo, la diferenciación neuronal durante el desarrollo temprano, la modulación de la cognición y la memoria a corto plazo [66,67], es por ello que varios estudios han sugerido a los agonistas muscarínicos M1 como posibles candidatos para el tratamiento de la EA [68]. La cantidad de eventos que podrían afectar a las neuronas colinérgicas pone de manifiesto la importancia de contar con modelos *in vitro* de neuronas colinérgicas como población de estudio en el objetivo de buscar cambios patológicos tempranos en la EA.

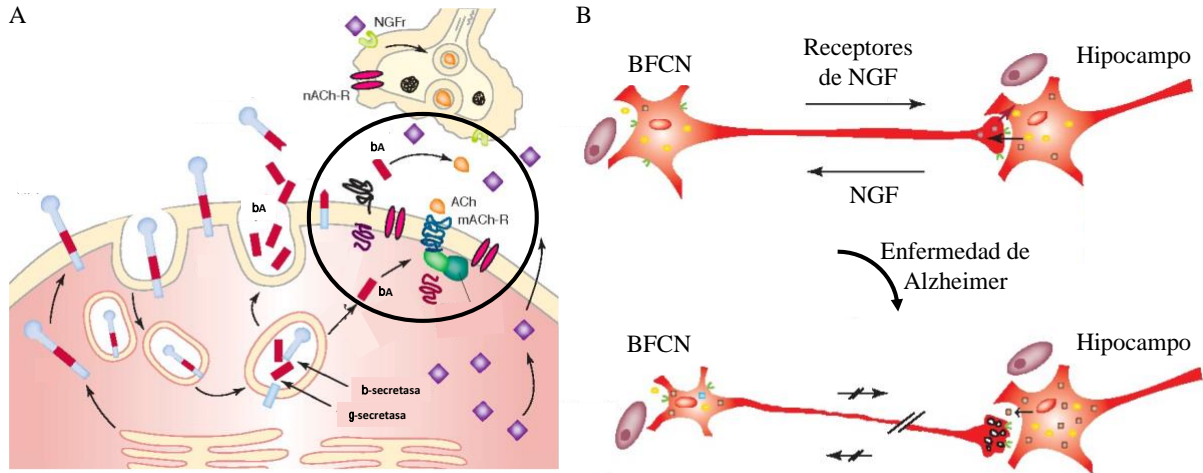


Figura 4. Hipótesis colinérgica de la EA. El β A bloquea la acción de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos (A), conllevando a la degeneración colinérgica que se amplifica por la incapacidad de sintetizar el NGF (B). La imagen fue adaptada de la ref. [69].

1.5.5. Hipótesis emergente: Hipótesis ultratemprana

La hipótesis amiloide propone que la agregación del β A (placa senil) en el espacio extracelular del cerebro humano está en la parte superior de la cascada patológica y que la eliminación del β A extracelular debería mejorar y/o revertir el proceso patológico y disminuir los síntomas en los pacientes con EA [18]. Desafortunadamente, varios anticuerpos anti- β A con diferentes propiedades de interacción para monómeros, oligómeros y polímeros de β A desarrollados por grandes compañías farmacéuticas no han logrado mejorar los síntomas de los pacientes con EA, aunque, a juzgar por los estudios de PET, la mayoría de estos anticuerpos anti- β A han reducido con éxito la carga de $A\beta$ en los cerebros de los pacientes [70], no obstante, los registros clínicos de dichos pacientes no respaldaron mejoría de los síntomas [71,72].

En la búsqueda de una comprensión de la patogenia de la EA y el desarrollo de tratamientos, el análisis de fosfoproteomas para la determinación de procesos de fosforilación previos a la agregación extracelular de $A\beta$, como MARCKS (Sustrato de la quinasa C rica en alanina miristoilada, por la sigla del inglés, Myristoylated alanine-rich C kinase substrate,

MARCKS) han indicado claramente que la "patología de etapa ultra temprana de la EA" se inicia antes de la aparición de la agregación extracelular de β A cuando no debería ocurrir nada de acuerdo con la hipótesis amiloide. Dicho proceso está relacionado con una necrosis en etapa ultra temprana que no fue detectada por otros métodos anteriores y que ocurre en múltiples tipos de ratones con EA [73]. Además, se ha analizado en detalle la relación entre la necrosis en etapa ultra temprana y la acumulación de β A intracelular mediante el uso de imágenes de lapso de neuronas derivadas de iPSC y mediante imágenes de medidas en el tiempo de neuronas corticales vivas en cerebros de ratones con microscopía de dos fotones. Los análisis revelaron que el β A intracelular interactúa con la proteína asociada a Yes (Proteína asociada al sí, de la sigla en inglés, Yes-associated protein, YAP), altera la función de YAP para promover la viabilidad celular y, finalmente, induce la necrosis. El β A intracelular residual permanece en el espacio extracelular y se convierte en la semilla para el crecimiento de las placas de β A [73].

En conjunto, los análisis de necrosis activa en los dos tipos de modelos de ratones con EA con un nuevo marcador (pSe46-MARCKS) indicaron que la acumulación de amiloide intracelular causa necrosis neuronal, lo que lleva a la agregación de amiloide extracelular. En otras palabras, esa agregación de amiloide extracelular es el resultado de la necrosis neuronal provocada por el amiloide intracelular [74].

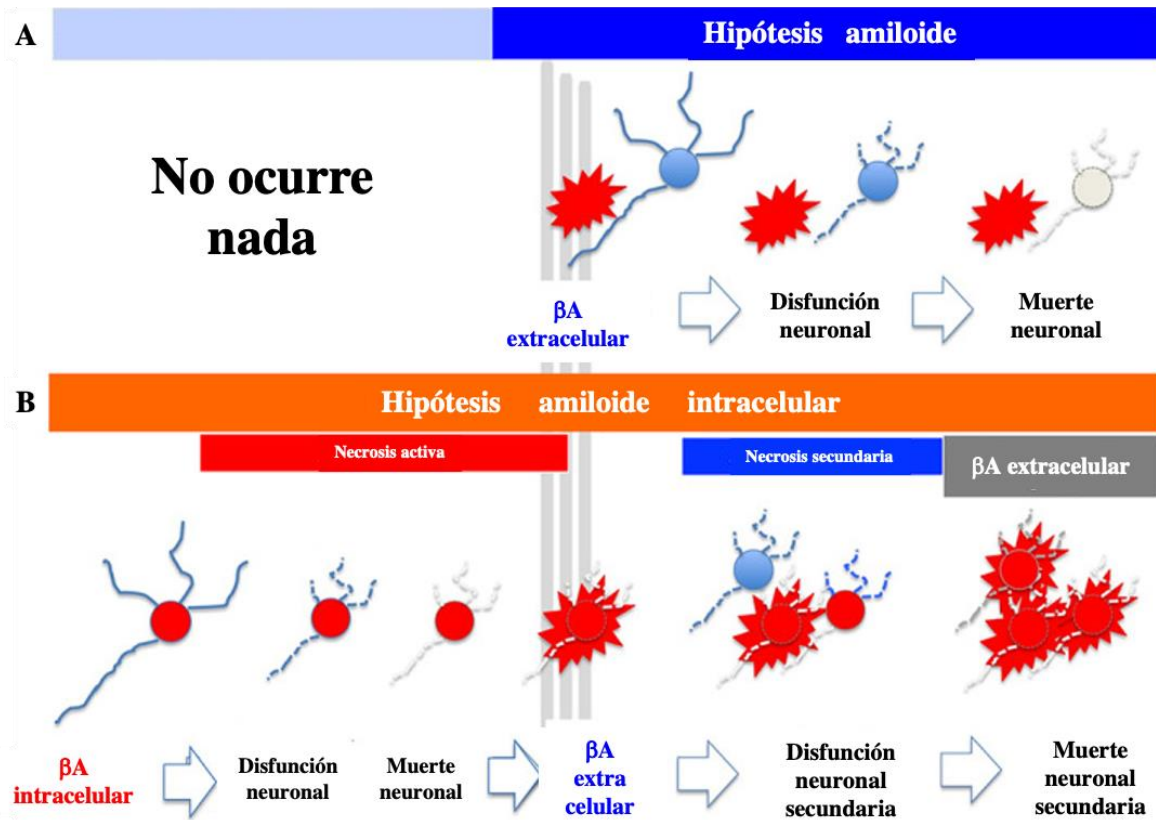


Figura 5. Hipótesis ultratemprana de la EA. Mientras que en la cascada clásica amiloide, se plantea que el β A tiene un efecto tóxico al formar placas seniles extracelulares (A), la hipótesis ultratemprana indica que existen eventos tempranos desencadenados por la acumulación intracelular del β A, con lo que se produce una necrosis temprana que sirve como semilla para la formación de la placa amiloide (B). La imagen fue adaptada de la ref. [74].

1.6. Etiología de la EA

1.6.1. Factores de riesgo de la EA

Los mayores factores de riesgo para el Alzheimer esporádico de inicio tardío son la edad avanzada, los antecedentes familiares de Alzheimer y ser portador de la variante genética del gen *APOE ϵ 4*.

1.6.1.1. Edad

La edad es uno de los mayores factores de riesgo asociados al desarrollo de la EA. A medida que aumenta la edad, también aumenta la probabilidad de tener la EA. Aunque la edad

avanzada es un factor de riesgo para la EA, esta no hace parte del envejecimiento normal, lo que significa que la edad avanzada por sí sola no es suficiente para causar la EA [3].

1.6.1.2. Genotipo APOE ϵ 4

El gen *APOE* codifica para una proteína que transporta el colesterol en el torrente sanguíneo. Todos heredamos una de las tres isoformas del gen *APOE* ϵ 2, ϵ 3 o ϵ 4, de cada padre. La forma ϵ 3 es la más común, y la ϵ 2 es la menos común. La forma ϵ 4 es algo más común que la forma ϵ 2. Tener la forma ϵ 4 aumenta el riesgo de desarrollar Alzheimer en comparación con tener la forma ϵ 3, mientras que tener la forma ϵ 2 puede disminuir el riesgo en comparación con tener la forma ϵ 3. Los que heredan una copia de la isoforma 4 tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar EA que aquellos que no tienen la forma ϵ 4, mientras que los que heredan dos copias de la forma ϵ 4 tienen un riesgo 8 a 12 veces mayor [75-77]. Además, aquellos con la forma ϵ 4 son más propensos a desarrollar la enfermedad a una edad más temprana que aquellos con las formas ϵ 2 o ϵ 3 del gen *APOE* [78] y se estima que del 40% al 65% de las personas diagnosticadas con la EA tienen una o dos copias del gen *APOE* ϵ 4. A pesar de estas observaciones, no es claro el mecanismo con que se vinculan los diferentes alelos de *APOE* con la EA. Sin embargo, se han propuesto algunas hipótesis para explicar su efecto: **i)** la primera postula que la APOE podría influir en la producción, distribución y eliminación del β A, en donde el alelo ϵ 4 sería menos eficiente en cumplir esta función [79], **ii)** la segunda propone que existe la evidencia de que la eliminación de β A se realiza de forma competitiva con las diferentes lipoproteínas (LP) empleando un solo receptor relacionado con cada una de las lipoproteínas (LRP), lo que dificultaría la remoción del β A, y la **iii)** tercera hipótesis que sugiere que existe una posible relación entre el metabolismo del colesterol y el metabolismo de la Proteína Precursora Amiloide (PPA) considerando que algunos pacientes que han tomado estatinas para reducir la hipercolesterolemia presentaron una incidencia reducida de la EA [80].

1.6.2. Factores genéticos causales de la EA

Estudios genéticos empleando técnicas avanzadas de análisis de ligamiento han permitido la dilucidación de los genes que codifican para las proteínas, precursora del amiloide (*PPA*),

Presenilina 1 (*PSEN1*) y Presenilina 2 (*PSEN2*) relacionados con un patrón de herencia autosómico dominante de la EAF [81]

1.6.2.1. Mutaciones en la PPA

El gen de la PPA está ubicado en el cromosoma 21q21 y codifica para una proteína transmembrana de tipo 1 que se expresa de forma ubicua. La PPA por procesamiento de modificaciones post-traslacionales alternativas produce tres tipos de transcritos: PPA695, PPA751 y PPA770. La isoforma PPA695 es la principal isoforma de la PPA que se expresa en las neuronas, mientras que la isoforma PPA751 se expresa más en los astrocitos [82]. El procesamiento proteolítico de la PPA en condiciones neuronales normales conduce a la producción de fragmentos a través de las vías no patógenicas amiloidogénicas. La mayor parte de la PPA está proteolizada por α - y γ -secretasas, lo que lleva al corte de la PPA dentro del dominio β A. El resultado de este corte es la producción de fragmentos no patógenos: sPPA α y el fragmento C-terminal (FCT) [83]. La PPA puede ser proteolizada secuencialmente de manera alterna por la β - y γ -secretasas generando los péptidos β A, sPPA β y β -FCT. La PPA de la superficie celular se internaliza permitiendo que se genere β A en la vía endocítica y se secrete en el espacio extracelular [83]. Actualmente, se han identificado 61 mutaciones en este gen (<http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations>). La mayoría de estas mutaciones están ubicadas en el exón 16 y 17, cerca de los sitios de reconocimiento por las α , β y γ secretasas, afectando su procesamiento y metabolismo normal, del mismo modo que la producción de β A y su tendencia a agregarse. Interesantemente, dos mutaciones recesivas de PPA, A673V y E693 Δ , también causan EA de inicio temprano [84]. De hecho, las mutaciones en PPA han revelado muchos aspectos importantes de los mecanismos moleculares subyacentes a la patogénesis de la EA, por ejemplo, la mutación sueca (KM670/ 671NL), aumenta los niveles plasmáticos de β A de dos a tres veces al aumentar la eficacia de la actividad enzimática de la β -secretasa [85]. El estudio del efecto de las mutaciones en la PPA proporciona evidencia que la agregación del β A es un proceso crítico en la patogénesis de la EA.

1.6.2.2. Mutaciones en los genes de las presenilinas (*PSEN1* y *PSEN2*)

El gen *PSEN1* se encuentra en el cromosoma 14q24.3, mientras que su homólogo, *PSEN2*, se encuentra en el cromosoma 1q31q42. Estos genes codifican para las proteínas PSEN1 y PSEN2 que forman parte integral de la membrana plasmática y poseen estructuras similares con nueve dominios transmembranas y con una región de bucle intracelular hidrófila [84]. Estas proteínas hacen parte de la unidad catalítica del complejo multiproteico de la γ -secretasa compuesta de 3 proteínas adicionales (nicastrin, Aph 1, PEN-2 de las siglas en inglés nicastrin, anterior pharynx defective 1 (Aph-1), and presenilin enhancer2), que corta la PPA en fragmentos incluyendo el β A [86]. Las proteínas PSEN1 y PSEN2 se localizan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, donde desempeñan un papel importante en el procesamiento de proteínas [87,88]. Hasta el presente, más de 300 mutaciones patogénicas han sido identificadas en *PSEN1*, las que representan aproximadamente el 80% de los casos de EAF de aparición temprana (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>) y más de 80 mutaciones patógenas dominantes en *PSEN2*, que representan aproximadamente el 5% de los casos familiares de EA de aparición temprana (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-2>).

En Colombia, y en especial en la Región del noroeste de Antioquia, se reportó en 1995 la mutación E280A, que consiste en el cambio de un ácido glutámico por una alanina en el codón 280 (g.50024 A > C, c.839A>C, exón 8) en la *PSEN1* causal de la EAF precoz o temprana con un patrón de herencia autosómica dominante [11]. Estos hallazgos, aportaron información importante de la genética, biología celular y molecular y de la neuropatológica de la mutación E280A-PSEN1. De hecho, esta mutación que se presenta en uno de los grupos familiares más grandes del mundo con 6.000 miembros y 2.000 afectados (diagnosticados con la mutación), conocida como la "mutación Paisa", incrementa los niveles del β A en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con esta forma EAF temprana [89] y por consiguiente apoya la hipótesis de la cascada del beta amiloide, la cual propone que los depósitos del péptido β A son la causa del inicio de la pérdida neuronal como factor desencadenante del deterioro cognitivo en los pacientes con la EAF [11].

CAPITULO 2: LA EA FAMILIAR (EAF) PRODUCIDA POR LA MUTACIÓN E280A EN EL GEN DE *PSEN1*

2.1. La PSEN1

2.1.1. Estructura molecular de la PSEN1

El gen *PSEN1* está compuesto de 50 a 75 kb y está organizado en 12 exones. La secuenciación de este gen condujo a una proteína de 467 aminoácidos. La PSEN1 es una proteína transmembranal politópica de ~50 kDa y 467 aminoácidos, posee una topología de 9 dominios transmembrana helicoidales, con un extremo C-terminal extracelular y un extremo N-terminal citosólico (**Figura 6**) [90]. La PSEN1 sufre un procesamiento endoproteolítico para producir un fragmento N-terminal de ~27-28 kDa y uno C-terminal de ~16-17 kDa. La PSEN1 es una proteína, con actividad enzimática de proteasa, y constituye la unidad catalítica del complejo multiproteico biológicamente activo de la γ -secretasa que está compuesta por 3 proteínas adicionales (nicastrin, Aph 1, PEN-2 de las siglas en inglés nicastrin anterior pharynx defective 1 (Aph-1), and presenilin enhancer2)) [91]. La función de la PSEN1 es cortar principalmente la Proteína Precursora del Péptido beta-amiloide (PPA) y regular su proteólisis intramembranal, lo que significa que mutaciones en el gen *PSEN1* afectan directamente la función proteolítica y por consiguiente la producción del β A. Interesantemente, ninguna de las mutaciones lleva a una disminución o ausencia de la proteína, más bien, las diferentes mutaciones identificadas en la PSEN1 conducen a una ganancia específica de toxicidad inducida por su función catalítica de corte de la PPA y la generación del péptido β A42 [91].

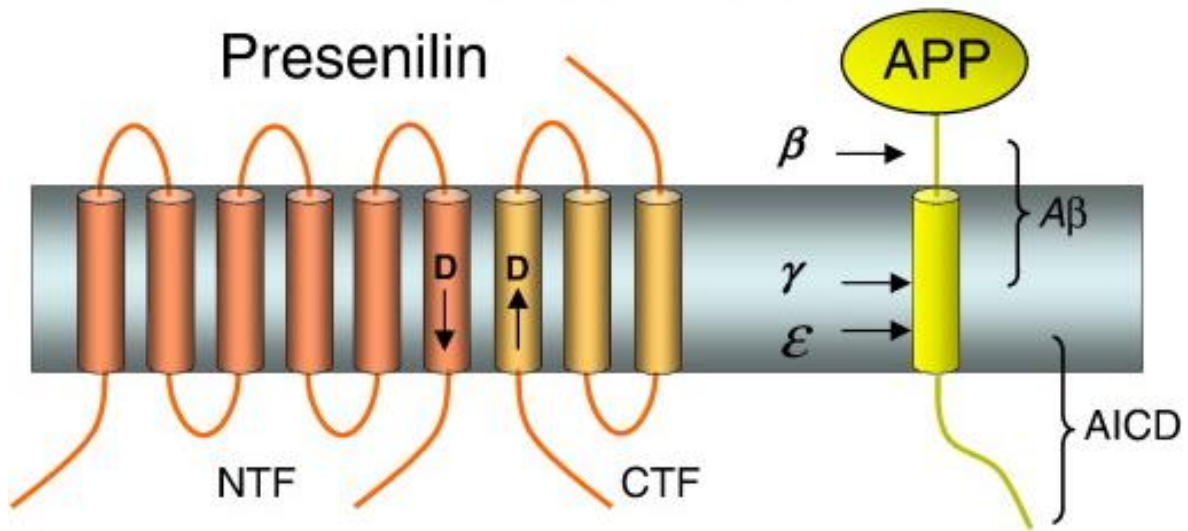


Figura 6. Estructura de la PSEN1. Imagen tomada de la ref. [92]

2.1.2. La PSEN1 y el péptido beta Amiloide (β A) en la EAF

Como se mencionó anteriormente, la acumulación y oligomerización del péptido β A juega un papel central en la patogénesis de la EA. El péptido β A es un producto natural del metabolismo de la PPA. La PPA se expresa en numerosas células tejidos del organismo, incluidas las neuronas, las células musculares lisas de la pared vascular y las plaquetas. Una vez sintetizada la PPA en el retículo endoplásmico rugoso, pasa por el aparato de Golgi donde es glicosilada y empaquetada en vesículas de transporte, atraviesa el citoplasma y, por último, se inserta en la membrana celular. Esta proteína puede ser procesada por dos vías conocidas como: *i*) la vía no-amiloidogénica y *ii*) la vía amiloidogénica, siendo ambas vías metabólicas parte de la fisiología normal celular. Estas vías son reguladas intracelularmente a favor de la vía no-amiloidogénica [93]. En esta vía, la PPA es procesada por la α -secretasa y la γ -secretasa. Inicialmente, en el procesamiento de la PPA actúa la α -secretasa entre la Lys-16 y Leu-17 y como resultado de la proteólisis se dan dos productos, un fragmento α -PPA soluble (α -PPA) que es liberado al espacio extracelular y un segundo fragmento C-terminal que se queda anclado en la membrana (CTF-83). El fragmento α -PPA no está sujeto a un metabolismo adicional, mientras CTF-83 es procesado por la γ -secretasa dando lugar a dos

nuevos fragmentos, uno que es un dominio intracelular amiloide (de la sigla en inglés, amyloid precursor protein intracellular domain, AICD) y el otro un fragmento p3 con un peso molecular de 3 kDa [94] (**Figura 7A**). A diferencia de la vía no-amiloidogénica, en la vía amiloidogénica, los cortes en la PPA son realizados por la β -secretasa y la γ -secretasa. El sitio de corte de la β -secretasa ocurre en el residuo de aminoácidos de la Met/Asp de la PPA, generando un fragmento β -PPA inferior en tamaño respecto al fragmento α -PPA pero igualmente soluble. En la membrana queda anclado un fragmento correspondiente a la porción C-terminal (CTF-99) que es posteriormente procesado por la γ -secretasa, generando así un fragmento AICD y el fragmento de 4 kDa que corresponde al péptido β A de 42 aminoácidos (aa) [94,95] (**Figura 7B**).

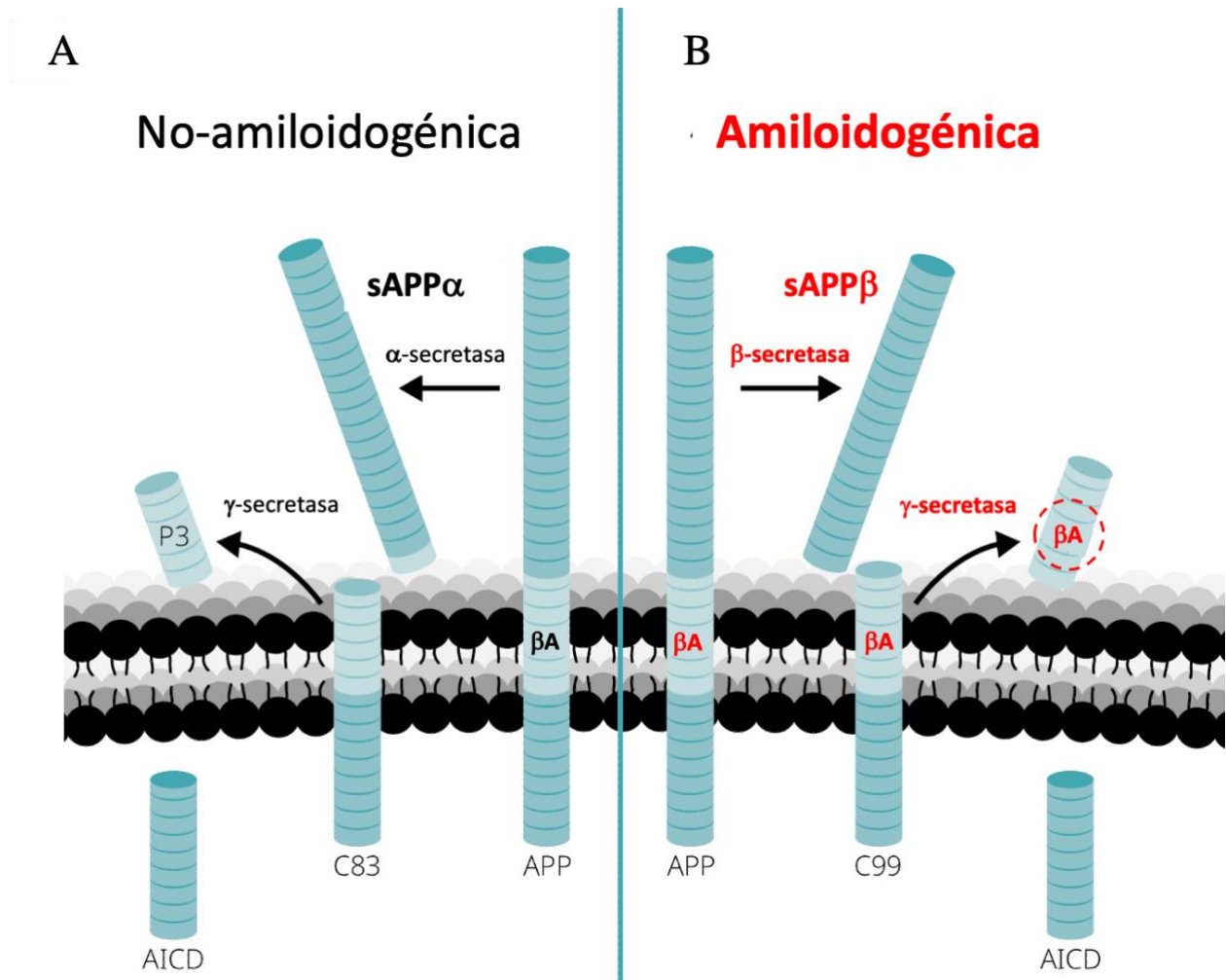


Figura 7. Vías de procesamiento de la PPA y generación del péptido β A. Vías moleculares no-amiloidogénica (A) y amiloidogénica (B). Imagen adaptada de: <https://www.abcam.com/neuroscience/beta-amyloid-and-tau-in-alzheimers-disease>.

En la EA el péptido β A42 tiene un cambio conformacional que lo hace insoluble y por consiguiente se deposita en el parénquima. Inicialmente el péptido β A se deposita en placas difusas amorfas asociadas con algunas neuritas distróficas, es compactado por algunas proteínas asociadas y crece poco a poco hasta que toma una conformación de hoja β [35]. Acumulaciones de proteínas β A dan lugar a una serie de eventos neurotóxicos que pueden ocasionar la hiperfosforilación de la proteína Tau y conducir a una disfunción y muerte neuronal.

2.2. La PSEN1 y la actividad de la γ -secretasa en la EAF

La γ -secretasa escinde más de 90 proteínas transmembrana de tipo I dentro de su dominio transmembrana en un proceso llamado Proteólisis intramembrana regulada (de su sigla en inglés, Regulated intramembrane proteolysis, RIP), que implica a la γ -secretasa en muchos procesos biológicos [96]. Durante el RIP, primero se elimina el ectodominio de los sustratos mediante una sheddasa, dejando los fragmentos C-terminales (CTF) incrustados en la membrana restantes como sustratos directos para la γ -secretasa. La escisión ocurre dentro de su dominio transmembrana, liberando un fragmento citosólico intracelular y un péptido más pequeño dentro del espacio extracelular.

La γ -Secretasa al ser un complejo tetramérico formado por nicastrina (NCT), faringe anterior defectuosa 1 (APH1), potenciador de presenilina 2 (PEN-2) y presenilina1 (PSEN-1); requiere un ensamblaje estequiométrico de las 4 subunidades para obtener un complejo maduro y funcional [97] y la ausencia de una subunidad da como resultado la retención de las subunidades restantes en el retículo endoplásmico (RE) o su rápida degradación [98]. PSEN-1 es la subunidad catalítica con dos residuos de aspartato responsable de catalizar la escisión del sustrato. La función de APH1 es menos clara, aunque se sugiere que desempeñe un papel estabilizador en el ensamblaje complejo y la interacción del sustrato. NCT tiene un

ectodominio fuertemente glicosilado y está involucrado en la interacción del sustrato y/o el anclaje. PEN-2 interactúa directamente con el fragmento N-terminal de PSEN-1 (NTF) y es esencial para la endoproteólisis de PSEN y la estabilidad del complejo. Para agregar a la complejidad de la biología de la γ -secretasa, la existencia en humanos de dos PSEN homólogos (PSEN1 y 2) y dos isoformas de APH1 (APH1A y B) da lugar a un mínimo de cuatro complejos distintos de γ -secretasa que coexisten en células y tejidos [99].

Las cuatro subunidades del complejo γ -secretasa se translocan cotraduccionalmente en el RE. Las subunidades monoméricas no ensambladas se degradan rápidamente en el RE, en contraste con el complejo γ -secretasa estable, de vida prolongada y completo. En este sentido, mientras que los complejos PSEN1 están presentes de manera prominente en la superficie celular y en los compartimentos endosómicos tempranos, los complejos PSEN2, por otro lado, están restringidos a endosomas tardíos y lisosomas en células (neuronas) y tejido cerebral [100]. Esta distribución restringida está mediada por un motivo ERTSML altamente conservado en el extremo N de PSEN2, que no está presente en PSEN1, ya que la eliminación o el cambio de uno o más residuos críticos es suficiente para anular su orientación a los lisosomas. Este motivo ERTSML se une selectivamente al complejo Adapter-Protein 1 (AP1) que clasifica la carga entre la red trans-Golgi y los endosomas/lisosomas tardíos, proporcionando así el mecanismo para dirigir PSEN2/ γ -secretasa a estos compartimentos, probablemente a través de la clasificación de endosomas.

Curiosamente, en situaciones normales se encuentra poca PSEN1/ γ -secretasa en endosomas/lisosomas tardíos, pero esto aumenta notablemente en algunas mutaciones de EAF, incluidas PSEN1 L166P y G384A. Ambas mutaciones se encuentran entre las agresivas con una edad de inicio muy temprana [101]. Como PSEN1 carece del motivo de selección que se encuentra en PSEN2, estos hallazgos sugieren que los cambios conformacionales, como los mediados por mutaciones causales de EAF, también pueden afectar la selección y localización normales, impactando directamente en los niveles de tóxicos más largos de β A42 en estos compartimentos. Es por esto que la clasificación de los endosomas y la subsiguiente orientación a los lisosomas puede conducir a un aumento en la producción de β A intracelular, específicamente, del β A42, el péptido más tóxico [102] (**Figura 8**). Todo esto

pone de manifiesto la potencial trascendencia de procesos amiloides intracelulares anormales en la EAF y el efecto que podrían tener estos fragmentos intracelulares en el desencadenamiento de eventos patológicos tempranos como estrés oxidativo (EO) y apoptosis.

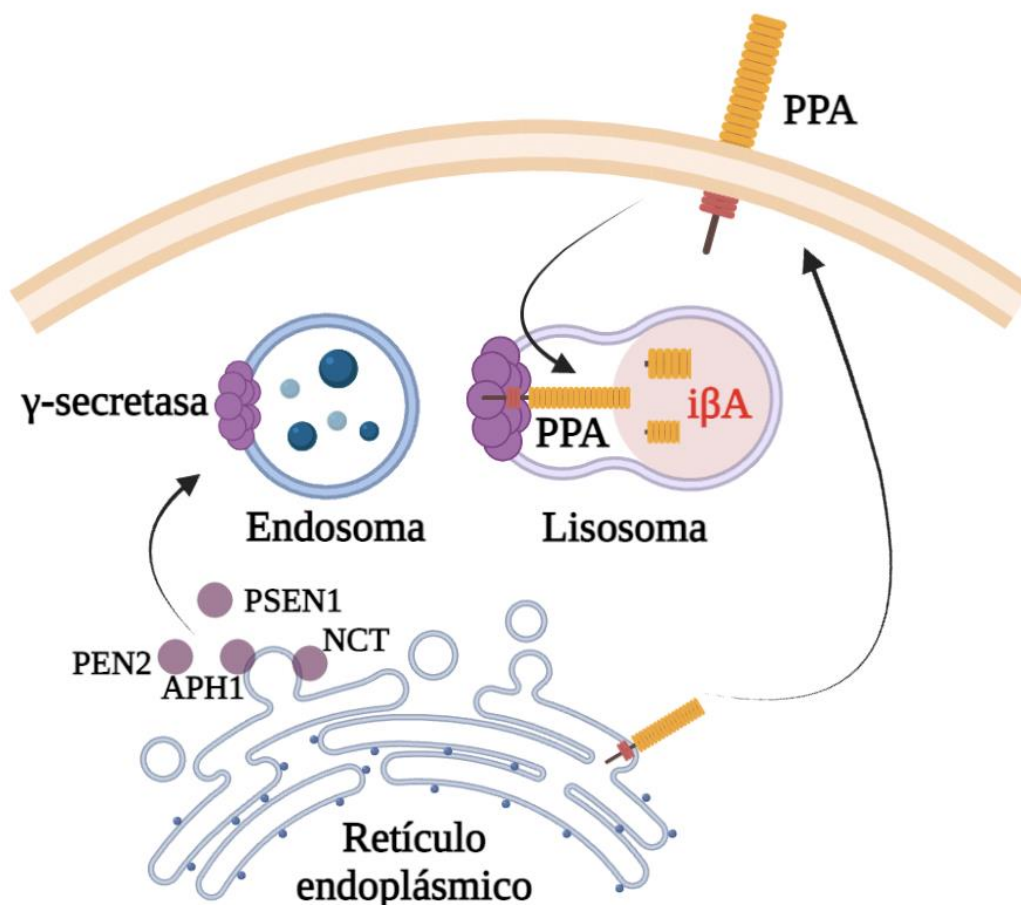


Figura 8. Retención del complejo γ -secretasa en endosomas tardíos/lisosomas y migración intracelular de la PPA para el corte y producción elevada de β A42 intracelular. Imagen adaptada de la ref. [103]

2.3. La EAF PSEN1 E280A: relación con el Estrés Oxidativo (EO) y la apoptosis

El EO se define como un desbalance en la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) frente a un sistema antioxidante insuficiente. Lo cual conduce a un potencial daño celular a nivel de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos [104]. Las EROs, son moléculas pequeñas altamente reactivas de oxígeno, que pueden ser radicales o no radicales (**Tabla 1**).

Los radicales libres son moléculas que contienen al menos un electrón desapareado, lo que les confiere una alta reactividad ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica [105]. Las EROs se generan de manera endógena a través del proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial o en interacciones con fuentes exógenas como los compuestos xenobióticos. Estas sirven como moléculas de señalización celulares [106,107].

El EO puede producirse de forma tanto exógena como endógena. Una de las principales fuentes exógenas está dada por la radiación ionizante como rayos-X o rayos- γ . Así mismo, sustancias químicas como pesticidas, bencenos, toluenos o cantidades excesivas de iones como Fe, Cu, Cr y Co tienen la capacidad de generar radicales libres y subsecuentemente producir peroxidación de biomoléculas y alterar proteínas barredoras de EO. Por otra parte, el EO endógeno se genera por procesos metabólicos, inflamatorios y por la activación de algunas vías de señalización celular donde las EROs cumplen funciones como segundos mensajeros. En condiciones normales, las células están dotadas de mecanismos capaces de eliminar el exceso de EROs, pero cuando hay fallas y aumentan los niveles de estas especies, se pierde su acción fisiológica y empiezan a ser nocivos para la célula [106]. Una de las fuentes de mayor producción de EROs en el interior de la célula es la cadena transportadora de electrones (CTE), durante el metabolismo oxidativo en la mitocondria se genera EROs como subproductos de este proceso fisiológico.

Tabla 1. Clasificación de las EROs. Tomada de la referencia [105]

Radicales	No radicales
Superóxido (O_2^-)	Oxígeno singlete (O_2)
Hidroxilo (OH^-)	Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)
Peroxilo (RO_2^-)	Ozono (O_3)
Alcoxilo (RO^-)	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)
Hidroperoxilo (HO_2^-)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
	Óxido nítrico (NO)
	Ácido hipobromoso ($HOBr$)

La mitocondria es la organela celular encargada de producir trifosfato de adenosina (ATP) a través de la respiración celular que comprende tres etapas: la glucólisis, el ciclo de Krebs y la CTE. La CTE, ubicada en la membrana interna mitocondrial está conformada por cuatro complejos enzimáticos (I, II, III y IV), dos moléculas que actúan como una turbina (coenzima Q y citocromo c) y la ATP sintetasa. Sólo los tres primeros complejos (I, II y III) actúan como transportadores de electrones, mientras el complejo IV utiliza estos electrones para reducir el oxígeno molecular (O_2) a agua (H_2O). A medida que los electrones se transportan a través de los complejos mitocondriales, se bombean protones hacia el espacio intermembranal generando un gradiente electroquímico, esto se traduce en acumulación de energía que es finalmente usada para generar ATP a través de la ATP sintetasa [108]. La producción de EROs es necesaria para generar un potencial de membrana ($\Delta\psi$) y producir ATP, en consecuencia, cualquier daño en algunos de los componentes de la CTE podría llevar a un aumento de la producción de EROs y su liberación a otros compartimentos celulares [109,110].

El sistema nervioso central posee una alta tasa metabólica comparada con otros órganos del cuerpo, como consecuencia, éste consume casi el 20% del oxígeno disponible en el cuerpo humano. Las neuronas son células completamente diferenciadas que requieren grandes cantidades de ATP para el mantenimiento de los gradientes iónicos de la membrana y por consiguiente para realizar la neurotransmisión. Debido a que el ATP es principalmente generado por el metabolismo oxidativo, es comprensible deducir que las neuronas son mayoritariamente dependientes de la función mitocondrial [111]. La fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *Oxidative Phosphorylation*) en la mitocondria genera la mayoría del ATP en las células, sin embargo, es bien conocido que la OXPHOS libera alrededor de un 1-2% del total del O_2 consumido en forma de radicales libres [112]. Un radical libre es un átomo, molécula o ion que tiene electrones de valencia no apareados. Estos electrones desapareados hacen que los radicales libres sean altamente reactivos hacia otras sustancias, o incluso hacia sí mismos. Las moléculas radicales a menudo se dimerizan espontáneamente o polimerizan si entran en contacto entre sí [113]. Los radicales más importantes que se producen en los sistemas vivos son los derivados del O_2 , y se conocen como EROs. Dentro de las EROs que

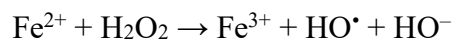
se pueden producir por un estímulo tóxico se encuentran: el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el peroxinitrito ($ONOO$) [114] (**Tabla 1**). Cuando en una célula se producen estas moléculas, inmediatamente deben ser balanceadas o eliminadas mediante los sistemas antioxidantes presentes en las células en función de mantener la homeostasis celular [115]. Los sistemas antioxidantes pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. El primero involucra la superóxido-dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión (GSH), glutaredoxinas, tioredoxinas, peroxiredoxinas y la catalasa como principales enzimas [114,116]. En los sistemas no enzimáticos, se encuentra la vitamina E que es muy importante por su capacidad de proteger de los daños producidos por los radicales libres a las membranas celulares.

Numerosos estudios han evidenciado que el EO tiene un gran impacto en la patogénesis de la EA, generando el daño de todos los componentes celulares y disfunción mitocondrial [117,118]. Así mismo, en la EA se ha observado que la acumulación de βA además de incrementar el EO, genera disfunción mitocondrial y alteración energética, llevando a las neuronas a la muerte [119]. De hecho, se ha demostrado que el βA durante el proceso de generación de EO también tiene la capacidad de internarse en la membrana mitocondrial [120] y bloquear los complejos IV y V [121], fenómeno que probablemente estaría promoviendo la producción de EROs en ésta organela [122]. Así mismo, se ha postulado que dentro de la mitocondria el βA es capaz de unirse a la enzima alcohol deshidrogenasa [123], inhibiendo así la detoxificación de aldehídos, lo que trae como consecuencia la disfunción mitocondrial y, por supuesto, el aumento excesivo de EROs [124]. De igual forma, se ha podido demostrar que el fragmento $\beta A_{(25-35)}$ induce EO *per se* [125], lo que apoya la hipótesis que el EO es uno de los eventos iniciales y causales del desarrollo de la neuropatología de la EA [126].

Estudios realizados en tejidos *post mortem* de cerebros de pacientes con la EA, han evidenciado daño por EO asociado con la acumulación de péptido βA (y ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal) [127]. De igual modo, se han encontrado niveles elevados de metales como Cu, Zn y Fe, mediadores de la sobreproducción de EROs y el aumento en los depósitos de βA_{42} . De hecho, se ha reportado una correlación positiva entre el aumento en las concentraciones del βA , la formación de placas seniles y la presencia de déficits de

memoria en ratones transgénicos que poseen una forma mutante de la PPA (Tg2576) [128]. Este hallazgo se corroboró con la identificación de una relación positiva entre los niveles de β A, la neurodegeneración y el deterioro y pérdida neuronal, al comparar cerebros de pacientes con EA y controles [129,130]. En un estudio reciente en el que se realizaron inyecciones intrahipocampales en ratones transgénicos (5xFAD) de extractos cerebrales que contienen β A para inducir la formación de placas amiloides *in vivo* se demostró que el β A indujo apoptosis - un tipo de muerte neuronal dependiente de la activación de la proteasa ejecutora de muerte caspasa-3 -. Estos estudios confirman el efecto neurotóxico del péptido β A y el EO en los procesos neurodegenerativos en modelos de la EA [131]. En este sentido, se han postulado varias hipótesis que tratan de explicar el papel del β A y su relación con las EROs y la neurodegeneración en la EA. Una de estas hipótesis propone que los oligómeros de β A pueden incorporarse directamente a las membranas y formar estructuras similares a poros llamadas "canales amiloides" los cuales son selectivamente permeables al Ca^{2+} , los cuales permiten que rápidamente las concentraciones de Ca^{2+} citosólico aumenten por su liberación de los sub-compartimientos celulares como retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondria y vesículas, alterando la homeostasis del calcio neuronal, la bioenergética mitocondrial, la liberación del citocromo c y factores pro-apoptóticos conducentes a la muerte neuronal por apoptosis [132,133]. La homeostasis del Ca^{2+} cumple una función importante en el mantenimiento de la plasticidad sináptica y del proceso de formación de la memoria [134].

Interesantemente, nuestro grupo de investigación logró demostrar que el βA_{25-35} induce apoptosis en un modelo *in vitro*, vía una cascada de señalización mediada por el H_2O_2 [125]. De hecho, se ha reportado que el H_2O_2 puede difundirse a través de las membranas biológicas y activar diferentes tipos de proteínas como quinasas, factores de transcripción y oxidación de proteínas consideradas sensores de EO, como por ejemplo el DJ-1 [135]. Así mismo, el H_2O_2 tiene la capacidad de interactuar con iones de metales pesados como Cu y Fe que pueden generar radicales libres de O_2 , los cuales se encuentran en concentraciones elevadas en cerebros de pacientes con EA [136]. Cuando se encuentra el H_2O_2 en presencia de Cu^{1+} y Fe^{2+} se da la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton [137]:



Estudios recientes han demostrado que a medida que se da la progresión de la EA, aumenta la posibilidad de que ocurran interacciones que promuevan la formación de complejos $\beta\text{A}/$ metal y la agregación del péptido βA [138]. En efecto, los experimentos *in vitro* han mostrado claramente que la formación del complejo $\beta\text{A}/\text{Cu}^{1+}$ es capaz de producir EROs, aunque los posibles mecanismos *in vivo* mediante los cuales este complejo contribuya al EO no están claros [139]. Sin embargo, se ha demostrado que el H_2O_2 producto de la toxicidad de βA puede reaccionar con Fe^{2+} , generar EO y activar vías de muerte celular [125]. En este contexto, se ha logrado proponer un mecanismo de señalización inducido por el βA_{25-35} en donde una vez se produce el H_2O_2 , 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 [140] (**Figura 9**).

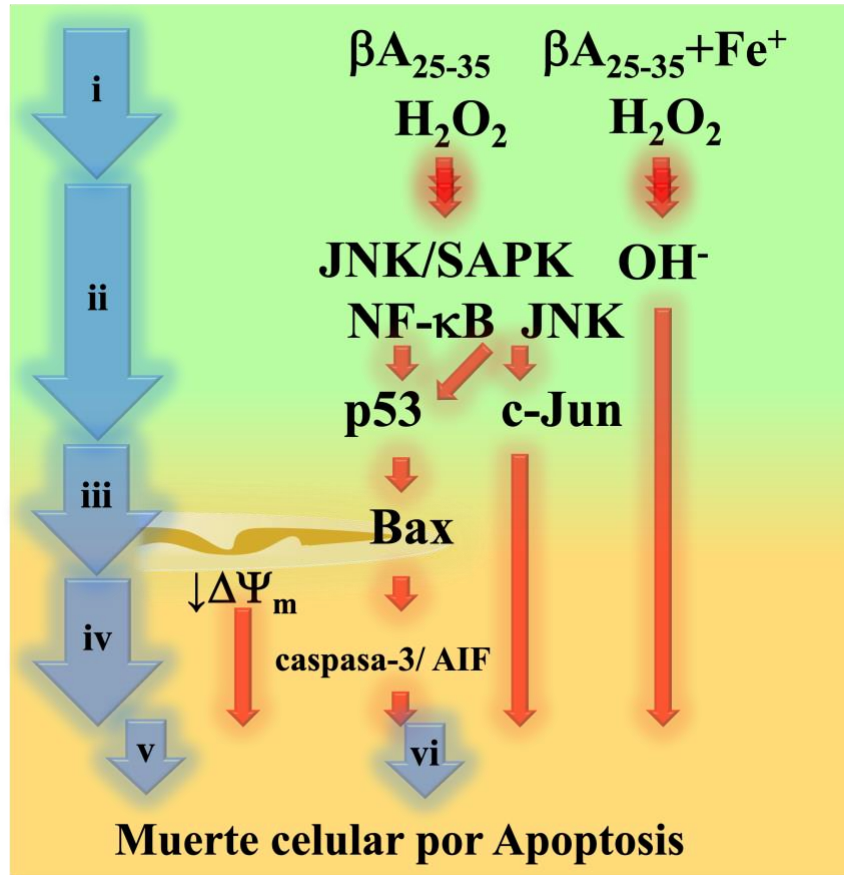


Figura 9: Vía de señalización de apoptosis inducida por la fracción tóxica del βA_{42} , el βA_{25-35} y el Fe^{2+} . (i) El βA_{25-35} solo o en combinación con Fe^{2+} genera H_2O_2 que será más elevada si esta en presencia de Fe^{2+} . El H_2O_2 (ii) activa quinasas que, corriente abajo, inducen la expresión de factores de transcripción NF- κ B/ p53 JNK/ c-Jun. Como resultado (iii) se produce daño mitocondrial y (iv) la activación de los efectores de apoptosis caspasa-3 y AIF. A nivel bioquímico, se puede detectar (v) la pérdida del $\Delta \Psi_m$ y (vi) la condensación y fragmentación nuclear. Imagen adaptada de [141]

2. 4. La EAF PSEN1 E280A en Colombia

La EAF afecta a un gran número de personas en el mundo y particularmente a la población del departamento de Antioquia en donde existen 25 familias con 2.000 mil miembros que la padecen [12]. Esta enfermedad neurodegenerativa de carácter hereditario, se manifiesta con deterioro cognitivo y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria a medida que

se presenta muerte neuronal en diferentes áreas del cerebro [11] y tiene una duración aproximada de 10 años posterior al diagnóstico [15]. Por consiguiente, la EAF representa una alta carga social y económica para las familias de los pacientes que la padecen, para el departamento y para el país en general, por lo que la organización mundial de la salud (OMS) ha resaltado su impacto dramático en países de ingresos medianos y bajos, incluido Colombia, en los que se concentra el 60% de la carga económica de esta enfermedad [142].

El estudio de la EAF es relevante para Colombia y especialmente para el departamento de Antioquia debido a que se encuentra en esta región, uno de los grupos poblacionales genéticos más grandes del mundo, repartidos principalmente en los municipios de Angostura, Yarumal, Dabeiba, Liborina, Sopetrán, Donmatías, Olaya, y Medellín. La EAF que afecta a la población antioqueña, es una forma clínica temprana que se presenta con pérdida de memoria desde los 40 años lo cual resulta preocupante, porque los individuos se encuentran en la edad productiva [15]; y aún más alarmante, porque la enfermedad tiene una penetrancia del 100% en donde el 50% de los hijos de una persona afectada tienen el riesgo de padecerla [143]. La forma clínica de la EAF es causada, principalmente por la mutación E280A en el gen *PSEN1* ubicado en el cromosoma 14, que codifica para la proteína PSEN1, la cual fue descubierta en 1995 por un equipo de investigadores del grupo de neurociencias de la Universidad de Antioquia (GNA), quienes la denominaron “La mutación paisa”. Se considera que hubo un efecto fundador en el cual la mutación fue traída por un pequeño grupo poblacional que se estableció y expandió por todo el departamento de Antioquia el cual fue considerado por muchos años como un aislado genético, lo que favoreció la concentración de este problema de salud pública en el departamento. Es muy importante enfatizar que las personas afectadas por la EAF en Antioquia empiezan a padecer los signos clínicos a muy temprana edad, por lo que estos casos se suman a los casos de morbilidad y mortalidad por EA en Colombia y constituyen un alto costo para las familias y los sistemas de salud.

A pesar de los avances en los mecanismos moleculares de la EAF en modelos *in vitro* e *in vivo* y de los estudios clínicos realizados en búsqueda de terapias efectivas, hasta la fecha, no se han obtenido resultados positivos [144], lo cual puede deberse a que aún no se conocen con precisión las causas, ni se han dilucidado con exactitud los mecanismos de señalización que

conducen a la muerte neuronal ni el papel de las mutaciones en PSEN1, desencadenantes de la EAF. Más aún, todavía no existe un modelo que reproduzca el espectro completo de la neuropatología de la EAF de forma natural, sin la necesidad de sobre-expresar genes mutados.

Las manifestaciones clínicas de la EAF no son diferentes de la forma de la EA esporádica (EAE). Aunque la pérdida neuronal y deterioro cognitivo es causado por las mutaciones en el gen *PSEN1* que conllevan a una pérdida de la memoria de inicio temprano y a un rápido deterioro cognitivo global, con una duración de la enfermedad entre 5-8 años (109), junto con la presencia de mioclonías y convulsiones generalizadas, la EAE también se presenta con trastornos del lenguaje, lentitud en el procesamiento cognitivo, problemas de atención, temblor, parkinsonismo, características extrapiramidales, mioclonías y convulsiones que conllevan a una pérdida progresiva de la memoria. Además, la evolución en el tiempo y las características neuropatológicas no son diferentes de la forma esporádica, puesto que ambas formas clínicas se caracterizan histopatológicamente por la presencia de 4 marcadores principales: *i*) agrupaciones proteicas extracelulares de proteína β A (placas seniles) en la región cortical del cerebro, *ii*) ovillos neurofibrilares intracelulares que ocupan gran parte del citoplasma celular de neuronas piramidales, *iii*) pérdida progresiva de neuronas colinérgicas del hipocampo, y *iv*) gliosis. Todos estos hallazgos pueden estar acompañados de daños sinápticos, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, efectos vasculares, reactividad de las células de la microglia y astrocitos e inflamación, lo cual genera daño y muerte neuronal. Todos estos eventos moleculares conllevan a la atrofia cerebral marcada en el hipocampo y en áreas asociadas con la corteza cerebral.

CAPÍTULO 3: MODELOS *IN VITRO* 2D y 3D PARA EL ESTUDIO DE LA NEUROPATOLOGÍA Y LA BÚSQUEDA DE TERAPIAS ALTERNATIVAS DE LA EAF

3.1. CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES (CME) COMO MODELO 2D DE LA EAF PSEN1 E280A Y TAMIZAJE DE MOLÉCULAS

3.1.1. Historia

En la década de 1970, Wolf y Trentin describieron un modelo de microambiente hematopoyético, mediante el cual la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (CMH) sería impulsada por el microambiente de la médula ósea. En este sistema, el mantenimiento en el tiempo de las CMH dependía estrictamente de la generación de una capa adherente de células estromales. Estas células del estroma se aislaron según su patrón de expresión de antígenos de membrana de acuerdo a lo descrito por Simmons y Torok-Storb en 1991 [145]. La evidencia definitiva de que la médula ósea incluye células que pueden generar células formadoras de tejido conectivo fue proporcionada originalmente por el trabajo pionero de Alexander Friedenstein [146]. Este investigador, en la década de 1960, realizó una serie de experimentos que demostraron la existencia de un precursor de los osteoblastos y del tejido fibroso en la médula ósea. Estos experimentos consistieron en sembrar células de médula ósea a baja densidad y dejarlas una o dos semanas en cultivos líquidos que contenían suero, y ver que sucedía y efectivamente, observó la formación de colonias discretas que consistían en células alargadas, no fagocíticas, adherentes al plástico, de apariencia fibroblástica que denominó precursores osteogénicos.

En 1999, Mark Pittenger demostró que clones trilineales adipocíticos, osteoblásticos y condrocíticos estaban presentes en la médula ósea humana y proporcionó un análisis de antígeno de membrana que indicaba que estas expresaban pocos marcadores específicos endoteliales o hematopoyéticos [147]. Estudios posteriores confirmaron que la población de CME era claramente distinta de la de las células endoteliales o hematopoyéticas [148]. Desde su descripción inicial, estas células multipotentes de la médula ósea han recibido diferentes nombres. Friedenstein usó el término células madre osteogénicas, mientras que Maureen Owen las llamó células madre estromales de la médula ósea para subrayar que generan

células estromales en cultivos a largo plazo. Arnold Caplan fue el primero en introducir el término Células Madre Mesenquimales, que se ha vuelto popular en la literatura actual. Sin embargo, Paolo Bianco y Pamela Robey han sugerido el término alternativo Célula madre esquelética para subrayar su potencial para dar lugar a los componentes celulares del esqueleto. Por otra parte, James Dennis ha sugerido el nombre de células progenitoras mesenquimales, argumentando que estas células no eran células madre *per-se*. Siguiendo un razonamiento similar, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) ha propuesto el término célula estromal mesenquimal multipotente [149].

3.1.2. Definición

Las CME son un tipo de célula de origen mesodérmico, identificadas inicialmente a mediados de 1960 [150]. Estas CME pueden ser aisladas de varios tejidos adultos o de tejidos fetales y membranas, incluyendo el tejido adiposo, médula ósea, del tejido y la sangre de cordón umbilical [151] y de la sangre menstrual [152]. *In vivo*, las CME proveen soporte estructural en diversos órganos y regulan el flujo de varias moléculas. Su origen estromal les da la característica de poseer una rápida adherencia a las superficies de cultivo, así como su morfología fusiforme. Adicionalmente, las CME presentan una alta tasa de proliferación en medios de cultivo básicos (pocos suplementos) y estabilidad genómica [153].

La SITC ha propuesto criterios mínimos para definir las características propias de las CME que incluyen: **i)** capacidad de adherencia al plástico **ii)** poseer morfología fusiforme, **iii)** formar colonias, **iv)** expresión positiva para un grupo específico de marcadores superficie ($\geq 95\%$): CD29, CD44, CD54, CD55, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117 y CD166 y ausencia de expresión de los marcadores hematopoyéticos ($\leq 2\%$ positivo) tales como: CD14 o CD11E, CD19 o CD79D, CD34, CD45, y el Antígeno Leucocitario Humano clase II (HLA clase II); entre estos marcadores, los utilizados con mayor frecuencia en la caracterización de las CME son: CD73, también conocido como ecto 5' nucleotidasa, CD105, conocido como endoglina, y CD90 también conocido como Thy, proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas; y otra de las propiedades es **v)** tener la capacidad de diferenciarse *in vitro* en adipocitos, condrocitos y osteoblastos [149]. Así mismo, diferentes estudios realizados con CME han mostrado que estas células tienen la capacidad de auto-renovación y clonogenicidad [154].

3.1.3. Fuentes

Las CME han sido aisladas y purificadas de diferentes tejidos como la médula ósea [147], tejido adiposo [155], líquido amniótico [156], membrana amniótica [157], tejidos dentales [158], endometrio [159], sangre menstrual [160], sangre periférica [161], líquido sinovial [162] y gelatina de Wharton [163,164]. A diferencia de la médula ósea, las CME de las otras fuentes pueden obtenerse fácilmente por métodos no invasivos, y su proliferación se puede mantener hasta por 25 pases [165]. En términos generales, las CME aisladas a partir de diferentes fuentes se puede cultivar usando medios de cultivos suplementados, tales como el DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media) [166,167], incluyendo el DMEM-bajo en glucosa (DMEM-LG) [168,169]. Los medios de cultivo básicos se pueden suplementar con suero de origen fetal bovino (SBF) al 10% [166]. Al igual que los medios de cultivo y los suplementos, la concentración de O₂ también puede afectar a la expansión y la proliferación de las CME [170]. La optimización del protocolo para el aislamiento, caracterización y expansión de las CME es la clave del éxito para su uso ~~de estas células como una buena fuente~~ en la medicina regenerativa [167]

3.1.3.1. Gelatina de Wharton

El cordón umbilical (CU) es una estructura que conecta la placenta con el feto, proporcionando así una fuente de nutrición al feto en desarrollo. Esta estructura mide de 40 a 60 cm de largo, con una circunferencia de 1 a 2 cm y esta compuesta de una cubierta exterior de una sola capa de epitelio amniótico que encierra un tejido conectivo mucoide a través del cual tres vasos, una vena y dos arterias, transportan sangre oxigenada y desoxigenada entre la placenta y el feto, respectivamente. A diferencia de otros vasos de diámetro similar en el cuerpo humano, los vasos umbilicales comprenden sólo una túnica íntima y media, pero no una túnica adventicia. Se considera que las funciones adventicias de soporte vascular y función contráctil, las cumple el tejido conectivo mucoide de la **Gelatina de Wharton (GW)**, descrita por primera vez por Thomas Wharton en 1656. De manera interesante, la gelatina no está innervada, ni contiene otros vasos sanguíneos o linfáticos [171] (**Figura 10**).

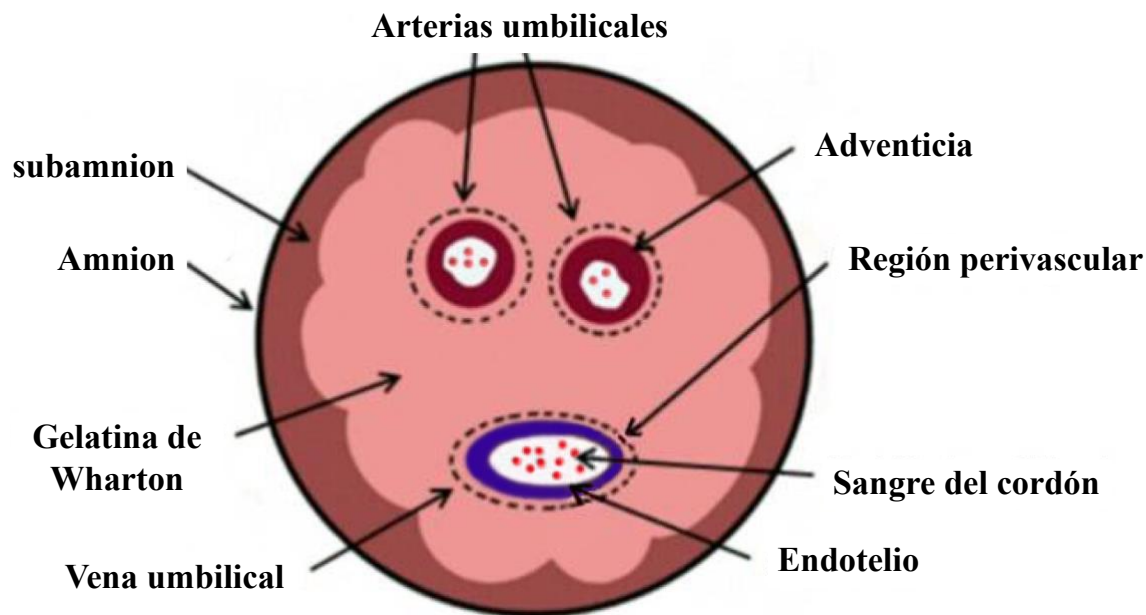


Figura 10: Estructura del cordón umbilical. Ubicación transversal de las principales estructuras del cordón umbilical. Se resalta la capa gruesa conformada por la Gelatina de Wharton. Imagen adaptada de la ref. [172]

La GW se clasifica como un tejido conectivo. Algunos consideran que la gelatina de Wharton es un tejido conectivo simple en contraste con los tejidos conectivos líquidos o esqueléticos, pero se clasifica más comúnmente como un tejido conectivo mucoide o mucoso. Por lo general, otras células también están presentes en la matriz de los tejidos conectivos que incluyen alguna forma de tipo de célula fagocítica y también aquellas que proporcionan elementos vasculares y nerviosos. En este contexto, la GW del cordón humano es única entre los tejidos conectivos, ya que contiene únicamente células mesenquimales que comprenden los miofibroblastos funcionales del tejido y sus precursores. Sumado a ello, no se han descrito otros tipos de células en la gelatina de Wharton, ni elementos vasculares o nerviosos, excepto los tres vasos principales de la médula. En términos generales, se ha descrito que el 95 % de la GW es una matriz extracelular que comprende colágeno, glucoproteína, hialuronina, glicosaminoglicano sulfatado y proteínas plasmáticas difusibles [171].

Las CME se pueden dividir en dos clases: las CME adultas y las CME fetales/perinatales, respectivamente derivadas de tejidos adultos, como la médula ósea y el tejido adiposo, y de tejidos fetales/perinatales, que incluyen células obtenidas del propio embrión/feto y células obtenidas de tejidos extraembrionarios también conocidos como tejidos asociados al nacimiento, como la placenta, las células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (CME-GW) y la membrana amniótica. Las CME-GW comparten muchas características con las CME adultas, como las derivadas de médula ósea. Sin embargo, conservan varias características de las células madre embrionarias, adicionalmente no forman teratomas [173] y su investigación no plantea ningún problema ético o legal relacionado con sus aplicaciones en medicina regenerativa. Durante su vida, las CME-GW, evaden los factores que propician el envejecimiento. Además, las CME-GW poseen un estado inmunológico privilegiado que las convierte en una opción favorable para aplicaciones médicas regenerativas (9).

Las CME-GW son excelentes candidatas para aplicaciones terapéuticas y estudios de troncalidad debido a sus características primitivas, ya que exhiben varias características de las células embrionarias, como el antígeno similar a células madre embrionarias Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1 y SSEA-4 y numerosos genes de pluripotencia como: Oct-4, NANOG y SOX-2 [174]. Estudios comparativos de perfiles de expresión génica entre las CME-GW y de médula ósea, demostraron que las de GW expresan niveles más altos de NANOG, DNMT3B y GABRB3 y una mayor expresión de Brix, CD9, Gal, Kit, Rex1 y TERT como marcadores de pluripotencia/células madre [175]. Se cree que este perfil de expresión refleja la naturaleza más primitiva de las CME-GW, en comparación con sus contrapartes adultas en la médula ósea y ponen de manifiesto su potencial importancia para el modelamiento de enfermedades en las que se estudie el desarrollo de cultivos celulares desde precursores con características pluripotentes.

3.1.3.2. Sangre menstrual

El endometrio humano es el revestimiento mucoso del útero y consta de epitelio luminal, epitelio glandular y un estroma extensamente vascularizado. Estructural y fuuncionalmente el endometrio se divide en capa superficial y profunda. La capa superficial conocida como región funcional consiste en los dos tercios superiores de las glándulas revestidos con epitelio cilíndrico pseudoestratificado rodeado por estroma vascularizado laxo; mientras que la capa

profunda o región basal consiste en el tercio inferior de glándulas, estroma denso y grandes vasos. Durante el ciclo menstrual de cada mes, la región funcional se elimina durante la menstruación y se regenera mientras permanece la basal la cual posee fuertes capacidades de proliferación y reparación sin caerse durante el período menstrual pero genera nuevas capas funcionales. Este nivel de crecimiento de tejido nuevo es similar al recambio celular en el tejido hematopoyético de la médula ósea altamente regenerativo, la epidermis y el epitelio intestinal [176]. La regeneración endometrial periódica implica la presencia de células madre/progenitoras en el endometrio (**Figura 11**). Estudios en tejido de biopsia endometrial han revelado la presencia de pequeñas poblaciones de células madre/estromales endometriales adultas con propiedades clásicas de células madre como lo son la clonogenicidad, autorrenovación y diferenciación [177]. Las células madre/progenitoras específicas que incluyen células madre/progenitoras epiteliales, células madre/estromales mesenquimales endometriales y células progenitoras endoteliales, se han clasificado de acuerdo con la expresión de marcadores de superficie específicos en las diferentes poblaciones celulares en cultivo y por su potencial de diferenciación.

En 2007 se identificó una nueva fuente de células madre mesenquimales a partir de la sangre menstrual y se les denominó células madre derivadas de la menstruación (de la sigla en inglés menstrual blood-derived stem cells, MenSC) [178]. Desde entonces, se ha mostrado un mayor interés por las MenSC debido a su abundancia, por ser una fuente continua, por tener una recolección no invasiva a través de copas menstruales, baja inmunogenicidad, alta proliferación, capacidad de diferenciación y sin dificultades mayores éticas. Los usos investigativos de las MenSC incluyen diferenciación en células diana, inmunomodulación, secreción de citoquinas paracrinas, migración e injerto en sitios lesionados. Las MenSC puede diferenciarse en varios linajes, incluidos los linajes endotelial, osteogénico, condrogénico, adipocítico, pancreático, hepático, epitelial respiratorio, cardiomiocítico y neuronal. Así mismo, las MenSC han mostrado poseer un gran potencial terapéutico en diversos trastornos no ginecológicos, incluidos los neurológicos [179].

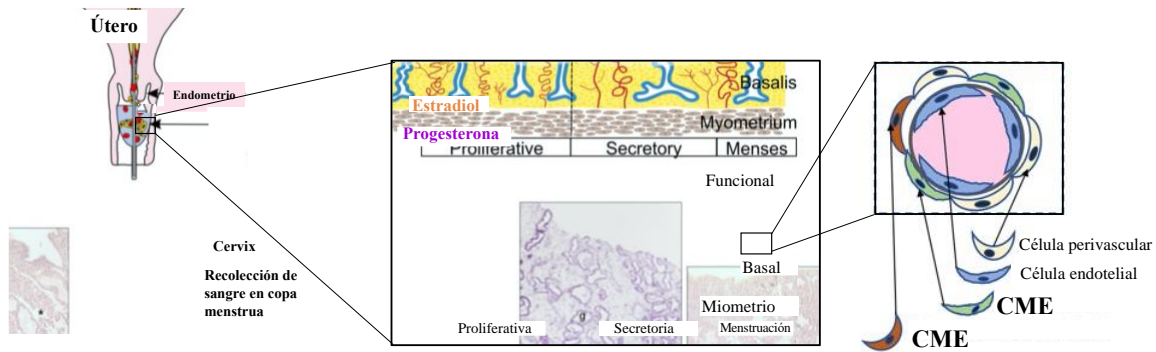


Figura 11: Localización de las células mesenquimales estromales de flujo menstrual. Estructura del endometrio y localización de las poblaciones celulares. Imagen adaptada de las refs. [180,181]

Se ha demostrado que las MenSC expresan no solo los marcadores de la superficie celular observados tradicionalmente en las CME, sino que adicionalmente expresan marcadores asociados con las células madre embrionarias como SSEA-4 y Oct-4. Igualmente, las células estromales menstruales han demostrado tener una actividad telomerasa del 50% en comparación con las células madre embrionarias humanas, lo que es significativamente mayor en comparación con otras células embrionarias como, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de ratón. Otras características incluyen la estabilidad cromosomal demostrada mediante el análisis del cariotipo [160] y la presencia en cantidades variables del receptor de factores de células madre, cKit (CD117) [180].

3.1.4. Potencial multipotente y de transdiferenciación de las CME

Las CME tienen la capacidad de diferenciarse en los tres linajes, ectodermo, mesodermo y endodermo, dependiendo de las condiciones de cultivo de diferenciación. La diferenciación *in vitro* de las CME al **linaje mesodérmico**: en adipocitos, osteocitos y condrocitos ha sido confirmada por la producción de vacuolas lipídicas, la formación de matrices mineralizadas y la expresión del colágeno de tipo II, respectivamente [182]. Para la diferenciación de las CME al linaje adipogénico, las CME se deben cultivar en condiciones específicas en presencia de dexametasona, indometacina, insulina e isobutil-metil-xantina durante 3 semanas que se confirman identificando la acumulación de vacuolas lipídicas intracelulares [183]. El método clásico para diferenciar las CME en osteoblastos consiste en cultivar las CME en presencia del ácido ascórbico, β -glycerol-fosfato y dexametasona y en medio de

crecimiento condicionado durante 3 semanas. Estas condiciones promueven la agregación mineral y la actividad de la fosfatasa alcalina [147]. Las células diferenciadas a osteoblastos son positivas para las tinciones de rojo de alizarina y Von Kossa. Al igual que la adipogénesis y la osteogénesis, las CME tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos maduros. De acuerdo con el protocolo estándar para la condrogénesis, las células deben ser cultivadas en medio DMEM suplementado con hormonas, glucocorticoides, ácidos grasos y factores de crecimiento [184]. Adicionalmente, las CME tienen la capacidad de transdiferenciación al linaje endodérmico: en presencia de medios suplementados. En este sentido, las CME pueden trans-diferenciarse en hepatocitos empleando los protocolos de diferenciación y de maduración. En el protocolo de diferenciación, las CME que se quieren trans-diferenciar a hepatocitos se cultivan en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con EGF (Factor de Crecimiento Epidermal), bFGF (Factor de Crecimiento Fibroblástico básico) y nicotinamida durante una semana. Posteriormente, se realiza el protocolo de maduración, las CME se cultivan con IMDM suplementado con oncostatina M, dexametasona e insulina-transferrina-selenio, dando lugar a la formación de hepatocitos maduros [185,186]. Las células de hepatocitos diferenciados expresan marcadores de transcripción específicos del hígado, es decir, albúmina, α -fetoproteína, el factor nuclear 4 α (de la sigla en inglés, Hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF-4 α). Sumado a la diferenciación hepática, se ha reportado que las CME se han diferenciado con éxito en células β productoras de insulina [187]. De igual forma, se ha demostrado la capacidad de las CME de transdiferenciarse a linaje ectodérmico (v. gr., neuronal) en presencia de medios de inducción neural suplementados con un cóctel de factores de crecimiento. Varios de estos factores como el factor de crecimiento de hepatocitos (de la sigla en inglés, completar HGF), (de la sigla en inglés, completar bFGF) y (de la sigla en inglés, completar EGF) se han utilizado en cocteles de inducción neuronal para obtener con éxito fenotipos neuronales específicos como oligodendrocitos y neuronas colinérgicas [188,189].

3.1.5. Transdiferenciación neuronal colinérgica a partir de las CME

La transdiferenciación celular es la capacidad de una célula madre adulta, para diferenciarse en una célula de un linaje diferente a la de su origen. De hecho, estudios *in vitro* han logrado la diferenciación exitosa en células tipo neuronal y en células precursoras neuronales (CPN)

[190]. Por lo tanto, las CME constituyen una fuente atractiva de células para la regeneración de tejidos lesionados en el ámbito clínico, gracias a sus características de inmadurez, su potencial de autorrenovación, su alta capacidad proliferativa y su capacidad de diferenciación y transdiferenciación [191]. Así mismo, las CME han sido utilizadas en trasplantes neuronales en modelos pre-clínicos murinos. [192-195].

En este contexto, se ha descrito que el bFGF2 es un factor importante para inducir la diferenciación de las CME hacia un linaje ectodérmico [196]. Este factor trabaja en colaboración con la heparina, que modula la interacción del FGF con su receptor estabilizando dicha unión. Esta unión desencadena las vías de señalización de la transdiferenciación neuronal colinérgica [197]. También se ha demostrado, que la heparina promueve la diferenciación de las células madre en ectodermo y neuroepitelio [198]. Por otra parte, el AR es otro metabolito activo bien conocido de la vitamina A, que se une a sus receptores nucleares, y potencializa la diferenciación neuronal [199]. De hecho, el AR actúa a través del receptor de membrana nuclear STRA6 e ingresa al núcleo unido a la proteína celular de unión a la AR 2 (CRABP2). Una vez en el núcleo, el AR se une su receptor del AR (RAR) y al receptor X retinoico (RXR). Esta interacción del AR con ambos tipos de receptores le permiten al AR ligado la unión al elemento de respuesta del AR (RARE), lo que induce la transcripción de los genes diana de diferenciación neuronal [200]. Interesantemente, se ha demostrado que el cultivo de CME obtenidas de la médula ósea humana en presencia del AR provocó una regulación positiva del marcador neural β -tubulina III después de 2-7 días, mientras que los marcadores neurales maduros (por ejemplo, el neurofilamento) se expresaron después de 14 días [201].

Interesantemente, Mendivil-Perez y colaboradores en los últimos años lograron estandarizar un nuevo e innovador protocolo de trans-diferenciación en un solo paso de CME a neuronas colinérgicas en un periodo de 4 días inferiores al rango reportado en la literatura científica de 2 o más pasos y por un período de 4-35 días por otros investigadores (220). Este protocolo permitió la caracterización de neuronas por medio de la identificación y cuantificación de los niveles de la expresión de los factores de transcripción de pluripotencialidad SOX2 y proliferación Ki-67 al día 0 previo a la inducción de diferenciación, y de marcadores de linaje colinérgicos específicos como la ChAT, el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT)

y la acetilcolinesterasa (AChE). De igual forma se logró, identificar y cuantificar niveles elevados de marcadores de superficie neuronales específicos como NeuN, TUC-4, NF-L, β -Tubulina III y MAP2 y la respuesta positiva al estímulo modulador de niveles intracelulares de Ca²⁺ inducido por la acetilcolina.[202]. Dada la factibilidad de aceptación del aval de los comités de ética, la fácil obtención de las CME, sus propiedades celulares; como su alta y eficiente capacidad de-transdiferenciación del 80 % de neuronas colinérgicas en corto tiempo, y una baja respuesta inmune que facilita la terapia celular, (220). Estas células pueden ser consideradas como un excelente modelo y herramienta de estudio para modelar y recrear la neuropatología de la EAF PSEN1 E280A. La tabla 2 describe un resumen de diferentes protocolos de transdiferenciación de CME en NC obtenidas de varias fuentes.

Publicación	Especie/Fuente	Pasos	Tiempo	Fenotipo
Qi et al 2010 [203]	Mono Rhesus/ Médula ósea	1	Hasta 14 días	Nestina: ~73%; NSE: ~97%; Sinapsina: ~98%; neurotransmisor AChE: ~98%; GFAP: ~1%
Liu et al 2013 [204]	Humano/ Cordón Umbilical	1	15 días	MAP2: ~54%; Hb9: ~35%; ChAT: ~43%; GFAP ~3%
Liang et al 2013 [205]	Humano/ Cordón Umbilical	3	20 días	NF: ~29%; ChAT: ~26%
Borkowska et al 2015 [206]	Ratas Wistar/ Médula ósea	3	35 días	Gad67: ~ 17%; Acht (ChAT): ~7%
Thangnipon et al 2016 [207]	Humano/ Líquido amniótico	2	4 días	β -Tub-III +; ChAT+
Marei et al 2018 [208]	Humano/ Tejido adiposo	1	15 días	TUBB+; MAP2+; ChAT+; TH+

Mendivil-Perez et al 2019 [202]	Humano/ Cordón Umbilical	1	4-7 días	MAP2: +; β -Tub-III+; GFAP-; TH-; GAD67-; VaCHT+:~80% ChAT+: ~80%; AChE +; Respuesta de Ca⁺⁺ al estímulo con acetilcolina+
--	--------------------------------	---	----------	--

Tabla 2. Protocolos de transdiferenciación colinérgica de CME obtenidas de varias fuentes. MAP2: Proteína 2 asociada a los microtúbulos; Hb9: Homebox 9; ChAT: Colina acetiltransferasa; GFAP: Proteína ácida fibrilar glial; AChE: Acetilcolinesterasa; NSE: Enolasa específica neuronal; NF: Neurofilamento; GAD67: Glutamato descarboxilasa 67; TUBB: Beta tubulina; β -Tub-III: Beta tubulina III; VaCHT: Transportador vesicular de acetilcolina.

3.2. MODELOS 2D PARA EL ESTUDIO DE PATOLOGÍAS CEREBRALES

Durante las dos últimas décadas se han establecido diversos protocolos para la obtención de varias poblaciones neuronales y su mantenimiento en cultivos *in vitro* [209-211]. Las neuronas primarias de regiones específicas del cerebro pueden ser el modelo celular ideal (por ejemplo, neuronas del hipocampo para la EA), pero son menos abundantes y no siempre son fáciles de aislar ni de cultivar. Las variaciones en las preparaciones y la siembra de los cultivos neuronales primarios, como la edad y el sexo de los animales, la densidad de siembra, los días *in vitro*, la composición del medio y la disponibilidad del sustrato, pueden alterar la fisiología neuronal, la función mitocondrial y la viabilidad, y contribuir a la heterogeneidad en resultados experimentales [212-214]. Las neuronas también pueden diferenciarse a partir de células proliferativas, como las células progenitoras neurales de la zona subventricular (ZSV) de ratones adultos [215]. En el cerebro postnatal de los mamíferos, las células madre neurales (CMN) residen en un compartimento único después del desarrollo embrionario y generan nuevas células durante toda la vida del animal. En condiciones normales, la

neurogénesis postnatal se produce sólo en dos regiones neurogénicas principales, la ZSV del ventrículo lateral y de la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo [216]. La ZSV se compone de una capa delgada de células en división que se extiende a lo largo de las paredes laterales del ventrículo lateral. Basados en las características ultraestructurales y la duración del ciclo celular, en esta zona se han identificado cuatro tipos de células: astrocitos (células tipo B), células de amplificación transitorias (células tipo C), neuroblastos migratorios (células tipo A), y las células endoteliales [217]. Estas células se encuentran en distintas etapas de diferenciación y se ha establecido una progresión de linaje, siendo las células de tipo B los precursores primarios (células madre neuronales *bona fide*) que generan progenitores altamente proliferativos.

Los primeros experimentos *in vitro* encontraron que el tejido obtenido de la ZSV contenía una subpoblación de células precursoras multipotentes, que bajo condiciones que involucraban el uso de factores de crecimiento fueron capaces de producir clones y auto-renovarse [218]. Estos clones proliferaron y dieron lugar a agregados de células esféricas conocidas como “neuroesferas”. En la actualidad, el ensayo de neuroesferas es el criterio más comúnmente aceptado para la demostración de la obtención de CMN *in vitro*. Las CMN obtenidas de la ZSV proliferan en presencia del factor EGF y forman neuroesferas de 50 a 150 μm de diámetro que proliferan en condiciones de indiferenciación [219]. La cantidad de neuroesferas puede ser ampliada, o diferenciada tanto *in vitro* como *in vivo* en células neuronales y gliales. Estos resultados demuestran que las CMN poseen la capacidad de la auto-renovación, multipotencialidad y pluripotencia. A pesar de que las CMN poseen un amplio potencial para el estudio de la EA, uno de los inconvenientes que debe ser superado con miras a su uso definitivo, es garantizar la generación de los tipos de neuronas específicas o de células gliales *in vivo* por lo tanto se debe seguir investigando los mecanismos que permitan asegurar la diferenciación completa en un tipo celular en particular y detener el estado altamente proliferativo [215].

Actualmente, se acepta ampliamente que las poblaciones agrupadas de microglia reactivas son características de la EA, y es probable que estas células cerebrales contribuyan a los mecanismos de daño neuronal y pérdida cognitiva [220]. De hecho, La microglía es conocida

como los macrofagos residentes y las células inmunes innatas del cerebro. En las últimas décadas, ha habido un mayor interés en la microglía, ya que muchos investigadores han reconocido la importancia de esta célula en la homeostasis, así como en varias patologías, del sistema nervioso central como la EA [220]. Por lo tanto, los cultivos *in vitro* de microglía presentan una herramienta útil para estudiar el estado de activación, los factores liberados, la motilidad y otros componentes cruciales que caracterizan a este tipo celular, que no pueden examinarse directamente *in vivo* [221]. En este sentido, estudios *in vitro* de microglía expuestos a oligómeros de β A mostraron su activación y neurotoxicidad [222].

Aunque este modelo celular de cultivos primarios, puede ser útil para medir proteínas y marcadores celulares; sin embargo, las cantidades excesivas de preparaciones para cada experimento hacen que este modelo consuma más tiempo y sea menos atractivo en comparación con otros modelos que tienen un tiempo de preparación más corto, y que mantienen las propiedades celulares por un número alto de pasajes. Además, las poblaciones no son completamente homogéneas para la microglía porque se pueden tener cultivos mixtos de astrocitos u oligodendrocitos en el cultivo.

Las líneas celulares derivadas de cerebro humano, como el SH-SY5Y o de roedores como PC12, N2a y HT22, pueden diferenciarse a un estado neuronal postmitótico [223,224], pero no muestran un fenotipo neuronal verdadero (por ejemplo, carecen de receptores funcionales NMDA incluso después de la diferenciación), y sus propiedades bioenergéticas y neurotóxicas difieren de las neuronas primarias [223]. Si bien su facilidad de cultivo y transfección los convierte en una herramienta variable entre la conveniencia y relevancia científica, los hallazgos en estos modelos celulares deben complementarse con experimentos en cultivos primarios o modelos *in vivo*. Adicionalmente se han creado otras poblaciones celulares involucradas en la EA como la microglia, la creación de estas líneas celulares inmortalizadas ha mostrado ser un modelo de alto rendimiento para la experimentación, además de ser completamente homogéneas en todo el cultivo. Sin embargo, este tipo de células gliales inmortalizadas presentan una respuesta inflamatoria que no es idéntica a los cultivos primarios, sumado a esto, las células inmortalizadas están sujetas a cambios

morfológicos y genéticos que afectan la fiabilidad de los resultados derivados de estos estudios [221].

En 2006, el grupo de Yamanaka de la Universidad de Kyoto publicaron un descubrimiento histórico muy importante que les daría el premio nobel de fisiología y medicina en el 2012, ya que con la expresión de solo cuatro factores de transcripción asociados a la pluripotencia, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (OKSM), en células de fibroblastos de ratón indujeron la reprogramación de células diferenciadas a células inmaduras generando células similares a las embrionarias (de su sigla en inglés Embryonic Stem Cells: ESC), a las que se les denominó células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Estas células son similares a las ESC en su morfología, expresión génica, proliferación y formación de teratoma [225]. Actualmente, la iPSC se utilizan ampliamente para diversas aplicaciones, como la terapia celular autóloga, el modelado de enfermedades monogénicas y multigénicas, y como sustratos o modelos de plataformas para evaluar toxicidad, diferenciación y tamizaje de fármacos en el diseño de terapias. La reprogramación depende de la incorporación eficiente y la expresión adecuada de los factores de pluripotencialidad en tipos celulares diferenciados (v.gr. fibroblastos, linfocitos, queratinocitos primarios humanos, las células CD133⁺ de sangre de cordón umbilical y las células mononucleares de sangre periférica [226], bajo condiciones de cultivo particulares y dentro de un período de tiempo. Aunque la reprogramación directa es una técnica sencilla, es un proceso lento que depende del tipo de célula, la especie y el método empleado de transfección. Todos estos factores pueden dificultar la eficiencia, la reproducibilidad y la calidad de las iPSC resultantes. Hasta la fecha, las células somáticas donantes más populares son los fibroblastos, que se han utilizado en más del 80% de todos los experimentos de reprogramación publicados.

Para el modelamiento de la EA, las iPSC se han diferenciado terminalmente en neuronas (β -tubulina⁺, MAP2⁺, ChAT⁺) y astrocitos (GFAP⁺) [227,228]. En este contexto, Yagi y colaboradores establecieron la primera prueba de principio del modelado basado en iPSC, generando iPSC de pacientes con EA portadores mutaciones PSEN1 (A264E) y PSEN2 (N141I). En este trabajo, los sobrenadantes neuronales mostraron índices elevados de la

relación extracelular de β A42/ β A40 en comparación con los controles. Por el contrario, el tratamiento de un inhibidor de la γ -secretasa redujo significativamente los niveles de β A y la proporción de β A42/ β A40 [227]. Sin embargo, Sproul y colaboradores desarrollaron líneas adicionales de iPSC a partir de pacientes con mutaciones en PSEN1 (A264E y M146L) en las que encontraron niveles similares de la proporción de β A42/ β A40 en células progenitoras neurales derivadas de iPSCs de pacientes, comparadas con las de controles [229]. La taupatía, también se ha explorado en las iPSC de pacientes con EA esporádica en las que se ha mostrado una acumulación anormal de Tau fosforilada (fosfo-Tau) y activación de la quinasa de Tau GSK-3 β (aGSK-3 β) [228]. Así mismo, Duan y cols. han optimizado un protocolo de diferenciación neural de iPSC, enriquecido para neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (BFCNs). Las BFCNs juegan un papel importante en la memoria, y una pérdida sustancial de estas neuronas ha sido reportada desde el principio en pacientes con EA [230]. En este trabajo, las BFCNs derivadas de iPSCs provenientes de pacientes con EA esporádica mostraron altos índices β A42/ β A40, así como vulnerabilidad a la muerte celular mediada por glutamato [231]. Kondo y cols., generaron iPSCs a partir de dos pacientes con EAF portando mutaciones específicas en el gen de la PPA (E693 Δ , V717L) y a partir de dos pacientes con EA esporádica. En este trabajo se detectó la acumulación intracelular de oligómeros de β A y se detectaron EROs en las neuronas y astrocitos de pacientes [232]. En otros trabajos, Armijo y cols. encontraron que las neuronas derivadas de pacientes con EAF tienen una mayor susceptibilidad a los oligómeros de β A42 en comparación con las neuronas provenientes de individuos sanos y con EA esporádica. Sus hallazgos sugieren que las neuronas de personas con mutación PSEN1-A246E tienen propiedades intrínsecas que las hacen más susceptibles a los efectos tóxicos de los oligómeros del β A [233]. Recientemente, Mendivil-Perez y cols. describieron por primera vez la obtención y caracterización de iPSC provenientes de un paciente masculino con la mutación “Paisa” PSEN1-E280A. Este trabajo mostró que los precursores neuronales obtenidos a partir de estos pacientes presentan una incapacidad para convertirse en neuronas maduras iniciando un proceso de muerte masiva durante el proceso de diferenciación, evidenciada por la activación de la caspasa 3, y la acumulación de β A42 en sobrenadantes. Interesantemente, en este caso clínico, el fenómeno

de susceptibilidad de las neuronas precursoras a sufrir muerte estuvo asociado a la pérdida del cromosoma Y en las neuronas del paciente [234].

A pesar de que las iPSCs constituyen una tecnología novedosa y han demostrado ser de gran utilidad para el modelamiento de la EA por su capacidad de proliferación, de recapitulación de marcadores patológicos y de diferenciación a los diferentes linajes celulares; existen dificultades asociadas con el mantenimiento en el tiempo de los cultivos de iPSCs pluripotentes y de su progenie en estado diferenciado. El cultivo de iPSCs puede consumir mucho tiempo (más de 3 meses) y ser costoso, además, es difícil mantener las células en un estado pluripotente, por lo que pequeños cambios en las condiciones de cultivo como por ejemplo, factores de crecimiento, pueden conducir a la diferenciación espontánea o incluso a la reducción de la proliferación [235]. Así mismo, los protocolos para la diferenciación de iPSCs en neuronas plantean dificultades adicionales, como el proceso de diferenciación a neuronas es particularmente lenta y a menudo implica múltiples pasos, con requerimientos especiales de citoquinas las cuales son proteínas recombinantes costosas y que pueden constituir fuentes de variabilidad y de heterogeneidad celular con diferentes tipos de neuronas y de células gliales, lo cual dificultaría su uso como modelo de diseño terapéutico [235]. Otra consideración con respecto a los protocolos actuales de diferenciación neuronal, a partir de las iPSCs es que suelen tardar entre 50 y 100 días antes de que se utilicen para su diferenciación en neuronas adultas [236,237].

3.3. ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES (3D) PARA EL MODELAMIENTO DE PATOLOGÍAS CEREBRALES

3.3.1. Historia y antecedentes

Con el fin de reproducir completamente el microambiente celular *in vivo* y dado que las células que se cultivan en monocapa en superficies planas y no permite recrear el entorno natural tridimensional (3D) de las células. Históricamente los esfuerzos científicos se encaminaron en el desarrollo de plataformas celulares con enfoques novedosos que permitieran recrear un entorno fisiológicamente más relevante en forma de cultivo celular tridimensional [238] (**Figura 12**). Los métodos actuales para el desarrollo de cultivos 3D son el producto de la técnica de cultivo de tejido de gota colgante, iniciada y desarrollada por

Ross Harrison en el año 1906, quien tomó un fragmento de cordón nervioso embrionario y lo colocó sobre una gota de linfa en un cubreobjetos, que fue invertido y sellado sobre un portaobjetos hueco [239]. Esta metodología empleada por Harrison proporcionó un ambiente adecuado para que las fibras nerviosas crecieran en el medio. Otros investigadores adaptaron este sistema a cultivos de tejidos de diversas regiones de embriones de pollo y en diferentes períodos prolongados de tiempo [240]. Ya en 1907, Wilson [241] demostró que las esponjas podían descomponerse en células individuales que podían re-asociarse en estructuras similares a los tejidos. Igualmente sucedió con los celenterados en 1914 [242] y las investigaciones de embriología, especialmente en la morfogénesis de las extremidades, lo que condujo al desarrollo de cultivos en tubo en 1926 que consistían en una superficie de vidrio cóncava que sostenía un coágulo de plasma en el centro sobre el cual se embebía y cultivaba el fragmento de tejido o rudimento del órgano y los cultivos de las células embrionarias de anfibios en 1948 [243].

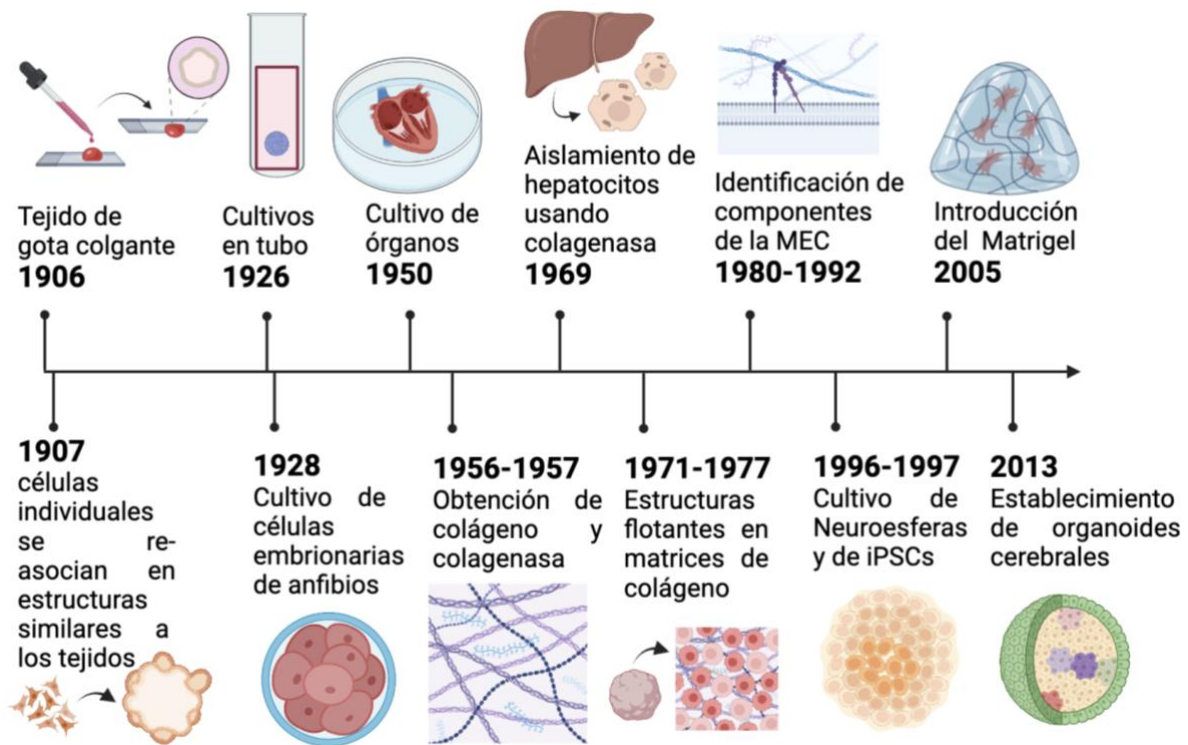


Figura 12: Línea de tiempo de los descubrimientos y establecimientos de protocolos relacionados con el diseño de cultivos 3D.

Posteriormente, durante la década de los 1950s, muchos órganos se habían cultivado *in vitro*, pero con las limitaciones impuestas por estos métodos de cultivo. La mayoría de los investigadores trabajaron para evitar la migración de células de la muestra de tejido, trataron de optimizar las condiciones de intercambio de gases y reducir la necrosis. En este mismo período de tiempo, los investigadores comenzaron a analizar la capacidad regenerativa de las células disociadas. Sumado a ello, en 1956 que Robert Ehrmann y George Gey, publicaron un método para reconstituir el colágeno extraído de los tendones de la cola de rata como un gel transparente, para confirmar la funcionalidad del colágeno, cultivaron las fibroblastos de origen animal y humano en presencia de este gel transparente y observaron que crecían y tenían una viabilidad mayor que en plasma [244]. Por esa misma época, Mandl *et al* aislaron colagenasa de *Clostridium histolyticum* [245], y un año después en 1957, Lasfargues y colaboradores establecieron un método utilizando colagenasa para disociar el tejido de la glándula mamaria del ratón adulto, generando esferoides mamarios (fragmentos de conductos) desprovistos de fibroblastos y adipocitos[246]. Esta observación condujo al establecimiento de un método para producir millones de hepatocitos viables por Berry y Friend en 1969 al perfundir hígados con esta misma colagenasa [247]. Dos años después, en 1971 Bissell y Tilles demostraron que los hepatocitos embrionarios y adultos crecían mejor en presencia del colágeno, sin embargo después de uno o más días en cultivo las células empezaban a perder sus funciones de diferenciación [248].

Cuatro años más tarde, Michalopoulos y Pitot determinaron [249] que era posible inducir la diferenciación de células epiteliales específicas del parénquima hepático modificando el comportamiento del sustrato al que estaban unidos. Estos investigadores observaron que cuando las células ejercían presión sobre los geles de colágeno, los geles se separaban y flotaban en la parte superior del medio. y esta flotación creaba un ambiente más permisivo para la diferenciación, aunque el mecanismo por medio del cual ocurría este evento no fue descrito, lograron evidenciar que las células hepáticas adultas expresaron marcadores de diferenciación específicos del tejido. Emerman y Pitelka en 1977 realizaron el mismo experimento con células epiteliales mamarias normales disociadas derivadas de ratones gestantes en presencia de hormonas lactogénicas y demostraron que cuando los geles flotaban, las células mantenían cierta expresión de proteínas de la leche durante un mes en

cultivo, un fenómeno que no se observó en las células cultivadas en plástico o vidrio [250]. Mientras tanto, en New Jersey, Richard Swarm y su grupo estaban trabajando en la caracterización de explantes primarios en geles de matriz extracelular (MEC) de los condrosarcomas, desentrañando las interacciones entre el colágeno, el ácido hialurónico y las proteínas asociadas. Durante su investigación, aislaron un gel con características de la membrana basal y lo llamaron sarcoma EHS usando las iniciales de los tres investigadores que lo descubrieron: Engelbreth, Holm y Swarm [251]. Este fue el descubrimiento de lo que hoy se conoce como *Matrigel* descrito por Kleinman y Martin [252].

Estudios posteriores se focalizaron en el análisis de los componentes de la matriz extracelular (MEC), clave en la formación y mantenimiento de las estructuras 3D. En este sentido, Orkin y colaboradores determinaron que el colágeno IV, era un componente principal de la matriz y se podía aislar de un tumor de roedor [251]. Así mismo, un año después, se identificó la fibronectina como un componente principal de la membrana basal [253]. Dos años después, en 1979 se caracterizó la glicoproteína laminina, aislada de la matriz del sarcoma de EHS [254] y se determinó que era un componente de las membranas basales en los tejidos normales empleando anticuerpos anti-laminina. Entre 1980 y 2016 se trabajó en la comprensión de los mecanismos de la morfogénesis y se preparó el escenario para la nueva era en el desarrollo de cultivos 3D. De hecho, en 1980, los investigadores ya tenían las herramientas moleculares y los conceptos para comenzar a desentrañar los misterios que rigen la función y la morfogénesis específicas de los tejidos. En 1981, Bissell y colaboradores demostraron que la MEC regulaba la expresión génica [255]. Este concepto de que ciertos componentes de la matriz regulaban la morfogénesis y la diferenciación celular condujeron a la pregunta ¿Cuál era el mecanismo exacto de esa regulación? En 1992, se sugirió que los componentes de la MEC estaban interactuando con los elementos de respuesta en el núcleo [256]. La primera evidencia de que la MEC, a través de la interacción directa con las integrinas, estaba regulando la expresión y diferenciación génica se produjo en 1991 cuando Streuli *et al.* [257] introdujeron células mamarias individuales dentro de una MEC rica en laminina y mostraron que estas células podían sintetizar β -caseína cuando la laminina estaba presente. Estos hallazgos dieron paso a la identificación de la importancia de la MEC en la generación y regulación del crecimiento y morfogénesis de estructuras celulares tridimensionales.

A medida que se avanzaba en el campo del desarrollo de los cultivos 3D tipo organoide con el descubrimiento de los componentes de la MEC, simultáneamente se ampliaba el conocimiento de la biología molecular de las células madre. En este contexto, en 1981, Evans y Kaufman establecieron cultivos de células madre pluripotentes derivadas de cultivos *in vitro* de blastocitos de ratón [258]. En 1996, los primeros cultivos de neuroesferas (cultivos flotantes de precursores neuronales) se caracterizaron a partir de embriones de ratón [259]. En 1998 Thomson y colaboradores establecieron líneas celulares pluripotentes derivadas de blastocisto humano [260]. Posteriormente, células madre embrionarias de ratones y humanos se utilizaron para generar organoides de tejidos cerebrales corticales polarizados en platos de cultivo [261]. Las células madre pluripotentes inducidas, un avance que tuvo lugar en 2007, han proporcionado una herramienta adicional para estudiar la morfogénesis [262]. Para el año 2013, Lancaster y colaboradores establecieron un método de cultivo que permitió la generación de organoides cerebrales a partir de células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos de piel de un paciente con microcefalia [263]. En una revisión reciente, Kelava y Lancaster describieron la importancia de la MEC y el microambiente en los avances recientes en cultivos de organoides/esferoides de tejidos cerebrales [264], demostrando la relevancia que el siglo pasado ha tenido en los avances actuales en los cultivos 3D y su aplicación en estudios en procesos fisiológicos y patológicos del cerebro.

3.3.2. Diferencias entre los cultivos celulares 2D y 3D

El cultivo celular bidimensional (2D) ha representado durante mucho tiempo el principal método de investigación *in vitro* y gracias a él se han desarrollado varios avances diagnósticos, farmacéuticos y toxicológicos. Sin embargo, este modelo presenta algunas limitaciones que pueden superarse con el enfoque de cultivo celular de nueva generación [265,266]. En el cultivo 2D tradicional generalmente las células crecen en una monocapa sobre vidrio o, más comúnmente, frascos de plástico de poliestireno para cultivo de tejidos drogas (**Figura 13A**), los cultivos celulares en 3D las células crecen en agregados, esferoides 3D usando un andamio y matriz o sin andamios drogas (**Figura 13B**). En el cultivo tradicional en monocapa 2D, las células se adhieren y crecen en una superficie plana. Tal configuración de monocapa permite que todas las células reciban una cantidad homogénea de nutrientes y

factores de crecimiento del medio durante el crecimiento [267]. La monocapa se compone principalmente de células proliferantes, ya que las células necróticas generalmente se desprenden de las superficies y se eliminan fácilmente durante el cambio de medio. Las células cultivadas en cultivo 2D suelen ser más planas y estiradas de lo que parecerían *in vivo*. La morfología celular anormal en el cultivo 2D influye en muchos procesos celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la expresión de genes y proteínas (273). Como resultado, las células cultivadas en 2D pueden no comportarse como lo harían en el cuerpo porque este modelo tiene como limitante que no recrea adecuadamente el microambiente natural *in vivo* [268]. Se han investigado tecnologías, como el nanopatrón, que imita las características topográficas de la MEC, para mejorar la función y el comportamiento celular en los cultivos celulares 2D [269]. Sin embargo, todavía no es claro y está bajo investigación, si estos cambios metodológicos mejoran la función celular del modelo 2D de emular mejor los comportamientos *in vivo*. A pesar de las limitaciones anteriormente descritas, el cultivo celular 2D tradicional sigue siendo la plataforma de prueba *in vitro* más común en la detección de drogas.

A diferencia del cultivo de monocapa 2D, los sistemas de cultivo 3D, las células forman agregados o esferoides sobre una matriz, dentro de una matriz o en un medio en suspensión. En estos agregados celulares, las interacciones célula-célula y las interacciones célula-MEC imitan más estrechamente el entorno natural que se encuentra *in vivo*, de modo que la morfología celular se asemeja mucho a su forma natural en el cuerpo. Además, los cultivos 3D se componen de células en diversas etapas, que generalmente incluyen células proliferativas, inactivas, apoptóticas, hipóxicas y necróticas. Las capas externas de un esferoide, que está altamente expuesto al medio, se componen principalmente de células viables y células en proliferación. Las células centrales reciben menos oxígeno, factores de crecimiento y nutrientes del medio, y tienden a estar en un estado inactivo o hipóxico (**Figura 13C**). Dicha heterogeneidad celular es muy similar a los tejidos *in vivo* [270,271]. Dado que la morfología y las interacciones de las células cultivadas en cultivos 3D es más similar a lo que ocurre *in vivo*, los procesos celulares de estas células también imitan de forma más cercana a lo que está ocurriendo *in vivo*.

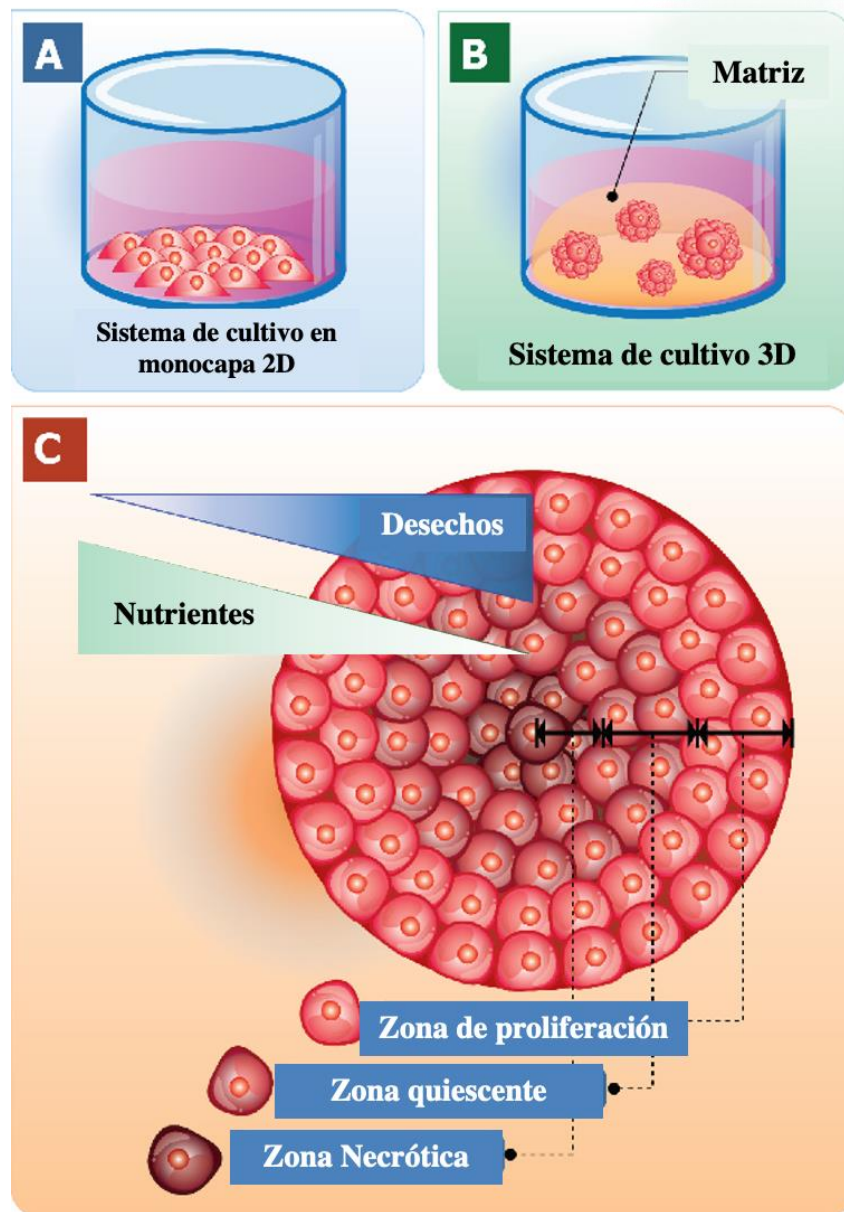


Figura 13: Esquemática del cultivo celular en monocapa bidimensional tradicional (2D) y de los sistemas de cultivo celular tridimensional (3D). (A) Representación gráfica de un cultivo celular monocapa bidimensional tradicional; (B) Representación gráfica sistemas de cultivo celular tridimensional; (C) Estructura de un cultivo tridimensional (esferoide) con diferentes zonas de células indicando áreas de oxigenación, nutrición y eliminación de CO₂. Esferoide tridimensional en donde se describe desde el interior hacia la parte externa, observándose: una zona necrótica (más interna), zona celular viable quiescente (media) y la zona de proliferación (más externa). Adaptada de [272].

3.3.3. Esferoide cerebral versus Organoide cerebral

3.3.3.1. Definición

Los avances recientes en biología celular, técnicas de microfabricación e ingeniería de tejidos han permitido el desarrollo de una amplia gama de tecnologías de cultivo celular en 3D. Estas estructuras de cultivos 3D, se han utilizado para reproducir las características morfológicas, funcionales y el microambiente de tejidos y órganos humanos. Se han generado dos tipos principales de estructuras 3D. Los *esferoides* son grupos simples de células de amplio espectro, como las de tejido tumoral, cuerpos embrioides, hepatocitos, tejido nervioso o glándulas mamarias. No requieren un andamiaje para formar cultivos 3D; lo hacen simplemente pegándose unos a otros. Sin embargo, no pueden autoensamblarse ni regenerarse [273]. Por otra parte, los *organoides* son grupos complejos de células específicas de órganos, como las del estómago, el hígado o el cerebro. Estos están hechos a partir de células madre o células progenitoras y se autoensamblan cuando se les proporciona un entorno extracelular de andamiaje. Un organoide es una versión reducida y simplificada de un órgano que se fabrica en el laboratorio mediante métodos de cultivo específicos. Están formados por muchas células diferentes que se organizan en estructuras tridimensionales de tamaño reducido (de micrómetros a centímetros), similares a los tejidos u órganos vivos correspondientes (ej. pulmón, hígado, etc.). Es decir, los organoides pueden llegar a tener características estructurales y funcionales de los órganos humanos. Cuando eso sucede, se convierten en versiones microscópicas de los órganos originales viables para el estudio en 3D.

3.3.3.2. Métodos para la obtención de estructuras 3D

Existen cuatro métodos diferentes para el cultivo de esferoides. El primer (1) método consiste en el uso de placas de baja adherencia para promover la autoagregación y autoensamblaje de células en forma de esferas [274]. Estas placas no solo tienen un revestimiento de superficie de fijación ultra-bajo para minimizar la adherencia celular, sino que también poseen una geometría bien definida (por ejemplo, fondo redondo, cónico o en forma de U) para conducir y colocar un esferoide dentro de cada pozo (**Figura 14A**).

El segundo (2) método consiste en utilizar placas de gota colgante (HDPS, por sus siglas en inglés, Hanging Drop Plates) en donde las células se dispensan en la parte superior de un pozo, estas se segregan hacia la gota de medio formada debajo de la abertura del pozo, formando esferas. Similar a las placas de baja adhesión, el HDPS también se puede usar para el co-cultivo de esferoides, en el que se agregan múltiples tipos de células al momento de la dispensación inicial o de forma secuencial para promover la formación de esferoides multicelulares [275] (**Figura 14B**). El tercer método (3) para obtener esferoides es el uso de un biorreactor como por ejemplo, un Matraz giratorio o biorreactor de microgravedad para inducir la autoagregación de la células en esferoides en condiciones de cultivo dinámico [276]. Este método permite la producción a gran escala de esferoides. Sin embargo, este tiene desventajas asociadas con el esfuerzo cortante inducido por el flujo de fluidos, así como la falta de uniformidad en el tamaño de los esferoides producidos (**Figura 14C**). El cuarto método (4) consiste en utilizar superficies con diseño micro/nano como andamios para controlar la adhesión y la migración celular, permitiendo así la generación de cultivos de esferoides [277]. Existe una amplia gama de andamios a nanoescala impresos en un sustrato plano para la selección de patrones apropiados y propiedades adhesivas para una variedad de tipos de células. Similar a las placas de baja adherencia, estas placas de micro-patrón tienen poca variación de pozo a pozo y de placa a placa, lo que las hace compatibles con detección de alto rendimiento [278] (**Figura 14D**).

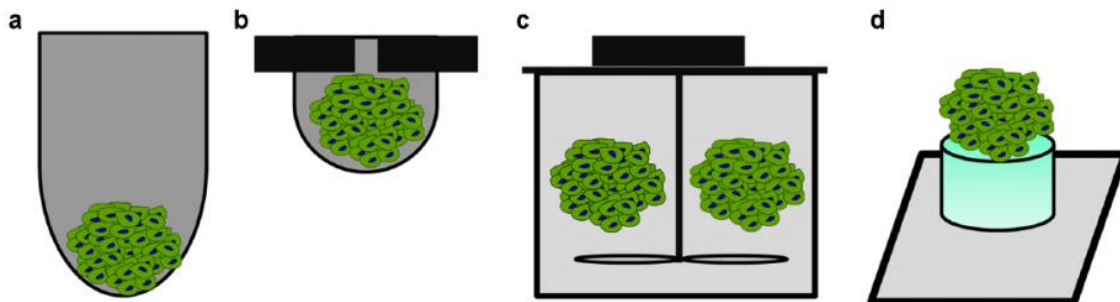


Figura 14: Cuatro técnicas utilizadas para la generación de cultivos en 3D. (a) Pozo de placas de baja adherencia celular formando esferoides en el fondo. (b) Gota de placa colgante donde las células se dividen y se autoorganizan en un esferoide. (c) Cultivo en suspensión en biorreactor donde las células se autoagregan en esferoides. (d) Una columna representativa de placas micro-patrón donde las células se enriquecen en la parte superior de la columna para formar un esferoide. Tomada de la ref. [278].

3.3.3.2.1. Cultivos en suspensión líquida y gotas colgantes

La gota colgante (Hanging-drop) fue la primera técnica para generar estructuras tridimensionales, mediante el cultivo de gotas suspendidas de la (s) línea (s) celular (s) deseada (s) para forzar la agregación. De hecho, Robert Koch *et al.* inventó la metodología de colgar en la década de 1880 para cultivar bacilos de ántrax en una gota suspendida de líquido tomada de ojos de buey en un portaobjetos de microscopio cóncavo especial. Más tarde, Harrison adoptó este método para controlar el crecimiento nervioso. El trabajo pionero de Harrison condujo al desarrollo de varias técnicas para el cultivo a corto plazo de tejidos disecados a principios del siglo XX [279]. Holtfreter en 1944, introdujo la técnica de la gota colgante para la producción de esferoides en 3D a partir de cultivos de células madre embrionarias. La técnica más tarde se convirtió en la base de modelos de cultivo 3D sin andamios capaces de generar esferoides multicelulares. Los esferoides resultantes podrían poseer un tamaño y forma constantes controlados por el ajuste a una densidad específica de la siembra celular. Al principio, la técnica de la gota colgante se llevó a cabo en la tapa de la placa de Petri, dejando caer un pequeño volumen de máximo de 50 μL de suspensión celular, con una densidad celular específica sobre la tapa. Posteriormente, la tapa se invirtió y las alícuotas de suspensión celular se convirtieron en gotas colgantes sin gotear debido a la tensión superficial de la suspensión celular. En consecuencia, las células se vieron obligadas a acumularse en la punta inferior de la gota, en la interfaz líquido-aire, y agregarse y proliferar aún más hasta que se formaron esferoides. La técnica de la gota colgante es relativamente simple y aplicable a numerosas líneas celulares, y su reproducibilidad es casi del 100% en la generación de esferoides 3D [280]. El esferoide 3D obtenido por medio de esta técnica tiende a estar encogido en lugar de agregarse libremente, y se observó una baja variabilidad en los tamaños. El inconveniente innegable de la técnica de caída colgante es el volumen limitado de la suspensión celular. Solo se pueden acomodar hasta 50 μL de suspensión sobre la superficie invertida ya que la tensión superficial no es suficiente para mantener los líquidos adheridos a la superficie [281]. Otra limitación es la dificultad de cambiar el medio de cultivo durante el cultivo sin alterar los esferoides.

3.3.3.2.2. Hidrogeles

Los hidrogeles son las redes de material polimérico reticulado, que generalmente se componen de polímeros hidrofílicos con alto contenido de agua. Los geles exhiben una rigidez similar a un tejido blando para parecerse a la MEC natural porque están hechos de mezclas de polímeros naturales como el colágeno y el alginato, dos de los sustratos más utilizados en el desarrollo de cultivos celulares en 3D, con el fin de asemejarse a diversas características de la MEC nativa para inducir la interacción MEC-célula [282]. El uso más común de hidrogeles se debe combinar con una preparación de membrana basal reconstituida extraída del sarcoma de ratón, que ha sido comercializada por la marca registrada Matrigel (Corning) [283]. Generalmente, los hidrogeles se fabrican a base de polímeros sintéticos y naturales, que son materiales absorbentes de agua, hidrófilos y altamente flexibles. Con procesos de fabricación bien controlados y la composición del material bien definida, los hidrogeles se han convertido en los materiales destacados para el desarrollo de andamios 3D. El cultivo celular 3D que se lleva a cabo mediante hidrogeles se puede integrar con otros modelos de cultivo celular, como cultivos de esferoides celulares, cultivos celulares basados en andamios y cultivos celulares basados en microchips. Así mismo, los hidrogeles son una técnica potencial para ser utilizada para la tecnología 3D *in vitro* debido a su biocompatibilidad, contenido de agua suficiente y propiedades mecánicas similares a las de la MEC [284]. Aunque los hidrogeles no se usan rutinariamente en el campo de la detección de drogas, se han utilizado ampliamente para el desarrollo de la ingeniería de tejidos para simular los cartílagos, vasos sanguíneos, huesos y otros tejidos. Los hidrogeles también facilitan el suministro de moléculas solubles o de señalización a las células y proporcionan un entorno de soporte para el crecimiento y la función celular. Sin embargo, además de una serie de ventajas de los hidrogeles, sus desventajas todavía están presentes y no deben pasarse por alto. La incertidumbre y la complejidad en la composición influenciada por el mecanismo de gelificación pueden causar respuestas celulares no deseadas y no específicas. Además, los mecanismos de gelificación basados en el pH pueden afectar negativamente a las células sensibles a dichos cambios.

3.3.3.2.3. Biorreactores

Debido a que los modelos de cultivo celular 3D se han convertido en una plataforma de laboratorio *in vitro* apropiada para el descubrimiento de agentes terapéuticos se ha suscitado

la atención para hacer frente a la creciente demanda del cultivo 3D a nivel industrial. Los biorreactores se convirtieron en la solución para una gran formación de esferoides y organoides con un sistema de control preciso y reproducibilidad garantizada [285]. Un biorreactor para la producción de esferoides 3D puede clasificarse libremente en cuatro categorías: **(i)** biorreactores de frasco-Spinner; **(ii)** sistemas de cultivo rotacional; **(iii)** biorreactores de perfusión; y **(iv)** Sistemas de fuerza mecánica [286]. El principio general detrás de los sistemas de cultivo 3D basados en biorreactores es que una suspensión celular con la densidad celular óptima prolifera en condiciones de rotación continua, ya sea agitando suavemente, girando la cámara o perfundiendo los medios de cultivo a través de un sistema de bomba. Los biorreactores están equipados con sistemas continuos de flujo de medios para proporcionar la circulación de nutrientes, la eliminación de desechos metabólicos y la homogeneidad de los factores físicos y químicos dentro de los biorreactores. Por lo tanto, los modelos de cultivo celular basados en biorreactores son apropiados para la expansión celular intensiva y la producción de biomoléculas a gran escala, como anticuerpos o factores de crecimiento.

3.3.3.2.4. Andamios

Los andamios 3D se describen como las estructuras 3D sintéticas que se construyen a partir de una amplia gama de materiales y poseen diferentes porosidades, permeabilidad, química superficial y características mecánicas. Están diseñados principalmente para imitar la MEC *in vivo* de los tejidos específicos para cada tipo de célula particular. Los modelos de cultivo celular basados en andamios 3D se han aplicado para el descubrimiento de drogas y la investigación de los comportamientos celulares [287]. Los andamios 3D están destinados a ser porosos, biocompatibles y biodegradables, lo que proporciona microambientes apropiados donde residen las células de forma natural, y cumple con los requisitos mecánicos, físicos y bioquímicos para el crecimiento y la función celular. Así mismo, Se utilizan varios biopolímeros para generar andamios porosos, que incluyen colágeno, gelatina, quitosano y alginato [288]. Secuencialmente, los materiales naturales o sintéticos se polimerizan, congelan y liofilizan. El agua congelada incrustada en los polímeros se sublima directamente sin pasar por la fase líquida, dando como resultado una formación de estructura porosa.

3.3.3.2.5. Bioimpresión 3D

La técnica de impresión 3D es una tecnología desarrollada recientemente que, en general, se conoce como la construcción de estructuras 3D personalizadas bajo control computacional en el que los materiales se imprimen, solidifican y conectan entre sí [289]. El proceso se llama así porque los materiales biocompatibles, las células y los componentes de soporte se utilizan conjuntamente para formar una variedad de estructuras 3D, por lo tanto, la función celular y la viabilidad pueden mantenerse dentro de las formas impresas [290]. En este sentido, la bioimpresión 3D es necesaria para depositar con precisión células, biomateriales y biomoléculas capa por capa mediante un equipo y software asistido por computadora. Sin embargo, las principales preocupaciones de esta metodología son el requisito de la costosa máquina de bioimpresión 3D y los efectos negativos en las células sensibles durante el proceso de impresión, ya que, las células podrían dañarse debido a tensiones osmóticas, térmicas y mecánicas. La bioimpresión 3D de células madre de tejido neural facilitará la investigación sobre el desarrollo, la función y la progresión de una enfermedad neural, así como la detección de fármacos *in vitro*. También hay posibles aplicaciones en la ingeniería de tejido neural específico del paciente para el reemplazo de tejido del sistema nervioso central después de una lesión traumática aguda y una enfermedad degenerativa crónica.

Método de formación	Plataforma de cultivo	Materiales de la plataforma	Estructura	Células madre (especies derivadas)
Gota colgante	Tapa de una placa de Petri	Poliestireno. Recubrimiento en solución	Superficie cuadrada mojable	Células madre derivadas de tejido adiposo (humano)
	Dispositivo microfluídico automatizado	Sustratos de vidrio blanco agua	Pozos	CME-Médula ósea (ratón)
	Red asistida por presión para sistema de acumulación de gotas	Policarbonatolámina, tereftalato de polietileno	Placa de pozo de orificio pasante	CME
	Sustrato hidrofóbico boinspirado	Silicio	Nanocables alineados verticalmente	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
Andamio de hidrogel	Hidrogel esponjoso	Goma Gellan, fibroína de seda	Estructuras de microporos	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
	Microestructura en relieve de papel de lija	Tetronic-tiramina	Microestructura	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
	Microestructura porosa	Poli (ÁCIDO l-glutámico), polietilenglicol	Microestructura porosa	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
	Matriz bioimpresa en 3D	Tinta híbrida de micropartículas de metacrilato de quitosano y alcohol polivinílico	Microestructuras biomiméticas	Células derivadas de tejido médula ósea (rata)
Micropozos	Microestructura	Polímero Tet-TA	Micropozo inspirado en la vaina de semillas de Lotus	ADSC (humanos)
	Microestructura	Alginato	Matriz de pozos hexagonales	CME (ratón)
	Microestructura	Hidrogel PEG	Pozo de apertura piramidal invertida	CME (humanas)
	Microestructura	Agarosa	Micropocillos de fondo redondo	iPSCs (humanas) Células embrionarias (humanos)
	Microestructura	Colágeno, Matrigel	Estructuras de micro-nido de abeja	Células embrionarias (ratón)
Spinner y métodos rotacionales	Levitación acústica multitrampa	PDMS, transductor ultrasónico	Cavidad cilíndrica	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
	Cultivo de pellets con nanofibras	Poli(ÁCIDO l-láctico) (PLLA)	Nanofibra fragmentada mineralizada	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
		Poli(ÁCIDO l-láctico) (PLLA)		CME (humanas)

	Cultivo de pellets con nanofibras		Nanofibra fragmentada	
	Cultivo de pellets con nanofibras	Poli(ÁCIDO l-láctico) (PLLA), crecimiento derivado de plaquetas	Nanofibra fragmentada	Células derivadas de tejido adiposo (humanas)
		factor (PDGF), biomineral		

Tabla 3. Estructuras 3D, técnicas de cultivo y fuentes. Adaptada de [275].

3.3.4. Características morfológicas del modelo 3D

Los esferoides y los organoides son estructuras 3D compuestas por múltiples células. En el caso de los organoides, estos son grupos complejos de células específicas de órganos, como estómago, hígado o la vejiga, cerebro, intestino. Están hechos de células madre o células progenitoras y se autoensamblan cuando se les da un entorno extracelular de andamiaje, como la MEC (matrigel) o el colágeno y, pueden incluso, autogenerarse. Cuando eso sucede, se convierten en versiones microscópicas de órganos parentales viables para el estudio en 3D (**Figura 15A**). Por su parte, los esferoides son grupos simples de células de varios linajes, como el tejido tumoral, los cuerpos embrioides, los hepatocitos, el tejido nervioso o las glándulas mamarias. No requieren un andamio para formar cultivos en 3D; lo hacen simplemente uniéndose unas células con otras. Sin embargo, no pueden autoensamblarse o regenerarse, y por lo tanto no son tan avanzados como los organoides (**Figura 15B**) [291] Los organoides/esferoides tienen importantes ventajas:

1. Se pueden producir en un laboratorio de forma controlada y pueden ser manipulados con relativa facilidad.
2. Constan de más de un tipo de célula, por lo que son más complejos y reproducen mejor el ambiente y lo que realmente ocurre en el organismo vivo.
3. Son de origen humano.
4. Son seguros y asequibles.

Por todo ello, el uso de organoides/esferoides ayuda a entender mejor cómo funciona la biología del ser humano, pero también cómo se producen y desarrollan las enfermedades (cáncer, enfermedades genéticas, enfermedades infecciosas, etc.) y ensayar fármacos o terapias frente a ellas. También pueden ser usados en trasplantes y medicina regenerativa. Además, permiten reducir el uso de animales de experimentación.

No obstante, los organoides/esferoides también tienen importantes limitaciones, sobre todo en estudios que implican la participación de diferentes órganos y su coordinación. Por ejemplo, carecen de sistema vascular o de intercambio de gases. Además, suelen ser inmaduros y tienen una vida limitada. Todos estos problemas están siendo abordados por científicos e ingenieros y, en algunos casos, parecen haberse encontrado soluciones imaginativas. Por ejemplo, se han podido generar redes vasculares usando impresoras 3D. Sin embargo, quizás la característica más importante de los organoides/esferoides es que permiten estudiar el neurodesarrollo, la fisiología y la enfermedad y, por tanto, es un modelo que permite más fácilmente crear un puente entre los modelos animales y la traslación de los modelos preclínicos a los estudios clínicos.

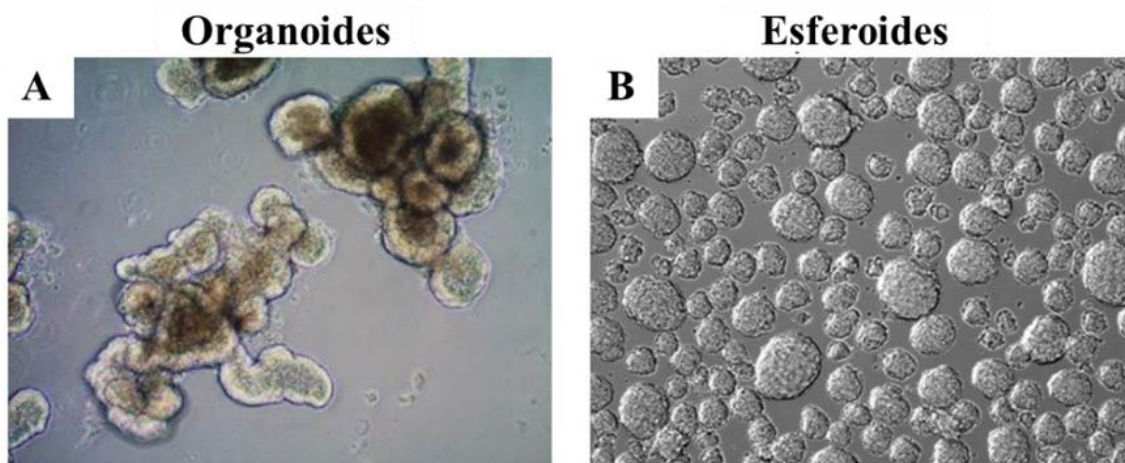


Figura 15. Esferoides vs. Organoides. (A) Los organoides (derivados de células madre) tienen más fenotipos de tipo *in vivo* con mayor orden complejidad tisular comparados con los (B) esferoides (tipo tumorales). Imagen adaptada de [292].

3.3.5. Modelos 3D para el estudio de la EA

Los cultivos tridimensionales cerebrales se han desarrollado para crear estructuras organizadas que se asemejan a distintas regiones del cerebro, manteniendo así los rasgos distintivos de los procesos clave del desarrollo involucrados en la formación de este órgano [263]. En los últimos años, se han realizado varios intentos para modelar subestructuras cerebrales específicas con el uso de organoides o mini cerebros. En este contexto, el cerebro anterior compuesto por el mesencéfalo, el hipocampo y los organoides retinianos se han

desarrollado a partir de iPSCs [293]. La optimización de los protocolos de formación de organoides/esferoides incluye metodologías que favorecen la inducción neural espontánea al evitar la suplementación de los medios de cultivo con factores exógenos, lo que resulta en la adquisición de poblaciones de células heterogéneas, correspondientes a diversas regiones del cerebro [294]. Por lo tanto, la mayoría de los esfuerzos actuales se basan en protocolos que optimizan la aplicación de señales extrínsecas para inducir la diferenciación neuronal de un sitio anatómico específico del cerebro. La relevancia de los organoides/esferoides para la recreación de la patología de inicio tardío de la EA no estaba clara hasta hace muy poco. El primer desarrollo de un modelo de cultivo celular 3D de la EA se logró utilizando células progenitoras neuronales humanas diseñadas genéticamente para sobre-expresar APP y PSEN1 mutantes [295]. Este enfoque experimental demostró el aumento de los depósitos extracelulares de la especie tóxica del péptido β A42 y la fosforilación de Tau en fibrillas. Consecutivamente, Raja y colaboradores, reportaron que los organoides cerebrales derivados de células madre pluripotentes (iPSCs) obtenidas de fibroblastos de pacientes con EA que mostraban una patología similar a la encontrada en la enfermedad, como la agregación amiloide, niveles elevados de la proteína Tau hiperfosforilada y anomalías endosómicas. Estas patologías se observaron de forma dependiente de la edad en organoides derivados de múltiples pacientes con EAF que presentan duplicación de la PPA o mutación en la PSEN1, en comparación con los controles. De igual manera, encontraron que el tratamiento de los organoides derivados del paciente con inhibidores de la β y γ secretasa reducía significativamente la patología amiloide y la fosforilación de Tau. Estos resultados mostraron el potencial de este modelo para aumentar en gran medida la traducibilidad del descubrimiento preclínico de fármacos en la EA [296]. Interesantemente, González y colegas en el 2018, desarrollaron un modelo de organoides cerebrales de EA generados a partir de iPSCs de pacientes con EAF y síndrome de Down [297]. Luego de un proceso de desarrollo *in vitro*, los organoides cerebrales con EAF mostraron una acumulación progresiva de péptido A β con propiedades amiloidogénicas, además de acumular estructuras en forma de placa, que preceden la aparición de Tau fosforiladas y ovillos neurofibrilares también detectaron la activación de la caspasa-3, indicativo de muerte neuronal en los organoides cerebrales de EA. La generación de estos “mini cerebros” con EA amplió el abanico de

posibilidades de la identificación y validación de mecanismos o nuevas vías de señalización que contribuyan a la progresión de la EA.

En este contexto y a pesar de que el desarrollo de mini cerebros ha sido un proceso clave para identificar vías y marcadores patológicos de la EAF *in vitro*, hasta el momento no han sido desarrollados este tipo de estructuras celulares para investigar el efecto de la mutación E280A (“paisa”) en la PSEN1. Mendivil-Perez y colaboradores demostraron en neuronas derivadas de iPSCs con la misma mutación PSEN 1 E280A, altos niveles de beta-amiloide [234]. Interesantemente, Song y colegas recientemente propusieron un modelo de diferenciación neuronal de esferoides exitoso, derivados del co-cultivo de iPSCs y CME basado en la incubación simultánea de iPSCs y CME [298]. Estos hallazgos demuestran la importancia del uso de las CME e iPSCs PSEN1-E280A con el fin de modelar en escala temporal las manifestaciones histopatológicas de la EAF en Antioquia.

3.3.6. Esferoides cerebrales para el modelamiento de la EA: ventajas y limitaciones

Los esferoides cerebrales derivados de iPSCs muestran mayores ventajas, comparados con los cultivos 2D, a la vez que ofrecen la capacidad de modelar interacciones complejas de célula a célula, ya que generalmente contienen más de una población celular. Debido a sus ventajas, los organoides cerebrales derivados de iPSCs se han utilizado para modelar la EA y realizar un seguimiento de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, aún se requieren resolver algunas limitaciones técnicas. Dentro de las limitaciones importantes de este modelo se encuentra la falta de vascularización completa que es crítica para el suministro de oxígeno y nutrientes y por ende, la maduración de las células neuronales y la formación de sinapsis. Esta carencia de flujo vascular limita en general los períodos de cultivo de organoides/esferoides [263,293] e impide modelar aspectos importantes de la fisiología del cerebro, como la barrera hematoencefálica [299]. Otros de los limitantes son que i) aunque los organoides cerebrales producidos a partir de iPSC derivadas de pacientes con EA se parecen estructuralmente a la corteza humana, sin embargo, contienen solo neuronas y células gliales y carecen de oligodendrocitos y del establecimiento de sinapsis activas [297] y no poseen ii) células de la microglía [300]. La ausencia de células microgliales puede atribuirse a su origen embrionario distintivo, ya que derivan de los precursores

eritromieloides del saco vitelino. Para superar los obstáculos y limitaciones previamente descritos, cultivos heterotípicos que combinan células cerebrales de ratón o progenitores cerebrales con células madre endoteliales y mesenquimales se han utilizado recientemente para generar organoides/esferoides [301]. Sin embargo, es importante resaltar que la funcionalidad de este sistema y su aplicabilidad en la EAF aún no se ha explorado, especialmente en el contexto de la generación de esferoides cerebrales con la mutación PSEN1 E280A a partir de CME.

3.3.7. Esferoides cerebrales en el diseño de terapias para la EA

En la actualidad, son pocos los estudios que han implementado el desarrollo de **esferoides cerebrales de la EA** para evaluar el efecto de agentes farmacológicos en diversas etapas y características neuropatológicas de la enfermedad. Dichos estudios utilizaron principalmente moduladores de la β -o γ -secretasa y pudieron observar reducciones en los niveles de péptido β A, así como alteraciones en la patología Tau. En este sentido, Choi y colaboradores. [295] desarrollaron células neuronales diferenciadas en 3D que portaban mutaciones de EAF y, lo que es más importante, demostraron que la interrupción de la generación de β A con inhibidores de la β o γ -secretasa atenuaba la patología relacionada con el mismo β A y Tau, lo que indica que los fenotipos dependientes de Tau pueden ser manifestados por la acumulación excesiva de especies de β A. Además, se encontró que el uso de la enzima GSK3 regula la fosforilación de Tau mediada por el β A en ese sistema. Por lo tanto, ese estudio constituye el primer estudio que demostró que los sistemas *in vitro* 3D derivados de células madre pueden servir potencialmente como plataformas de tratamiento farmacológico contra la EA. En un estudio posterior, Raja y colaboradores [296], encontraron que el tratamiento de los organoides derivados de pacientes con EAF con el inhibidor de la γ -secretasa, compuesto E, o el inhibidor de la β -secretasa BACE-1 (inhibidor de la β -secretasa IV) revirtió parcialmente la patología amiloide y la fosforilación de Tau. Además, los autores mostraron que la inhibición de las especies β A limitó la hiperfosforilación de Tau solamente mientras hubiera una reducción del β A, lo que sugiere que los fenotipos impulsados por la acumulación de β A en la EA pueden surgir antes de la tauopatía. A pesar de estos hallazgos, hasta la fecha no se han establecido modelos de organoides/esferoides para evaluar el potencial efecto de moléculas con capacidad antioxidante, antiagregante del amiloide, ni anti

fosforilación de Tau, ni mucho menos se ha explorado el diseño de terapias que busquen blancos alternativos desencadenantes de la patología celular en la EAF, como es el caso de la APP β intracelular en la mutación PSEN1-E280A causal de la EAF.

CAPÍTULO 4: TRATAMIENTOS PARA LA EA

Aunque en los últimos años se ha avanzado en la comprensión del mecanismo de la EAF, en la actualidad no existe una terapia farmacológica que prevenga, detenga o revierta el progreso de la enfermedad [8]. La falta de conocimiento de la etiopatogenia es una de las principales razones del porque no se ha podido lograr el desarrollo de un tratamiento efectivo.

4.1. Tratamientos convencionales y sus limitaciones en etapa preclínica

Los tratamientos actuales disponibles para la EA proporcionan beneficios terapéuticos limitados, pues ninguno de estos previene o revierte la progresión de la enfermedad, sino que más bien trata sus síntomas [302]. A la fecha, existen disponibles cuatro fármacos aprobados para el tratamiento de la EA, tres son inhibidores de la enzima Acetil-colinesterasa (AChE) (v.gr. Rivistagmina, donepezilo y galantamina). La inhibición de esta enzima impide la degradación del neurotransmisor acetilcolina (ACh), produciendo un aumento en su concentración y por lo tanto mejorando sus efectos funcionales en el cerebro. El otro, es un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina) [303] que contrarresta la sobrestimulación de los receptores NMDA, ya que la sobrestimulación de estos genera la excitotoxicidad mediada por glutamato, resultando en la sobrecarga de Ca^{2+} y disfunción mitocondrial, con un incremento en la generación de $NO\cdot$, lo cual puede ocasionar EO y promover la apoptosis. Desafortunadamente, sólo ayudan a mejorar los síntomas de la demencia de forma temporal y su efecto funcional sólo se ha visto en algunos pacientes [304]. Los inhibidores de la AChE son uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la EA. El mecanismo de acción de estos medicamentos consiste en aumentar la disponibilidad de la ACh en el espacio sináptico, al inhibir la enzima encargada de su catabolismo; la AChE. El uso de los inhibidores de la AChE como la tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina han demostrado tener un efecto directo en la transmisión colinérgica en la neo-corteza y en el hipocampo, que se ve reflejado en una mejora en las funciones cognitivas y conductuales del paciente [305,306]. El glutamato es un neurotransmisor excitatorio implicado en el mecanismo neuronal responsable del aprendizaje y la memoria. La memantina, el medicamento representante de este tipo de fármacos, actúa como antagonista de uno de los receptores del glutamato, el NMDA evitando la afluencia Ca^{2+} , cuando las tasas de activación neuronal son altas, pero a su vez permite el flujo de éste a bajas tasas de estimulación

neuronal. Presenta beneficios sintomáticos para los pacientes, pero no un efecto modificador de la enfermedad [306].

Los fármacos utilizados para reducir la producción de β A se clasifican en tres categorías: inhibidores de β -secretasa, inhibidores y moduladores de γ -secretasa y activadores de α -secretasa. La β -secretasa (BACE1) es una de las enzimas clave para la producción de β A. Sin embargo, el desarrollo de inhibidores de la β -secretasa a menudo no cumple con las expectativas clínicas. Por ejemplo, el Verubecestat, un inhibidor de BACE1, se consideró una vez un fármaco prometedor para la EA, ya que se descubrió que reducía los niveles de β A en el líquido cefalorraquídeo de ratas, monos y pacientes con EA en un estudio preliminar. Sin embargo, dos estudios clínicos de fase III (NCT01739348 y NCT01953601) se cancelaron debido a su incapacidad para lograr los resultados esperados. Estos pacientes con EA experimentaron múltiples efectos adversos relacionados con el tratamiento, que incluyen erupciones cutáneas, lesiones, trastornos del sueño, ideación suicida, pérdida de peso y decoloración del cabello [307]. Además, los estudios demostraron que Verubecestat puede conducir a una reducción acelerada del volumen en el hipocampo (y otras regiones del cerebro) en pacientes con EA [308]. Por otra parte, los inhibidores de la β -secretasa, como Lanabecestat, Elenbecestat, Umibecestat y Atabecestat, se suspendieron debido a la falta de eficacia clínica. Aunque estos fármacos inhibieron BACE1 con éxito, no mejoraron las funciones cognitivas en pacientes con EA porque BACE1 escinde sustratos para diversas funciones, especialmente en la regulación de la excitabilidad de las células neuronales y la mielinización axonal [309]. Por lo tanto, la inhibición de BACE1 conduce a muchos efectos adversos e incluso exacerba el deterioro de la función cognitiva.

De manera similar, los inhibidores de la γ -secretasa (GSI) enfrentan un dilema similar a los inhibidores de la β -secretasa. La poca eficacia y los efectos secundarios dañinos son las razones principales por las que se han descontinuado estos medicamentos. Por ejemplo, la enzima γ -secretasa escinde más de 140 sustratos, incluidos APLP1 y APLP2, Notch, ErbB4 y p75. La reducción de la hidrólisis de estos sustratos conduce a una variedad de reacciones adversas. Por ejemplo, Semagacestat conduce a un deterioro de la función cognitiva, cáncer de piel, un mayor riesgo de infección y hemorragia gastrointestinal al reducir la señalización

de Notch [310]. Así mismo, Avagacestat, otro inhibidor de la γ -secretasa, también causa múltiples reacciones adversas, incluido el cáncer de piel no melanoma y síntomas gastrointestinales. Dado que los inhibidores de la γ -secretasa aumentan el riesgo de cáncer y provocan un deterioro cognitivo, pueden ser un objetivo inapropiado para el tratamiento clínico de la EA.

Por otro lado, se han evaluado los inductores de α -secretasa, demostrando que aumentan la hidrólisis de PPA para producir proteínas no amiloides como los fragmentos sAPP α , que están involucrados en funciones neurotróficas y neuroprotectoras. De manera interesante, se evidenció que la epigallocatequina-3-galato (EGCG), un flavonoide polifenólico natural, aumenta la actividad de escisión de la α -secretasa y mejora la función cognitiva de los ratones PPA/PS1 [311-313]. Además, EGCG conduce a una reducción de la neuroinflamación y juega un papel crucial en la neuroprotección y prevención de la enfermedad de Alzheimer [314]. Es por esto que, como terapia alternativa para la EA, la EGCG podría representar una molécula promisoriosa con distintos blancos moleculares.

Actualmente, los inhibidores de la AChE constituyen el tratamiento de referencia en la EA, a pesar de que su función disminuye a medida que la enfermedad progresa. Otros tratamientos como antagonistas o moduladores de los receptores NMDA, y precursores de la síntesis de acetilcolina presentan una funcionalidad limitada y se consideran principalmente coadyuvantes en el manejo terapéutico del paciente [315]. En fase clínica 2 encontramos antagonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina, inhibidores de la agregación, un activador de la α -secretasa y diversas moléculas para inmunoterapia activa. Infortunadamente, el Alzhemed (glucosaminoglucano) y los inhibidores/moduladores de la actividad γ -secretasa han generado resultados contradictorios en fase 3. Grandes avances han tenido los estudios de inmunoterapia pasiva empleando vacunas a base de anticuerpos monoclonales humanizados o directamente anticuerpos de humanos llegando hasta fase 3 [316]. Sin embargo, recientemente se ha reportado que han fallado en la fase 3, al no mostrar efectos beneficiosos para los pacientes; como es el caso del bapineuzumab y el solaneuzumab cuestionando el potencial de la inmunoterapia y planteándose las preguntas: ¿Si estos anticuerpos pueden funcionar o si se sabe a ciencia cierta a donde deben dirigirse o a que

blanco terapéutico, es decir a β A monomérico, oligomérico, protofibrilar o a la placa de beta amiloide? y si ¿Su objetivo es el dominio N, C terminal o el dominio intermedio? [317]. Ante estas preguntas y el rápido aumento de las tasas de prevalencia de la EA hace necesario y urgente la existencia de un modelo que recapitule todo el espectro neuropatológico de la enfermedad y que nos permita el estudio de un tamizaje de compuestos con capacidad antioxidante, antiamiloidogénico y anti-fosforilación de Tau dirigidos a prevenir, detener o revertir esta devastadora enfermedad. En este sentido, las CME PSEN1 E280A provenientes de pacientes con la EAF constituyen un excelente modelo y herramienta de estudio para recrear la neuropatología y evaluar compuestos con potencial terapéutico como los cannabinoides y la Epigallocatequina -3- galato y la melatonina en esta enfermedad neurológica devastadora.

4.2. Alternativas terapéuticas emergentes en la EA: reposicionamiento

En la actualidad varios fármacos se encuentran en evaluación o en diferentes fases de estudio, los cuales actúan sobre distintos procesos en la patogenia de la EA, entre ellos se encuentran terapias anti-amiloide (como inhibidores de beta y gamma secretasa, inmunoterapia), terapias neuroprotectoras (como inhibidores de quinasas, de la agregación de la proteína Tau, inhibidores de caspasas), estrategias neuroreparadoras (factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso), y el uso potencial, de células madre mediante trasplante autólogo o implante de células madre embrionaria [318]. Adicionalmente, la búsqueda e investigación de nuevos prospectos farmacéuticos ha demostrado que los productos naturales, tales como extractos de plantas y compuestos de origen vegetal tienen un enorme potencial para convertirse en fármacos que prevengan la enfermedad o detengan su progresión [319,320].

4.3. Los cannabinoides como alternativa terapéutica en la EA

4.3.1. Definición, clasificación y estructura

Los cannabinoides son un grupo de compuestos terpenofenólicos sintetizados en las vellosidades glandulares de la planta *Cannabis sativa* [321]. Estos compuestos suelen tener

una estructura carbocíclica con 21 carbonos y están formados generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Los principales cannabinoides son: el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN). Otros cannabinoides presentes en la planta son el cannabicromeno (CBC), cannabicitrol (CBL), cannabigerol (CBG), monometiliter del cannabigerol (CBGM), cannabielsoina (CBE), cannabinodiol (CBND), cannabitriol (CBT), dehidrocannabifurano y cannabicitrano. Los cannabinoides ejercen un amplio espectro de acciones sobre la actividad fisiológica normal, la mayor parte de las cuales son atribuibles al Δ^9 -THC (**Figura 16**). Entre los efectos asociados al consumo agudo de derivados cannabinoides destacan las acciones sobre la parte cognitiva y psicológica, incluyendo una marcada sensación de euforia, relajación y sedación. Pero la administración de compuestos cannabinoides se asocia además a la aparición de efectos analgésicos, antieméticos, acciones sobre la actividad muscular, efectos cardiovasculares, neuroendocrinos, inmunomoduladores y antiproliferativos. La mayoría de las acciones farmacológicas evocadas por los compuestos cannabinoides se deben a su interacción con, al menos, dos tipos diferentes de proteína receptora, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G [322,323].

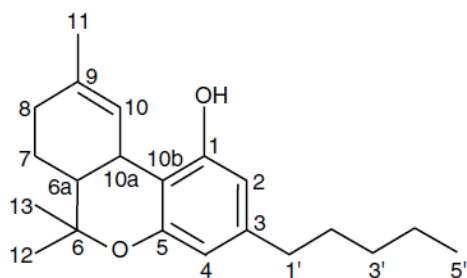


Figura 16. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol. Tomada de la ref. [324].

Biológicamente, los cannabinoides son compuestos químicos que pueden interactuar, de alguna u otra forma, con receptores de cannabinoides. Dichos compuestos pueden dividirse en **nabimiméticos** (exhiben actividad cannabinoide y son los agonistas del receptor CB1) y **antagonistas** capaces de unirse a los receptores cannabinoides (no producen efectos nabinoideos, simplemente bloquean estos receptores para evitar la unión de otras sustancias). El término "cannabinoides" abarca compuestos que poseen estructuras químicas diferentes y se agrupan en la siguiente clasificación convencional como [325]: **i) Cannabinoides clásicos:**

que son los derivados del dibenzopirano (v.gr. **THC, sus isómeros y análogos sintéticos estructuralmente relacionados**); los **ii**) Cannabinoides no clásicos: derivados sintéticos de ciclohexilfenol (3-arilciclohexanoles tales como CP47,497 y CP55940; los **iii**) **Cannabinoides híbridos** que combinan las características estructurales de los cannabinoides clásicos y no clásicos; los **iv**) **Aminoalquilindoles**: que son una gran familia de cannabinoides sintéticos que a su vez se pueden subdividir, según la clasificación actual, en naftoilindoles, fenilacetilindoles, benzoilindoles y naftilmetilindoles; los **v**) **Eicosanoides**: endocannabinoides (tales como la anandamida) o sus análogos sintéticos y en **vi**) **Otros**: que son compuestos tales como diarilpirazoles, naftoilpirroles, naftilmetilindenos y otros cannabinoides que no constituyen una clase o familia *per se*.

Algunos factores como el que la actividad farmacológica de los cannabinoides psicotrópicos estuviera influenciada significativamente por su estructura química, así como que algunos exhibieran estereo-selectividad y la potencia con la que el Δ^9 -THC se unía a varios tipos de receptores previamente conocidos en otros modelos, hicieron sugerir la existencia de receptores específicos en el cuerpo humano para este tipo de moléculas [326]. Sin embargo, el esclarecimiento de su actividad se pudo llevar a cabo gracias al descubrimiento de la habilidad que tienen los cannabinoides de inhibir la adenilato ciclasa a través de los receptores acoplados a la proteína G [327]. En este sentido, en la actualidad se conoce que existen dos receptores principales para los cannabinoides: el CB1 y CB2, estas moléculas que hacen parte de la familia de los receptores acoplados a la proteína G poseen una identidad del 44% en su contenido de aminoácidos y están asociados filogenéticamente con los receptores de las prostaglandinas [328].

4.3.2. Los receptores de cannabinoides y su clasificación

El receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) es codificado por un gen localizado en el cromosoma 6 (6q14-q15) [329] y es expresado en una gran variedad de tejidos incluyendo el cerebro, el sistema cardiovascular y reproductivo, así como también en el tracto gastrointestinal [330-334]. En el cerebro, el receptor CB1 está acoplado a las vías de transducción de la proteína G que media los estímulos provocados por los cannabinoides a través de las MAP quinasas (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases, o

proteína quinasas activadas por mitógenos) y la inhibición del adenilato ciclasa, disminuyendo así la concentración del Adenosín monofosfato cíclico (cAMP) intracelular. La disminución de los niveles de cAMP trae como consecuencia la inhibición de las proteínas-quinasas dependientes de cAMP (PKA) encargadas de fosforilar los canales de potasio, ocasionando así un aumento en los niveles intracelulares de este ion [335,336]. Estas iones de potasio a su vez inhiben la liberación de neurotransmisores como el glutamato, la acetilcolina y la noradrenalina [337-339].

El receptor CB2 es codificado por un gen localizado en el cromosoma 1 (1p36) [340] y su expresión está ampliamente distribuida en tejidos periféricos, especialmente en células del tejido inmune [341], aunque también se ha podido demostrar que puede expresarse en ciertas regiones del cerebro [342,343]. Algunas funciones atribuidas a este receptor se asocian con su participación en la modulación de la liberación de citoquinas en células inmunes [344] y con la diferenciación y supervivencia celular en tejidos neuronales y no neuronales [345].

4.3.3. Sistema endógeno de cannabinoides

En el año 2007, poco tiempo después del descubrimiento de los receptores de cannabinoides se logró identificar que en el cuerpo humano se sintetizaban moléculas de este tipo en forma endógena, capaces de unirse a la proteína CB1, especialmente en el cerebro y se les denominó endocannabinoides [346]. El primer endocannabinoide identificado fue la molécula araquidonoil etanolamida, también conocida como *anandamida* [347], posteriormente se pudo identificar otro de los agonistas endógenos de los receptores CB1 y CB2 identificado como *2-araquidonoil-glicerol (2-AG)* [348]. Estas moléculas, a diferencia de los neurotransmisores clásicos, no están contenidas en vesículas sinápticas, por lo que se infiere que son producidas bajo demanda y expulsadas de las células por medio de un transportador para cumplir su función y posteriormente son degradadas en el interior de la célula [349,350].

4.3.4. Los cannabinoides naturales y sintéticos: Efectos farmacológicos

La identificación de los receptores de cannabinoides en el sistema nervioso humano ha permitido el diseño de ligandos sintéticos que pueden ser administrados de manera exógena y que son capaces de emular los efectos protectores inducidos por los cannabinoides

endógenos o de inhibir los efectos nocivos producidos por otros cannabinoides a través del acoplamiento con los receptores CB1 y CB2. En este sentido, se ha propuesto que el uso del Δ^9 -THC y otras moléculas análogas ayudan a suprimir síntomas como las náuseas y el vómito producidos por la quimioterapia, así como también para el estímulo del apetito en pacientes con sida y la analgesia en pacientes con cáncer. Estos resultados condujeron a la síntesis de una segunda generación de agonistas de receptores de cannabinoides cuyo diseño se ha enfocado en el estudio y control de otras afecciones clínicas [351] (**Tabla 4**). En el sistema nervioso la administración de cannabinoides exógenos y su acoplamiento con los receptores CB1 han sido asociadas a la activación del receptor CB1, específicamente en aquellos receptores localizados en las terminales presinápticas. La importancia de estos receptores CB1 presinápticos radica en que están presentes en las terminales de muchas neuronas gabaérgicas, glutamatérgicas, colinérgicas y noradrenérgicas y su activación trae como consecuencia la inhibición de la liberación de neurotransmisores en los axones. Al bloquear la neurotransmisión, los cannabinoides intervienen en el desarrollo de funciones nerviosas como el control sensorial y motriz, así mismo se producen algunos efectos hipotensivos y bradicárdicos, también se afectan condiciones como la cognición y dependencia de drogas [352] y se altera el ciclo circadiano, la memoria, actividad locomotora y la percepción del dolor.

Tabla 4. Cannabinoides sintéticos y su afinidad por los receptores CB1 y CB2. Datos documentados en la ref. [353].

Selectividad	Molécula
Selectividad por CB1	ACEA
	ACPA
	0-1812
	Noladin Eter
	0-585
Selectividad por CB2	L759656
	L759633
	JWH-139

	JWH-133
	HU-308
	JWH-015
	AM1241
	Sch35966
No-Selectivos	(-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
	Δ^8 -tetrahydrocannabinol
	HU-210
	Nabilona
	CP55940
	R-(+)-WIN55212
	WIN55,212-2
	Anandamida
	R-(+)-Metanandamida
	Virodamina
2-araquidonoil-glicerol	

4.3.5. Los cannabinoides y la EA

En la actualidad el régimen terapéutico disponible para el tratamiento de la EA sigue siendo muy limitado. Entre los fármacos más utilizados hoy en día destacan los inhibidores de la acetilcolinesterasa AChE, enzima responsable de la degradación de la ACh, en ácido acético y colina. Su uso se justifica por la observación en la que, en términos generales, el déficit colinérgico en el cerebro de pacientes con EA parece explicar algunas de las alteraciones cognitivas, funcionales y de comportamiento de estos pacientes. En este sentido, el uso de agentes capaces de modular el efecto de los endocannabinoides podría ser una opción. Entre estos compuestos análogos de los endocannabinoides, cabe destacar los agentes antiglutamatérgicos, agentes antioxidantes y antiinflamatorios.

El efecto antiglutamatérgico de los cannabinoides es bien conocido se fundamenta en las propiedades neuroprotectoras de estos compuestos [354]. Se ha evidenciado tanto *in vivo*

como *in vitro* que los cannabinoides mediante la activación de los receptores de tipo CB1, mayoritariamente presinápticos, ejercen una función inhibitoria de la liberación de glutamato, convirtiéndose en potentes compuestos que eliminan la excitotoxicidad inducida por el glutamato. Más aún, algunos cannabinoides tienen también características de antagonistas NMDA; así por ejemplo el HU211 (dexanabinol) reduce de forma directa la entrada de Ca^{2+} dependiente de NMDA [355].

La observación experimental de que la EA posee un importante componente inflamatorio hizo que la comunidad científica se focalizara en la búsqueda de compuestos antiinflamatorios [356]. De hecho, es bien conocido que la aparición de placas neuríticas en el parénquima cerebral desencadena una compleja reacción inflamatoria de tipo focal, en la que las células de la glía se activan desempeñando un papel crucial en respuesta a estos procesos con la generación continuada de citoquinas y otras moléculas de tipo inflamatorio por parte de estas células, lo cual empeora el cuadro clínico y aumenta el daño neuronal. En los últimos años, se ha propuesto que algunos fármacos antiinflamatorios podrían ser útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA [357]. Las propiedades antiinflamatorias de los cannabinoides han sido demostradas en estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* [358]. Es interesante destacar que el efecto antiinflamatorio de estos compuestos parece involucrar tanto a los receptores CB1 como a los CB2. Así, la activación de receptores CB1 modula la producción de diversas citoquinas inflamatorias por parte de las células de la glía y, entre ellas, IL-1, TNF-alfa, IL6 e IL-12, que se sabe que desempeñan un importante papel en el desarrollo del daño asociado a procesos de neuroinflamación. En este efecto, de la producción de citoquinas inflamatorias, estaría probablemente involucrado el factor nuclear kappa B. La activación de los receptores CB1 también parece estar ligada a un aumento en la producción de moléculas antiinflamatorias (IL-10), factores tróficos y neurotrofinas que podrían rescatar a las neuronas de la muerte en un ambiente inflamatorio [358,359]. Aunque la presencia de receptores CB2 en el SNC parece circunscribirse a elementos celulares específicos, su sobreexpresión en condiciones neuroinflamatorias se ha observado en diversos modelos experimentales y patologías humanas [360]. Es importante destacar en los procesos de neuroinflamación, especialmente, a la población de CB2 presente en las células de microglía,

dado que estas células juegan un papel crítico en la respuesta del SNC frente a estímulos dañinos, que es el cuadro característico de inflamación crónica que ocurre en la EA.

Entre los fármacos derivados de los cannabinoides más ampliamente utilizados en el tratamiento de pacientes con EA, se destacan aquellos que incrementan el tono muscular colinérgico y, especialmente, aquellos que inhiben la acción de la acetilcolinesterasa [361]. Se ha demostrado que el THC inhibe de forma no competitiva la actividad de este enzima [362]. Más aún, el THC también es capaz de disminuir la agregación del β A con mayor potencia que algunos de los anticolinesterásicos clásicos (donepezil y tacrina) [362].

Uno de los aspectos más relevantes en la progresión de la neuropatología de la EA es la producción de EROs por parte de las células de la glía y, especialmente, de la microglía activada [363]. Este tipo de células experimenta profundos cambios fenotípicos como consecuencia de la aparición de los depósitos patológicos de β A; entre estos cambios se destaca la generación de EROs de forma mantenida que contribuyen al deterioro neuronal. Es bien conocido que los cannabinoides son potentes agentes antioxidantes; entre ellos cabe destacar al cannabidiol [364], que posee propiedades antioxidantes y carece de efectos psicoactivos que lo hacen un compuesto promisorio como neuroprotector en la EA [365]. Interesantemente, otros cannabinoides que poseen una estructura de anillo fenólico como el THC, cannabinal, y levonantradol, también tienen propiedades antioxidantes. Así mismo, en la EA se ha evidenciado que los cannabinoides sintéticos reducen el EO generado por el péptido β A₂₅₋₃₅ de manera independiente de sus receptores CB2. Adicionalmente, en estos estudios *in vitro*, linfocitos humanos fueron expuestos al fragmento neurotóxico del β A₂₅₋₃₅ y mostraron muerte celular inducida por la sobreproducción de EROs y la activación de los factores de transcripción como el NF- κ B y p53; interesantemente, la muerte fue prevenida por los cannabinoides sintéticos CP55940 y JWH-015, dicha actividad protectora se asoció con sus propiedades antioxidantes [366]. De hecho, estos hallazgos *in vitro*, fueron confirmados en el modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*, un modelo libre de receptores CB1 y CB2 de cannabinoides, en el cual el EO generado por la exposición al paraquat y/o al β A, induce daños neuronales, los cuales fueron revertidos cuando las moscas ingirieron el

cannabinoide sintético CP55940. Estas observaciones demuestran que los cannabinoides tienen capacidad antioxidante suficiente e independiente de los receptores CB1 y CB2 para prevenir daños oxidativos inducidos por neurotoxinas generadoras de EO como el β A en la EA.

4.4. La epigallocatequina-3-galato (EGCG) como alternativa terapéutica en la EA

4.4.1. Definición, estructura y clasificación

La EGCG es el producto natural polifenólico que se encuentra en hojas frescas y secas del té verde (planta *Camellia sinensis*) [367], junto a otros compuestos polifenólicos de menor abundancia, que incluyen (-) - epicatequina-3-galato (ECG), (-) - epigallocatequina (EGC), (-) - epicatequina (EC) y (+) – catequina [368]. La EGCG es un flavanol del subgrupo de las catequinas monoméricas que pueden formar polímeros u oligómeros (contienen de 2-7 unidades monoméricas) denominados proantocianidinas que a su vez pueden ser cortadas por un ácido catalizador y formar las antocianidinas [369]. La EGCG monomérica con estructura isomérica está compuesta de un éster de epicatequina y un ácido gálico en la posición 3 (**Figura 17**). Esta biomolécula ha sido ampliamente estudiada en medicina por su potencial capacidad como antioxidante y neuroprotector, atribuyéndole amplios beneficios para la salud humana, sustentada por estudios recientes que han reportado su acción terapéutica en diversas patologías incluidas las enfermedades neurodegenerativas [370,371]. La principal fuente de EGCG es el té verde derivado de la planta *Camellia sinensis*. El té verde, es una bebida tradicional china preparada a partir de las hojas de la planta, la cual es consumida a diario en más de 160 países [372]. Más del 50% de la combinación de catequinas del té verde se compone de EGCG, ésta representa aproximadamente el 10% del peso del extracto seco [373]. Se calcula que, en una taza de té verde, se encuentran de 200 a 300 mg de EGCG [374]. Además del té verde, la EGCG se encuentra en el té negro y en una gran variedad de frutas, especialmente en las cáscaras de las uvas, manzanas, arándanos, cerezas y fresas [375]. Se han realizado varios estudios clínicos para evaluar los efectos de componentes del té como la EGCG sobre la función cognitiva (por ejemplo, la atención) y el estado de ánimo. Los resultados obtenidos mostraron que el consumo de té tenía importantes beneficios en el estado de ánimo, el rendimiento laboral, la creatividad [376,377] y en la reducción de la progresión de la disfunción cognitiva [378,379]. Ide y colaboradores, mostraron que el

consumo de té verde en sujetos con disfunción cognitiva (2 gr/ día durante 3 meses, aproximadamente igual a 2 a 4 tazas de té/ día) mejoró significativamente el rendimiento cognitivo [380]. Indicando la potencial importancia de esta molécula en procesos relacionados con el aprendizaje.

4.4.2. Efectos terapéuticos de la EGCG

El potencial terapéutico de la EGCG se atribuye principalmente a sus propiedades antioxidantes, eliminadora de radicales, reguladora de la expresión de enzimas antioxidantes; además es catalogada como uno de los mejores compuestos queladores de metales; adicionalmente, se han demostrado sus propiedades antiapoptóticas y antiinflamatorias [314]. La EGCG ha mostrado actividad inhibitoria de las vías apoptóticas al reducir proteínas pro-apoptóticas como NF- κ B y AP-1 y restaura la actividad de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, también actúa sobre el EO activando enzimas antioxidantes como SOD, GPx, CAT y glutatión S- transferasa [381]. La EGCG influye en la activación de señales comprometidas con respuesta a alergias y en la proliferación celular [382].

Los efectos benéficos de la EGCG como antioxidante pueden ser atribuibles principalmente a su estructura química. En varios estudios *in vitro*, se ha demostrado que la EGCG tiene la mayor actividad antioxidante en comparación con otras catequinas. Esta propiedad antioxidante proviene principalmente de la fuerte presencia de grupos hidroxilo en sus estructuras moleculares. La EGCG, con 8 grupos hidroxilo en particular en las posiciones 3', 4' y 5' y con un residuo de galato en C-3, lo que es lo hace un compuesto mejor donante de electrones que las otras catequinas y, por lo tanto, el mejor eliminador de radicales libres [383]. La EGCG puede eliminar diferentes especies de radicales libres como por ejemplo, el 1,1-difenil-3-picrilhidrazilo, los peroxilos, el ON \cdot , los radicales libres de lípidos, el singlete de oxígeno, el peroxinitrito, radicales libres de hidroxilo y de anión superóxido, a través de tres mecanismos: *i*) mediante la interacción directa entre las catequinas y el radical peroxilo por medio de un mecanismo rápido de transferencia de electrones (átomo de H) para prevenir la rotura de la cadena de ADN, *ii*) formando radicales libres estables de semiquinona previniendo la capacidad de desaminación de los radicales libres [370,384], y *iii*) quelando los iones metálicos a sus formas inactivas. El mecanismo de acción de la quelación de metales

por parte de la EGCG implica la unión de iones de metales de transición en dos posiciones de la estructura química de la molécula: en la posición 3'4'-dihidroxi en el anillo B y en la posición 4-ceto, 3-hidroxi o 4 ceto y 5-hidroxi en el anillo C, que inhibe la formación de radicales libres catalizados por metales de transición [385,386]. Adicionalmente, se ha demostrado en estudios *in vivo* que la EGCG protege de la peroxidación lipídica, reduciendo significativamente los niveles de marcadores de peroxidación de lípidos, como hidroperóxidos de lípidos, 4-hidroxinoneal y malondialdehído [370].

A la EGCG también se le ha atribuido un papel de activador de segundos mensajeros intracelulares, incluidos Ca^{2+} , cAMP y cGMP. De acuerdo con ello, los niveles de Ca^{2+} citosólico en células excitables y no excitables son elevados por la EGCG por estimulación con concentraciones nanomolares [387] que facilitan la liberación de glutamato desde los terminales glutamatérgicos modulando positivamente la activación de los canales de Ca^{2+} tipo N y P/ Q a través de una cascada de señalización que involucra a la proteína quinasa C (PKC) [388]. La EGCG estimula también la producción de los nucleótidos cíclicos Adenosina Monofosfato y Guanosina Monofosfato por activación directa de la adenilato ciclasa [389,390], lo cual puede ser uno de los mecanismos importantes que subyacen a las acciones biológicas beneficiosas del EGCG en la fisiología metabólica neuronal [367].

Interesantemente, Además de las propiedades benéficas descritas anteriormente, se han reportado efectos de la EGCG sobre la función nuclear en donde modula la expresión génica mediante la inhibición de varios factores de transcripción, incluidos Sp1, NF- κ B, AP-1, STAT1, STAT3 y FOXO1 [387]. Esto sugiere que la EGCG tiene el papel de factor de transcripción que se transporta al núcleo, en donde también tiene la capacidad de regular la expresión de genes de supervivencia y muerte celular, al reducir la expresión de genes pro-apoptóticos; como bax, bad, mdm1, caspasa-1, caspasa-6, TRAIL, p21 y gadd45. De hecho, se ha demostrado que la EGCG induce este efecto protector a través de la regulación de bax, al disminuir las concentraciones de esta proteína en el citoplasma celular, esta regulación de expresión de la proteína bax conlleva a que se vea aumentada la expresión y disponibilidad celular en proporción de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2/ Bcl-xL con relación a las proteínas pro-apoptóticas Bax/ bad; lo que aumenta la estabilidad mitocondrial, protege la

integridad mitocondrial y aumenta la supervivencia celular [370]. Considerando los reportes sobre las funciones y capacidades de la EGCG *in vitro* e *in vivo*, es razonable proponer a la EGCG como un excelente candidato a ser evaluado como agente terapéutico con propiedades neuroprotectoras en modelos de EO relacionados con procesos neurodegenerativos.

4.4.3. La EGCG como agente terapéutico en la EA

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos patológicos propuestos para la EA incluyen los agregados del β A, la inflamación desencadenada por la microglía, la activación excesiva de los receptores de glutamato, el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, la generación excesiva de EROs, la disfunción mitocondrial y la disfunción y pérdida sináptica neuronal. La acumulación intracelular anormal de β A y la proteína Tau fosforilada son biomarcadores claves en la EA asociados con inflamación, expresión elevada de proteínas pro-apoptóticas y el EO, que conducen a la disfunción y muerte de células neuronales en la corteza cerebral. Por lo tanto, agentes que prevengan la formación o que eliminen estos biomarcadores son esperanzadores para la prevención o tratamiento de la EA [314]. Se conoce que los polifenoles del té verde poseen acción neuroprotectora, neurorestauradora y antiamiloidogénica. En particular, la EGCG ha demostrado aumentar la viabilidad celular, disminuir las EROs, los niveles de expresión de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico y los marcadores apoptóticos. También protege a las células de la disfunción mitocondrial, de la apoptosis inducida por EO mitocondrial y de excitotoxicidad por glutamato. La EGCG también conserva la energía mitocondrial y limita la inflamación del cerebro y el daño neuronal que a su vez prolonga la aparición de síntomas, la esperanza de vida, la habilidad cognitiva y la capacidad de aprendizaje del paciente. La EGCG no solo ejerce efectos neuroprotectores, sino que también ejerce la actividad de rescate neuronal al promover el crecimiento de neuritas [370]; además, se ha demostrado su efecto anti-amiloidogénico [391] y como inhibidor de la hiperfosforilación de la proteína Tau [392]. Lo que hace que este compuesto sea un potencial candidato como agente modificador de la EA con propiedades neuroprotectoras y neurorestauradoras.

Otros estudios sugieren que el mecanismo por el cual la EGCG inhibe la neurotoxicidad del péptido β A42 es a través de la modificación en la morfología del mismo provocada por la

unión alternativa del hidrógeno facilitada por los radicales libres de hidroxilo de la molécula de EGCG oxidada [393]. Para comprender el mecanismo molecular de acción de este polihidroxifenol, un estudio adicional demostró que las moléculas de EGCG oxidadas reaccionan con las aminos libres o los tioles dentro de las fibrillas de β A intrínsecamente desordenadas a través de la formación de bases de Schiff, que entrecruzan las fibrillas, promoviendo su ensamblaje en oligómeros grandes, no tóxicos y esféricos. EGCG también puede remodelar fibrillas amiloides maduras, convirtiéndolas en agregados de proteínas amorfas que son menos tóxicas para las células [394]. Un estudio reciente, sugirió que el efecto de antiagregación amiloide de la EGCG ocurre por dos vías principales, en la primera i) la EGCG se une a la forma nativa de β A a través de interacciones con las cadenas laterales de residuos específicos, y en la segunda vía, ii) la EGCG se une a las especies del péptido β A mal plegadas con elementos no covalentes que crean interacciones que involucran el esqueleto del β A para posteriormente remodelar los agregados del péptido β A tóxicos en pequeños oligómeros no tóxicos [395] (**Figura 17**).

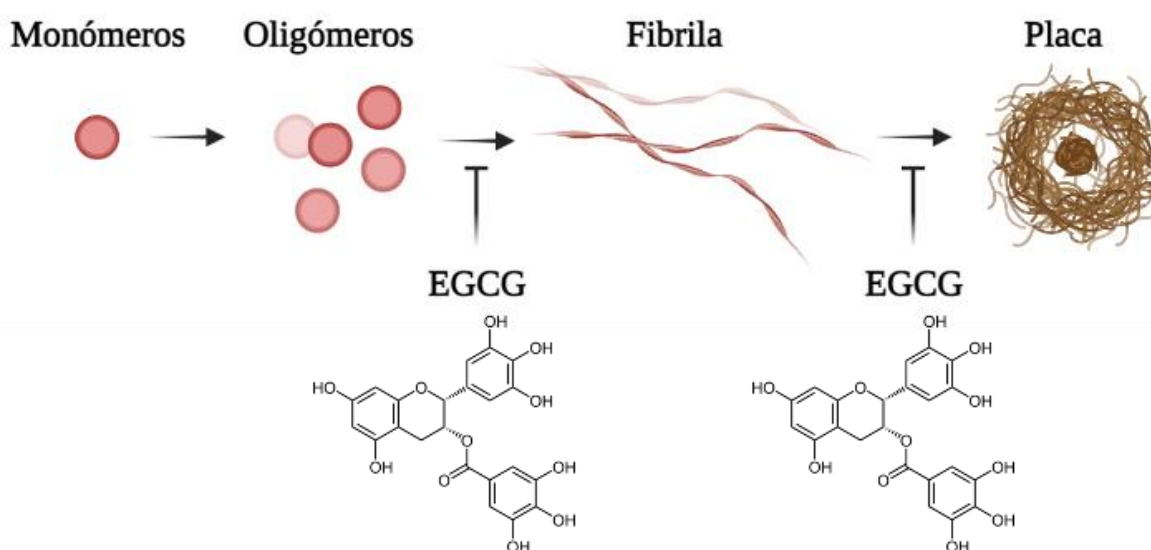


Figura 17. La EGCG y sus efectos moduladores en los agregados del β A producidos en la EA. Adaptado de [396].

Se ha reportado que los metales pueden afectar la morfología de los agregados de β A, acelerar la fibrilación y aumentar su citotoxicidad [397]. El Cu y el Fe en complejo con β A pueden

generar H₂O₂, que se puede convertir en radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton, lo que resulta en un daño celular oxidativo [136]. El tratamiento con EGCG para la acumulación de Fe en la EA ha reflejado su capacidad para regular la PPA y barrer los metales pesados, lo cual se ha relacionado con la presencia de un elemento sensible al hierro (IRE) en la región 5' no traducida (5'UTR) de la PPA [398]. La **figura 18** resume la acción neuroprotectora y neurorestauradora de la EGCG.

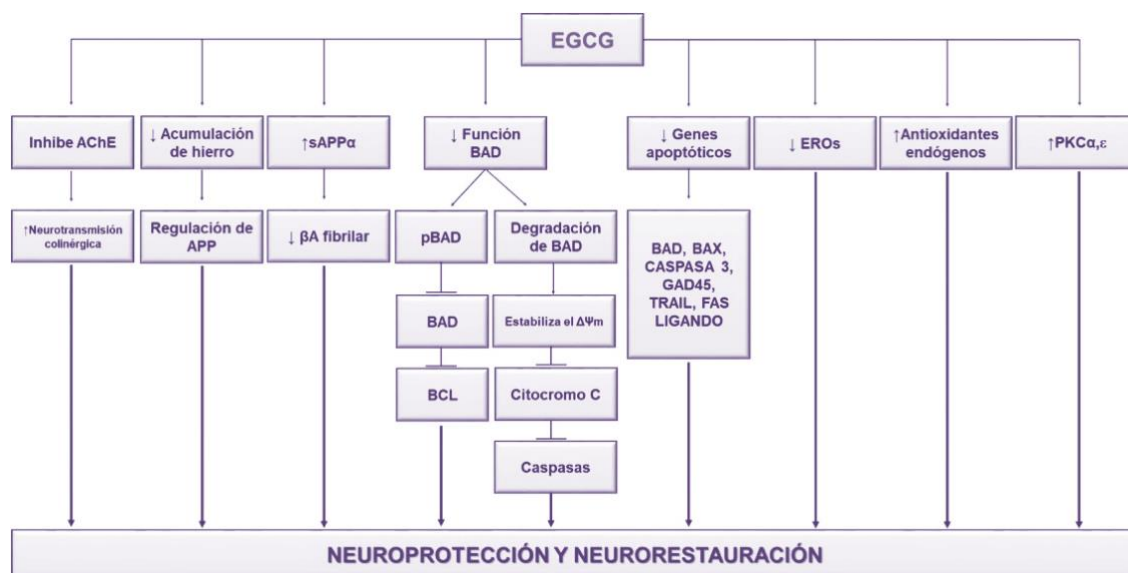


Figura 18. Principales funciones neuroprotectoras y neurorestauradoras de la EGCG. Adaptado de [370].

Estudios de acoplamiento molecular revelaron que los polifenoles interactúan con la AChE causando su inhibición. La cantidad de energía necesaria para unirse a la AChE por la EGCG fue la más baja comparada con otros polifenoles, por tanto, este estudio de acoplamiento sugiere que los polifenoles del té especialmente la EGCG actúan como inhibidor de la AChE lo que ocasiona un aumento en los niveles de acetilcolina y por tanto un aumento de la neurotransmisión colinérgica [399]. Se han propuesto tres categorías principales de los inhibidores de amiloide: moléculas de clase I, que inhiben la oligomerización de amiloide, pero no la fibrilación; moléculas de clase II, que inhiben tanto la oligomerización como la fibrilación; y moléculas de clase III, que inhiben la fibrilación, pero no la oligomerización [400]. En este sentido, se ha demostrado que la EGCG tiene el potencial de inhibir la

fibrilación del β A42 inducida por Aluminio (III) y reducir significativamente esta fibrilación del β A42 al prevenir la conversión adicional de monómeros β A42 en una conformación plegada. Al mismo tiempo, tiene la capacidad de remodelar las fibrillas preformadas, maduras y tóxicas en agregados amorfos de baja toxicidad (**Figura 17**). Además, podría considerarse que la EGCG invierte básicamente la conformación de los complejos formados entre Al (III) y β A42 para inhibir y remodelar la fibrilación β A42 [400]. Además de la capacidad del EGCG para reducir la fibrilación de β A42, también inhibe la agregación de la proteína Tau en ovillos tóxicos y al mismo tiempo remodela los oligómeros existentes a un estado monomérico desplegado para rescatar a las células neuronales de la neurotoxicidad inducida por los ovillos neurofibrilares de la proteína Tau [392]. La administración de EGCG en ratones transgénicos de Alzheimer reguló el perfil de Tau y suprimió notablemente las isoformas de Tau fosforiladas [401]. Esta depuración de las isoformas de Tau fosforilada se produjo de una manera muy específica a través de la expresión de las proteínas adaptadoras de autofagia NDP52 y p62 [402]. Asimismo, la administración oral a largo plazo de EGCG también mostró una mejora significativa en la capacidad de aprendizaje cognitivo espacial en ratas [401]. Por lo tanto, estos estudios demuestran la capacidad del EGCG para reducir la toxicidad de β A y Tau e inhibir la apoptosis, lo que demuestra su potencial para la prevención de la EA.

4.5. La melatonina o N-acetil-5-metoxi-triptamina (aMT) como alternativa terapéutica en la EA

4.5.1. Definición y estructura

La N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina, fue aislada e identificada en el año 1958, a partir de pinealocitos bovinos, por el dermatólogo americano Aaron Lerner y sus colaboradores, quienes basaron sus estudios en los trabajos realizados en 1917 por McCord y Allen (Lerner y cols., 1958). Esta indolamina es una molécula derivada de la serotonina, evolutivamente muy conservada y ubicua, por lo que está involucrada en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos. Está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoos, invertebrados y vertebrados incluyendo al hombre . Su síntesis ocurre a partir del aminoácido dietético L-triptófano (Trp), el cual en el interior celular es hidroxilado a nivel mitocondrial por la enzima triptófanohidroxilasa (TPH), dando como producto de esta

reacción el 5-hidroxitriptófano (5- HTP) que en el citosol se transforma en 5-hidroxitriptamina o serotonina, por efecto de la actividad de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC). Luego de estas reacciones, la serotonina sufre un proceso de acetilación por la arilalquilamina-Nacetiltransferasa (AANAT) dando lugar a la formación de la N-acetilhidroxitriptamina, metabolito que es O-metilado por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) produciendo finalmente la N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina [403].

4.5.2. Funciones de la aMT

La aMT tiene una serie de funciones fisiológicas, que incluyen la regulación de los ritmos circadianos, la eliminación de radicales libres, la mejora de la inmunidad y, en general, la inhibición de la oxidación de biomoléculas. La melatonina disminuida en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) y conduce a la pérdida del ritmo diurno se observan en pacientes con EA [404]. Además, el nivel de melatonina en el LCR disminuye con la progresión de la neuropatología de la EA, según lo determinan las etapas de Braak [405]. Los niveles de melatonina tanto en el líquido cefalorraquídeo como en la glándula pineal humana *post mortem* ya están reducidos en sujetos con EA preclínica, aunque todavía estén cognitivamente intactos y solo presenten los primeros signos de la neuropatología de la enfermedad [405]. Existe una correlación positiva entre el contenido pineal y el nivel de melatonina en el LCR y entre el LCR y los niveles de melatonina en plasma [404], lo que sugiere que un nivel reducido de melatonina en el LCR puede servir como un marcador temprano para las primeras etapas de la EA. En los mamíferos, la melatonina ejerce algunas de sus funciones a través de dos receptores de membrana específicos de alta afinidad, el receptor de melatonina 1 (MT1) y el receptor de melatonina 2 (MT2). Se ha informado una disminución de la inmunorreactividad de MT2 y un aumento de la inmunorreactividad de MT1 en el hipocampo de pacientes con EA [406]. También se ha comprobado que el ARNm del receptor β 1-adrenérgico ha desaparecido, y que la actividad y la expresión génica de la monoaminoxidasa (MAO) aumentaron en pacientes con EA, lo que sugiere que la desregulación de las inervaciones noradrenérgicas y el agotamiento de la serotonina, el precursor de la melatonina (aMT), podría ser el responsable de la pérdida del ritmo de la aMT y la reducción de los niveles de aMT en la enfermedad [407]. Es por ello que se ha sugerido que la suplementación con melatonina mejora el ritmo circadiano, por ejemplo,

disminuyendo el comportamiento agitado, la confusión y el "atardecer", y para producir efectos beneficiosos sobre la memoria en pacientes con EA [408]. Por lo tanto, la suplementación con melatonina, con su marcada baja toxicidad, puede ser una de las posibles estrategias para el tratamiento sintomático.

4.5.3. La aMT como agente terapéutico en la EA

La inhibición de la hiperfosforilación de Tau es un objetivo en el tratamiento de la EA. Ha sido reportado que la aMT atenúa de manera eficiente la hiperfosforilación de Tau inducida por toxinas en células de neuroblastoma N2a y SH-SY5Y [409,410]. Así mismo, se demostró además que la melatonina redujo significativamente la hiperfosforilación de Tau provocada por wortmannin, isoproterenol y caliculina en ratas [411-413]. Con respecto a los mecanismos subyacentes al efecto inhibitorio de la aMT sobre la hiperfosforilación de Tau, se ha demostrado que el tratamiento con aMT no solo inhibió la activación de la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3) inducida por wortmanina, la activación de la proteína cinasa A (PKA) inducida por isoproterenol y la inactivación de la proteína fosfatasa-2A (PP-2A) inducida por Caliculina, sino que también antagonizó el EO inducido por estos agentes.

Con el fin de explorar si una disminución de la melatonina induciría la alteración de la fosforilación de Tau, se han realizado procedimientos de interrupción de la biosíntesis de melatonina mediante una inyección cerebral de haloperidol, un inhibidor de la 5-hidroxiindol- O -metiltransferasa (una enzima clave en la síntesis de melatonina) en ratas [414]. Con estos ensayos se ha encontrado que la inhibición de la biosíntesis de melatonina no solo resultó en un deterioro de la memoria espacial en ratas, sino que también indujo un aumento en la fosforilación de Tau con una disminución concomitante en la actividad de PP-2A. Sumado a estos hallazgos, la suplementación con melatonina mediante una inyección previa durante una semana y el refuerzo durante el período de administración de haloperidol, mejoraron significativamente los déficits de retención de la memoria, detuvieron la hiperfosforilación de Tau y el EO [414].

Se ha indicado que la melatonina inhibe los niveles normales de secreción de PPA soluble (sAPP) en diferentes líneas celulares al interferir con la maduración completa de la PPA [415].

Además, la administración de melatonina redujo eficazmente la generación y el depósito de β A tanto *in vitro* como *in vivo* [416,417]. También se ha demostrado que la melatonina reduce la generación de β A en células N2a de neuroblastoma de ratón que poseen la mutación APP695 [418]. Estudios realizados en modelos de ratones de la EA de diferentes edades (4 y 14 meses de edad) muestran resultados interesantes con respecto al efecto de la aMT. En este sentido, mientras que en los estudios de Matsubara y cols. en el que se utilizó el modelo de ratón transgénico Tg2576 (en el que la patología de la placa amiloide suele aparecer en de 10 a 12 meses de edad [128]), el tratamiento con aMT se inició cuando los ratones tenían cuatro meses de edad (antes de la aparición de placas hipocampales y corticales), Quinn y cols. Iniciaron sus ensayos a los 14 meses de edad. Interesantemente, ambos estudios coinciden en encontrar poca evidencia de los potentes efectos antioxidantes de la melatonina en los ratones más viejos. Estos hallazgos indican que la melatonina tiene la capacidad de regular el metabolismo de la PPA y prevenir la patología de β A, pero no ejerce efectos antiamiloides o antioxidantes cuando se inicia después de la deposición de β A. Este resultado contrasta con la disminución de β A en ratones de tipo silvestre tratados con melatonina y la reducción de β A y nitración de proteínas en ratones Tg2576 tratados con melatonina [417,419].

Se ha demostrado que la melatonina puede interactuar con el β A40 y β A42 e inhibir la formación progresiva de láminas β y/o fibrillas de amiloide [420]. El efecto antifibrilogénico de la melatonina se ha demostrado mediante diferentes técnicas, que incluyen espectroscopia de dicroísmo circular, microscopía electrónica y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) [421]. Además, la interacción entre la melatonina y el β A parece depender de sus características estructurales, más que de sus propiedades antioxidantes, ya que no puede ser reproducida por los análogos de la melatonina u otros captadores de radicales libres [420]. La evidencia derivada de ESI-MS demostró que hubo una interacción hidrofóbica entre el β A y la melatonina, y las investigaciones proteolíticas sugirieron que la interacción tuvo lugar en los residuos 29–40 del segmento β A [421]. Igualmente, los resultados de la espectroscopia de RMN confirmaron además una interacción específica de residuos entre la melatonina y cualquiera de los tres residuos de histidina y aspartato del β A [422], fundamentales para la formación de las estructuras de la hoja β del amiloide, por lo que la interrupción de estos

puentes salinos promueve la disolución de las fibrillas. Por otra parte, la melatonina podría promover la conversión de láminas β en espirales aleatorias al interrumpir los puentes salinos de carboxilato de imidazol y prevenir la fibrilógenesis y agregación del β A. Por lo tanto, es posible que al bloquear la formación de la conformación de hoja β secundaria, la melatonina no solo reduzca la neurotoxicidad, sino que también facilite la eliminación del péptido a través de una mayor degradación proteolítica [215].

Es bien sabido que el tratamiento con el β A provoca un espectro de daño celular, que incluye aumentos en la peroxidación lipídica y la concentración de calcio libre intracelular, daño oxidativo en el ADN mitocondrial y la aparición de marcadores apoptóticos [423,424]. Las mitocondrias no solo son el sitio principal de generación de EROs, sino también su principal objetivo. En este contexto se ha identificado que la melatonina estabilizaba la fluidez de las membranas internas mitocondriales debido a su interacción directa con ellas [425]. Además de que el β A cause EO por sí mismo, se ha propuesto que el daño oxidativo podría exacerbar un círculo vicioso, en el que el procesamiento amiloidogénico de la PPA se facilitaría aún más para generar más β A, lo que, a su vez, aumenta el EO [426]. En este sentido, diferentes reportes indican que la melatonina protege eficazmente a las células contra el daño oxidativo inducido por β A y la muerte celular *in vitro* e *in vivo* [427,428]. En células y animales tratados con β A, la melatonina ejerce su actividad protectora principalmente a través de un efecto antioxidante, mientras que en células transfectadas con PPA y modelos animales transgénicos, el mecanismo subyacente se atribuye no solo a su propiedad antioxidante, sino también a su propiedad anti-amiloide. incluyendo la inhibición tanto de la generación de β A como de la formación de láminas β y/o fibrillas de amiloide (**Figura 19**).

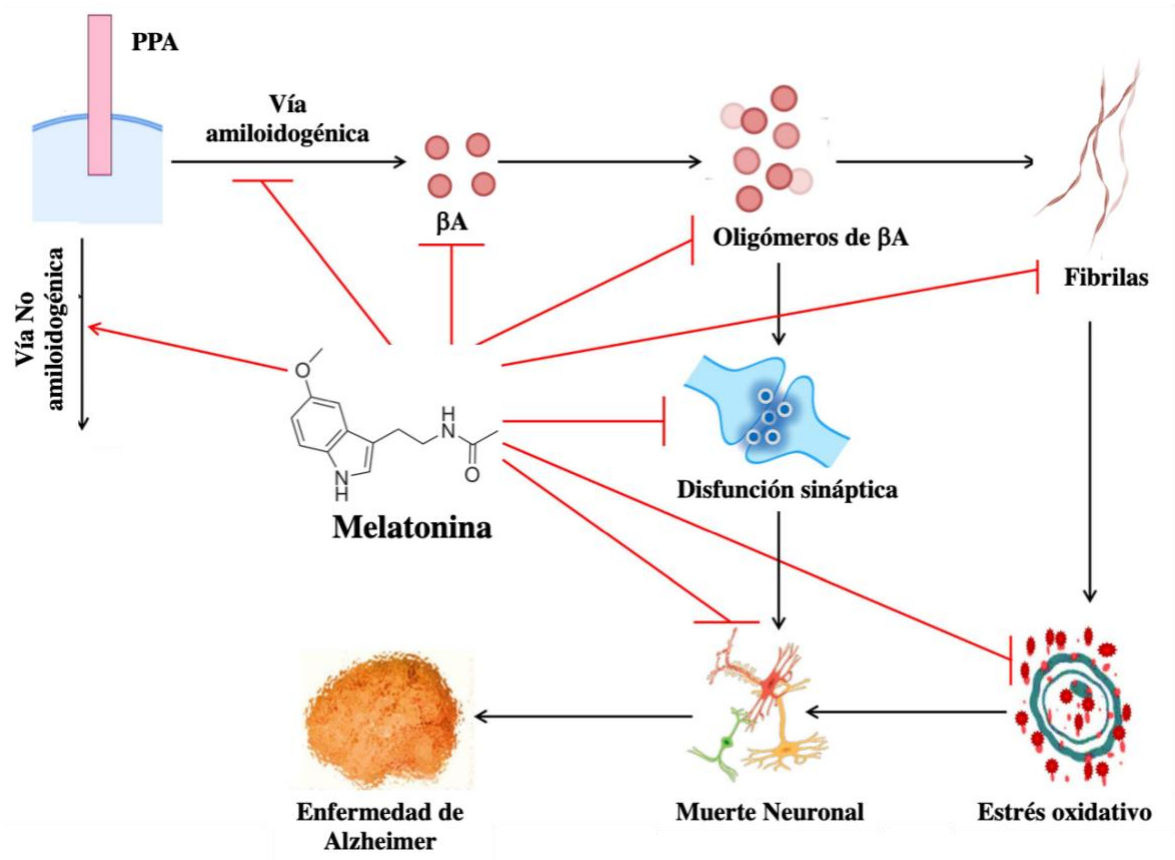


Figura 19. Principales funciones neuroprotectoras de la aMT. Adaptado de ref. [428]

CAPÍTULO 5: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EA (MIM #104300) es el trastorno neurodegenerativo de mayor prevalencia en el mundo [429], para el cual, hasta la fecha no existe una terapia curativa [144,430]. En Colombia y especialmente en el departamento de Antioquia se ha identificado el grupo más grande de personas con EAF o genética de inicio temprano (<40 años), que incluye 25 familias de 5.000 miembros, de los cuales, alrededor de 2.000 portan la mutación E280A en el gen de la *PSEN1*. Esta enfermedad neurodegenerativa de carácter hereditario, se manifiesta con deterioro cognitivo y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria paralela a una muerte neuronal en diferentes áreas del cerebro [12,431-433] y tiene una duración aproximada de 10 años posterior al diagnóstico [15]. Por consiguiente, esta demencia representa una alta carga social y económica para las familias de los pacientes que la padecen, para el departamento y para el país en general, por lo que la OMS ha resaltado su impacto dramático en países de ingresos medianos y bajos, en los que se concentra el 60% de la carga económica de esta enfermedad [142].

Por lo anterior, el estudio de la EAF es relevante para el departamento de Antioquia, en donde se encuentra uno de los grupos poblacionales genéticos más grandes del mundo de esta enfermedad, que se concentran principalmente en los municipios de Angostura, Yarumal, Dabeiba, Liborina, Sopetrán, Donmatías, Olaya y Medellín. La EAF que afecta a la población antioqueña es una forma clínica temprana que se presenta con pérdida de memoria desde los 40 años lo cual resulta preocupante, porque los individuos están en edad productiva [15]; y aún más alarmante, porque la enfermedad tiene una penetrancia del 100% en donde los hijos de una persona afectada tienen el 50% de riesgo de padecerla [143]. La principal causa de esta forma clínica temprana de la EAF es la mutación E280A en el gen de la *PSEN1* ubicado en el cromosoma 14, que codifica para la proteína PSEN1, la cual fue descubierta en 1995 por un equipo de investigadores del grupo de neurociencias de la Universidad de Antioquia (GNA), quienes la denominaron “La mutación paisa” [431]. Esta mutación aumenta en el cerebro de los pacientes la forma altamente tóxica del péptido β A de 42 aminoácidos comparado con el β A de 40 residuos [434]. La acumulación de β A42 en la EAF se asocia con pérdida neuronal en áreas del cerebro involucradas en el lenguaje, la memoria y habilidades cognitivas e histopatológicamente se caracteriza por 4 marcadores: i) las placas seniles

compuestas por péptido β A42 en la corteza cerebral, ii) ovillos neurofibrilares intracelulares, iii) pérdida progresiva de neuronas colinérgicas del hipocampo y iv) gliosis [12,433]. Todos estos hallazgos neuropatológicos involucran el EO, que finalmente conduce a la muerte neuronal [127].

Se considera que hubo un efecto fundador en el cual esta mutación fue traída por un pequeño grupo poblacional que se estableció y expandió por todo el departamento de Antioquia el cual fue considerado por muchos años como un aislado genético, lo que favoreció la concentración de este problema de salud pública en el departamento [435]. Es muy importante enfatizar que las personas afectadas por la EAF en Antioquia empiezan a padecer los signos clínicos a muy temprana edad, por lo que estos casos se suman a los casos de morbilidad y mortalidad por EA en Colombia y constituyen un alto costo para las familias y los sistemas de salud. Aunque se han realizado numerosos ensayos clínicos para buscar tratamientos efectivos para la EAF, sus resultados han sido fallidos y desalentadores [436,437]. Esto puede deberse a que hasta el presente se desconocen las causas exactas y los mecanismos de señalización que conducen a la muerte neuronal en condiciones de estrés, y a la carencia de un modelo que permita recapitular el mecanismo de muerte neuronal inducido por la sobreproducción endógena del β A en pacientes PSEN1-E280A y que así mismo, permita evaluar nuevas estrategias terapéuticas efectivas para detener el desarrollo de la EAF. En este contexto, en los últimos años se ha establecido que moléculas con potencial efecto antioxidante como los cannabinoides (v. gr. CP55940) [358], las EGCG [438] y la melatonina pueden tener un efecto neuroprotector en la EA; sin embargo, su efecto no ha sido evaluado aún en un modelo de EAF con la mutación PSEN1 E280A en un modelo con la arquitectura bidimensional (2D), ni mucho menos en estructuras tridimensionales (3D) del tipo esferoide cerebral u organoide. Por lo tanto, este trabajo de investigación se plantea y se fundamenta en la búsqueda de respuestas a las siguientes preguntas de investigación:

¿Podrían las neuronas colinérgicas derivadas de las CME de cordón umbilical y sangre menstrual con la mutación PSEN1 E280A reproducir la neuropatología de la EAF en Antioquia en un modelo 2D y 3D? Adicionalmente, ¿El tratamiento con las moléculas

CP55940, la EGCG y la aMT reduciría la neuropatología en estos modelos de estudio con la mutación PSEN1 E280A?

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA HIPÓTESIS Y LOS OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

6.1. Hipótesis

Las neuronas colinérgicas derivadas de las CME de cordón umbilical y de sangre menstrual con la mutación PSEN1 E280A reproducen la neuropatología de la EAF que se presenta en el departamento de Antioquia en modelos 2D y 3D, y el tratamiento con las moléculas CP55940, la EGCG y la aMT previene la neuropatología de la EA en dichos modelos.

6.2. Objetivos

6.2.1. Objetivo General

Generar y caracterizar cultivos 2D y 3D para el estudio neuropatológico y la evaluación de terapias alternativas para la EAF (PSEN1 E280A)

6.2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípica y bioquímicamente un modelo 2D de neuronas colinérgicas derivadas de CME de CU con la mutación PSEN1 E280A de la EAF.
2. Caracterizar fenotípica y bioquímicamente un modelo 2D de neuronas colinérgicas derivadas de CME de SM con la mutación PSEN1 E280A de la EAF.
3. Evaluar los efectos neuroprotectores de las moléculas antioxidantes CP55940 y EGCG en el modelo 2D de la EAF PSEN1 E280A en función de los niveles de los marcadores neuropatológicos.
4. Generar y caracterizar fenotípica y bioquímicamente un modelo 3D de esferoides cerebrales generados a partir de CME PSEN1 E280A.
5. Evaluar los efectos neuroprotectores de los compuestos EGCG, Melatonina en los esferoides cerebrales PSEN1 E280A en función de los niveles de los marcadores neuropatológicos.
6. Proponer el mecanismo de neuroprotección del compuesto con mayor potencial terapéutico de los evaluados previamente en el modelo 2D y los esferoides cerebrales PSEN1 E280A como prospecto terapéutico en la EAF.

CAPÍTULO 7. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO NEURONAL COLINÉRGICO 2D DERIVADO DE CME PSEN1 E280A PARA EL ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA EAF Y LA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS

7.1. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO NEURONAL COLINÉRGICO 2D DERIVADO DE CME PSEN1 E280A PARA EL ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA EAF

7.1.1. Introducción, véase: 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 β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. PLoS One. 2020;15(5):e0221669. doi: 10.1371/journal.pone.0221669.

7.1.2. Materiales y métodos, véase: 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 β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. PLoS One. 2020;15(5):e0221669. doi: 10.1371/journal.pone.0221669.

7.1.3. Resultados, véase: 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 β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. PLoS One. 2020;15(5):e0221669. doi: 10.1371/journal.pone.0221669.

7.1.4. Discusión, véase: 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 β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. PLoS One. 2020;15(5):e0221669. doi: 10.1371/journal.pone.0221669.

7.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MOLÉCULAS EN EL MODELO 2D DE LA EAF

7.2.1. EFECTO DEL CANNABINOIDE CP55940 EN EL MODELO 2D DE LA EAF

7.2.1.1. Introducción, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S359-S378. doi: 10.3233/JAD-201045.

7.2.1.2. Materiales y métodos, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S359-S378. doi: 10.3233/JAD-201045.

7.2.1.3. Resultados, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S359-S378. doi: 10.3233/JAD-201045.

7.2.1.4. Discusión, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S359-S378. doi: 10.3233/JAD-201045.

7.2.2. EFECTO DE LA EGCG EN EL MODELO 2D DE LA EAF

7.2.2.1. Introducción, véase Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Diminishes Intra-and Extracellular Amyloid-Induced Cytotoxic Effects on Cholinergic-like Neurons from Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A. *Biomolecules.* 2021;11(12):1845. doi: 10.3390/biom11121845.

7.2.2.2. Materiales y métodos véase Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Diminishes Intra-and Extracellular Amyloid-Induced Cytotoxic Effects on Cholinergic-like Neurons from Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A. *Biomolecules.* 2021;11(12):1845. doi: 10.3390/biom11121845.

7.2.2.3. Resultados, véase Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Diminishes Intra-and Extracellular Amyloid-Induced Cytotoxic Effects on Cholinergic-like Neurons from Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A. *Biomolecules*. 2021;11(12):1845. doi: 10.3390/biom11121845.

7.2.2.4. Discusión, véase Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Diminishes Intra-and Extracellular Amyloid-Induced Cytotoxic Effects on Cholinergic-like Neurons from Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A. *Biomolecules*. 2021;11(12):1845. doi: 10.3390/biom11121845.

CAPITULO 8. GENERACION DEL MODELO 3D (ESFEROIDES CEREBRALES) DERIVADO DE CME E280A PARA EL ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA EAF Y LA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS

8.1. OBTENCIÓN DE CME A PARTIR DE SANGRE MENSTRUAL Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL 2D Y 3D

8.1.1. Introducción, véase Quintero-Espinosa D, **Soto-Mercado V**, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6.

8.1.2. Materiales y métodos, véase Quintero-Espinosa D, **Soto-Mercado V**, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6.

8.1.3. Resultados, véase Quintero-Espinosa D, **Soto-Mercado V**, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6.

8.1.4. Discusión, véase Quintero-Espinosa D, **Soto-Mercado V**, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6.

8.2. EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS EGCG Y MELATONINA EN EL MODELO 3D DE LA EAF

8.2.1. Introducción, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Neuroprotective Effect of Combined Treatment with Epigallocatechin 3-Gallate

and Melatonin on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cerebral Spheroids Derived from Menstrual Mesenchymal Stromal Cells. *J Alzheimers Dis.* 2023 Feb 24. doi: 10.3233/JAD-220903.

8.2.2. Materiales y métodos, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Neuroprotective Effect of Combined Treatment with Epigallocatechin 3-Gallate and Melatonin on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cerebral Spheroids Derived from Menstrual Mesenchymal Stromal Cells. *J Alzheimers Dis.* 2023 Feb 24. doi: 10.3233/JAD-220903

8.2.3. Resultados, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Neuroprotective Effect of Combined Treatment with Epigallocatechin 3-Gallate and Melatonin on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cerebral Spheroids Derived from Menstrual Mesenchymal Stromal Cells. *J Alzheimers Dis.* 2023 Feb 24. doi: 10.3233/JAD-220903

8.2.4. Discusión, véase: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Neuroprotective Effect of Combined Treatment with Epigallocatechin 3-Gallate and Melatonin on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cerebral Spheroids Derived from Menstrual Mesenchymal Stromal Cells. *J Alzheimers Dis.* 2023 Feb 24. doi: 10.3233/JAD-220903.

CAPÍTULO 9. DISCUSIÓN GENERAL

La EA es una entidad clínica multifactorial que se caracteriza neuropatológicamente por depósitos extracelulares de β A en forma de placas, ovillos neurofibrilares intracelulares compuestas por Tau hiperfosforilada, disfunción mitocondrial y sináptica, EO y muerte neuronal. En un esfuerzo por explicar la interacción de todos estos factores y características neuropatológicas, se han propuesto varias teorías [439]; sin embargo, la hipótesis más aceptada en la comunidad científica es la de la cascada amiloide que ha prevalecido durante más de 25 años [18,38,440,441]. La hipótesis del β A postula que un desequilibrio en la producción de placas extracelulares de β A42 por mutaciones en al menos tres genes (v.gr. PPA, PSEN1; PSEN2) son los factores desencadenantes que modifican el inicio temprano en la EA. Sin embargo, las terapias experimentales dirigidas al β A42 hasta el momento no han tenido éxito [317,442,443]. Varios factores probablemente han contribuido a los fracasos en el desarrollo del fármaco para la EA, incluidos modelos de investigación preclínicos inadecuados que no recapitulan completamente la enfermedad humana y, por lo tanto, todavía los mecanismos de señalización de la neurodegeneración por los cuales el β A42 podría inducir toxicidad y muerte neuronal aún no son conocidos completamente, ni tampoco los blancos farmacológicos [444].

Por otro lado, teniendo en cuenta que las CME poseen propiedades de plasticidad que les permiten transdiferenciarse en linajes no mesenquimales como el ectodérmico, este modelo brinda una oportunidad única para estudiar el efecto de las mutaciones del gen de la *PSEN1*, específicamente la mutación en PSEN1 E280A en células neuronales derivadas de CME. Lo más importante e interesante es que las neuronas derivadas de estas CME son modelos naturales, no modificados genéticamente, que recrean la neuropatología de la EAF con la mutación PSEN1E280A presente en los pacientes con la EAF en Antioquia (el presente estudio) [445,446]. Es importante resaltar que hemos logrado por primera vez la caracterización y el establecimiento de un modelo CME genético natural con la mutación PSEN1 E280A, para el estudio de la neuropatología de la EAF en modelos 2D y 3D. Curiosamente se observó que la mutación no altera ninguna de las características fenotípicas ni genotípicas de las CME *per se*, como la capacidad de formación de colonias, la morfología

fibroblastoide, el inmunofenotipo y la capacidad de diferenciación o transdiferenciarse en Neuronas Colinérgicas (NCL) y de convertirse en esferoides cerebrales (EC). De igual forma, no se detectó β A42 producido endógenamente en las neuronas mutadas, ni tampoco ninguna alteración celular (como la producción de EROs, despolarización de las mitocondrias, oxidación del sensor de EO, (DJ-1). Estas observaciones sugieren que la mutación E280A de PSEN1 podría no afectar la fisiología de las células madre multipotentes en esta etapa de desarrollo. Sin embargo, las NCL y los EC derivados de CME mutadas PSEN1-E280A, mostraron cambios neuropatológicos evidentes típicos de la EAF como acumulación intracelular de péptidos amiloides, fosforilación de Tau, secreción aumentada de β A42, aumento de EROs, de marcadores de EO, de apoptosis y alteración neuronal funcional. Interesantemente estos hallazgos evidenciaron la recapitulación de las características patológicas típicas de la EA luego de 4 días post-transdiferenciación (es decir, 11 días después de haberse iniciado el proceso) para las NCL y tan temprano como a los 4 días de instaurarse el protocolo de formación de EC, validando estos modelos como plataformas de tamizaje para la instauración de tratamientos en etapas tempranas previas a la aparición de los marcadores neuropatológicos de la EA en portadores de la mutación, destacándose el uso de EC si se requiere la evaluación en un menor tiempo. Además, las NCL y los EC PSEN1 E280A no solo mostraron marcadores de apoptosis, sino que también mostraron disregulación del flujo de Ca^{2+} y alteración de la actividad de la acetilcolinesterasa. Nuestros datos proporcionan evidencia de que la acumulación intracelular de productos de la PPA inducen neurotoxicidad, específicamente, a través de un orden temporal y secuencial de eventos moleculares en las neuronas PSEN1 E280A.

Más específicamente, en nuestro trabajo encontramos una acumulación intracelular del fragmento beta soluble de la APP (sAPP β f) en las NCL el día 7 posterior a la incubación de las CME con medio de Cholinergic-N-Run y en los EC 4 días después de la incubación en el medio Fast-N-Spheres V2. En este contexto es difícil determinar si el péptido intracelular se acumuló porque la porción generada no se secretó y, por lo tanto, permaneció intracelular, o si, por el contrario, el sAPP β f secretado fue absorbido por la célula para formar acúmulos intracelulares. Sin embargo, previamente se había demostrado que las mutaciones en PSEN1 L166P y G384A causaron la re-localización de la γ -secretasa, lo que promovió

significativamente la generación de productos amiloides de alto peso molecular, de manera intracelular [447]. Aunque no se sabe con certeza si la mutación PSEN1 E280A induce la relocalización de la γ -secretasa de manera similar a estas otras mutaciones en PSEN1, nuestros datos sugieren que la mutación PSEN1 E280A aumenta drásticamente los niveles del sAPP β f intraneuronal en las NCL y en los EC (en los que no se detectaron especies de β A de alto peso molecular como fibrillas y placas). En conjunto, interesantemente estos resultados apoyan la tesis de que la acumulación intracelular de subproductos de la proteólisis de la PPA, es uno de los eventos más tempranos y desencadenantes en el desarrollo de los cambios neuropatológicos de la EA [448,449] (**Figura 20**), contrastando con una de las hipótesis más defendidas en el ámbito médico y en la que se enfocan la mayoría de estudios clínicos en búsqueda de medicamentos: es el β A extracelular quien genera principalmente la afectación neuronal en la EA [35].

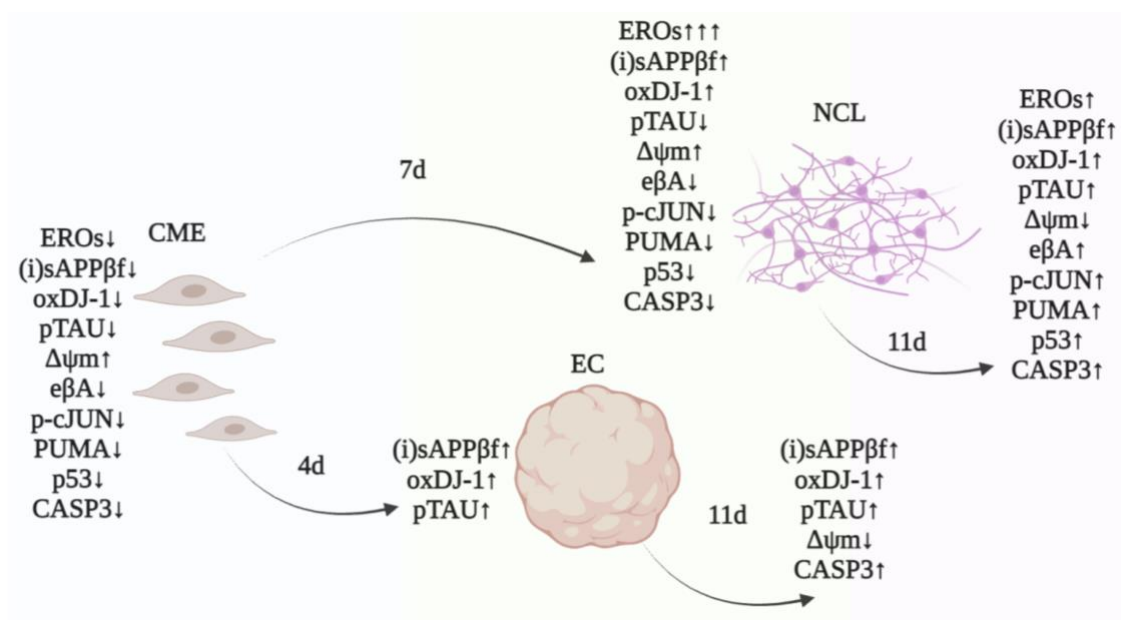


Figura 20: Hallazgos histopatológicos de la EA obtenidos de cultivos 2D y 3D producidos a partir de CME de pacientes con EAF PSEN1-E280A.

Es interesante también que paralelamente, en el modelo 2D y 3D se observó un aumento significativo de las células positivas para la fluorescencia de la DCF (evaluada solamente en 2D) y de reactividad para DJ-1 oxidado, indicativo de la producción de EROs, específicamente de H₂O₂, como lo revela la oxidación específica de DJ-1 Cys106-tiol (DJ-1

Cys106SOH) en DJ-1 Cys106-sulfonato (DJ-1 Cys106SO₃), que es el grupo tiol más sensible de esta molécula a la reactividad con el H₂O₂ [450], y la activación del factor de transcripción c-JUN en las NCL PSEN1 E280A. Estas observaciones sugieren que la secuencia sAPPβf y/o βA >H₂O₂>oxDJ-1Cys106-SO₃/p-c-JUN son los primeros eventos patológicos detectables en las NCL PSEN1 E280A. Estos hallazgos implican que el sAPPβf puede desencadenar eventos relacionados con el EO y la muerte celular [140]. Pero aún queda el interrogante de ¿Cómo el sAPPβf y/o el βA intracelular genera H₂O₂? Se ha sugerido que el βA42 genera neurotoxicidad a través de varios mecanismos, incluidos los mecanismos de óxido-reducción de las reacciones de transferencia de radicales libres, a través de la oxidación del átomo de azufre del residuo de metionina 35 de su estructura, para reducir el dioxígeno (O₂) en un radical superóxido aniónico (O₂⁻), que a su vez se descompone en H₂O₂; Así mismo, el complejo βA42+metal (por ejemplo, Cu₂⁺, Cu₁⁺, Fe₂⁺) cataliza la formación y producción de EROs (por ejemplo, H₂O₂) [451], o también, el βA42 podría hacerlo a través del ataque a las mitocondrias [452]. Independiente de cuál sea cualquier mecanismo que este actuando, hemos podido demostrar por primera vez que el βA42 produce de forma endógena H₂O₂ en NCL PSEN1 E280A. Dado que el H₂O₂ puede funcionar como un segundo mensajero [453], también puede activar otras proteínas redox como la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK-1 [454]), que a su vez directa o indirectamente activa otras vías de señalización, por ejemplo, JNK/ c-JUN [455,456]. En este sentido, encontramos que βA42 indujo la fosforilación de c-JUN [457], la activación de p53 y PUMA en las NCL PSEN1 E280A de acuerdo con el análisis de Western blot y el análisis de microscopía fluorescente. En particular, la apoptosis dependiente de c-JUN y p53 se desencadena por la transactivación del gen pro-apoptótico PUMA [458-460]. Así mismo, JNK también puede estabilizar y activar p53 [461]. En conjunto, estos resultados sugieren que el βA42>H₂O₂ activa una cascada de eventos que conducen a la ruta de activación de JNK>c-JUN, p53>PUMA. Aunque se ha demostrado que PUMA coopera con las proteínas activadoras directas (p. ej., BAX) para promover la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MEM) y la apoptosis [462], el mecanismo exacto por el cual se produce la alteración de la MEM no se comprende completamente [463].

Sin embargo, de manera interesante, encontramos que las NCL y los EN PSEN1 E280A muestran pérdida del $\Delta\Psi_m$, concomitantemente con la sobreexpresión de CASP3 y la fragmentación de los núcleos (TUNEL) en el día 4 y 11 después de la transdiferenciación a NCL y EN. Estas observaciones sugieren que las mitocondrias desempeñan un papel importante en la apoptosis inducida por el $\beta A42$ intracelular en las neuronas mutantes. Sin embargo, aún es incomprendible si la disfunción del $\Delta\Psi_m$ es consecuencia de un efecto directo del sAPP β f o del $\beta A42$ intracelular en esta organela [452,464], o si el daño es el resultado del impacto de PUMA en la mitocondria. Nuestros hallazgos sugieren que sAPP β f/ $\beta A42$ / PUMA podrían por si solas o en conjunto promover el daño del $\Delta\Psi_m$. En conjunto, estos datos indican que el sAPP β f/ $\beta A42$ indujo una cascada de eventos en las NCL PSEN1 E280A a través de la vía de señalización de H_2O_2 , la participación de la CASP-3 como proteína ejecutora final, y la fragmentación del ADN. Estos datos son compatibles con la idea de que la acumulación intraneuronal del péptido sAPP β f/ $\beta A42$ es el primer paso de una cascada irreversible de muerte en las neuronas de personas con EA familiar [465].

Por otra parte las neuronas mutadas también presentaron alteraciones funcionales, en este sentido, se ha propuesto que la disfunción de la homeostasis neuronal Ca^{2+} tiene un papel crucial en la progresión de la EA [466,467]. Sin embargo, los mecanismos de desregulación de Ca^{2+} no están claros. En contraste con Demuro y Parker [468] que encontraron que los oligómeros de $\beta A42$ intracelular interrumpen la regulación celular de Ca^{2+} , no observamos ninguna desregulación de Ca^{2+} en las NCL PSEN1 E280A evaluadas a los 0 y 4 días posteriores a la diferenciación. Esta discrepancia puede explicarse por diferencias en la metodología experimental. Mientras que estos autores dilucidaron las acciones de $\beta A42$ intracelular mediante la obtención de imágenes de las respuestas de Ca^{2+} a las aplicaciones de oligómeros de $\beta A42$ en los ovocitos de *Xenopus*, nosotros obtuvimos una imagen directa de las respuestas de Ca^{2+} al sAPP β f/ $\beta A42$ intracelular generado de forma endógena en las NCL mutantes. Se concluye que, al menos en las presentes condiciones experimentales, el sAPP β f/ $\beta A42$ intracelular no afectó el flujo de Ca^{2+} en las neuronas PSEN1 E280A. La evidencia creciente ha demostrado que el $\beta A42$ extracelular interactúa específicamente con los nAChR que dan como resultado una desregulación del Ca^{2+} [64,469]. En este sentido,

encontramos que la respuesta de las neuronas PSEN1 E280A a la ACh se redujo significativamente a los 4 días de la postdiferenciación en el modelo 2D y a los 11 días de diferenciación de los EC. Cabe destacar que se ha demostrado que β A afecta directamente a la función de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ de la ACh (n7 nAChRs) actuando como un agonista (~100 nM) y un modulador negativo (en concentraciones altas) [470]. De acuerdo con este punto de vista, confirmamos que las neuronas PSEN1 E280A secretaron cantidades aberrantes de β A42 comparadas con las silvestres o WT. Estas observaciones confirman que la sobreproducción de β 42 extracelular es una característica primordial de la mayoría de las mutaciones en PSEN1 *in vitro* e *in vivo* [471,472], incluida la mutación E280A [234]. A pesar de esto, se requiere más investigación para determinar si específicamente los nAChRs $\alpha 7$ se ven afectados en las neuronas PSEN1 E280A. En contraste con Serra-Batiste y cols. Y Kandel y cols. [473,474], nuestras observaciones no apoyan la opinión común de que el β A extracelular es capaz de aumentar el flujo de Ca^{2+} neuronal a través de los poros que forma el β A42. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que, dado un mayor tiempo de incubación, el β A42 terminará afectando el flujo de Ca^{2+} a través de poros formados en las neuronas PSEN1 E280A. En conjunto, nuestros datos sugieren que el β A42 extracelular podría unirse a los nAChRs en las células PSEN1 E280A, afectando el flujo de Ca^{2+} neuronal.

La acumulación de Tau hiperfosforilada en neuronas conduce a la degeneración neurofibrilar en la EA [23,24,475]. La creciente evidencia sugiere que la patogénesis de Tau es promovida por el β A42 [476,477]. En línea con esto, encontramos que las neuronas PSEN1 E280A mostraron hiperfosforilación de la proteína Tau. De hecho, las NCL PSEN1 E280A aumentaron significativamente la relación p-Tau/ t-Tau en comparación con las WT luego de 4 días posteriores a la transdiferenciación y tan temprano como a las 4 días de formación de los EN. Estas observaciones implican que la señalización del sAPP β / β A42 precede a la fosforilación de Tau [477-479]. Además, estos hallazgos complementan la idea de que la acumulación intraneuronal temprana de sAPP β / β A42 afecta la patología de Tau [448,465]. Sin embargo, el enlace molecular entre β A42 y Tau aún no está completamente definido. De acuerdo con Ma y colaboradores [480], nuestros datos sugieren que JNK es una quinasa candidata a estar fuertemente implicada en la hiperfosforilación de Tau en las NCL PSEN1 E280A. Esta propuesta es apoyada por el hecho de que JNK fosforila a Tau en las Ser202/

Thr205 [481], dos epítopes de fosforilación identificados en el presente estudio. Dado que JNK desempeña un papel fundamental involucrado tanto en la apoptosis inducida por EROs, como en la fosforilación de Tau, estos hallazgos identifican a JNK como un posible blanco terapéutico [482]. Aunque no descartamos la posibilidad de que otras quinasas estén implicadas en la patología de Tau [483-485], por lo que nuestros hallazgos sugieren que JNK desempeña un papel clave en la hiperfosforilación de Tau en NCL PSEN1 E280A. Es de destacar que los modelos 2D y 3D derivados de CME no solo replican la fisiopatología de la EA, es decir, la acumulación intracelular de sAPP β f/ β A42 y la fosforilación de Tau, similar a lo previamente reportado en el modelo de iPSCs con mutaciones en *PSEN1* [486], sino que también replican el fenotipo de la agregación intracelular de β A42 y EO en iPSCs como modelo de EA [232,487]. Por lo tanto, las neuronas PSEN1 mutantes derivadas de CME deben considerarse equivalentes o similares a las neuronas PSEN1 derivadas de iPSCs. Además, nuestros resultados sugieren que las alteraciones neurales inducidas por la mutación PSEN1 E280A podrían preceder a la deposición de β A42 extracelular, y que esas alteraciones surgen por el efecto de la toxicidad intracelular de productos de la PPA. Incluso, dichas alteraciones moleculares pueden comenzar cuando las neuronas se convierten en neuronas de tipo colinérgico (modelo 2D), o incluso en el nacimiento (modelo 3D). Estos hallazgos pueden explicar por qué los cambios cerebrales funcionales y estructurales se manifiestan en niños (9-17 años) y en individuos jóvenes (18-26 años) portadores de la mutación E280A de la PSEN1 [89,488]. Además, estos datos sugieren que la toxicidad intracelular del sAPP β f/ β A42 es un proceso temprano y lento que podría ir deteriorando las células neuronales en una forma dependiente de la producción de EO, declive del $\Delta\Psi_m$, aumento de la apoptosis y desregulación intraneuronal de Ca^{2+} e independiente, en sus inicios de la proteína Tau. Estos hallazgos sugieren que todos estos procesos neurodegenerativos inician muy tempranamente, aproximadamente 20 años, o inclusive desde el nacimiento del individuo, antes de la etapa de la demencia [15,489].

Es bien conocido que el EO juega un papel muy importante en los procesos neuropatológicos de la EA. En este contexto, se han propuesto los cannabinoides como potentes moléculas antioxidantes para el tratamiento de la EA [365]. Estudios previos *in vitro*, demostraron que

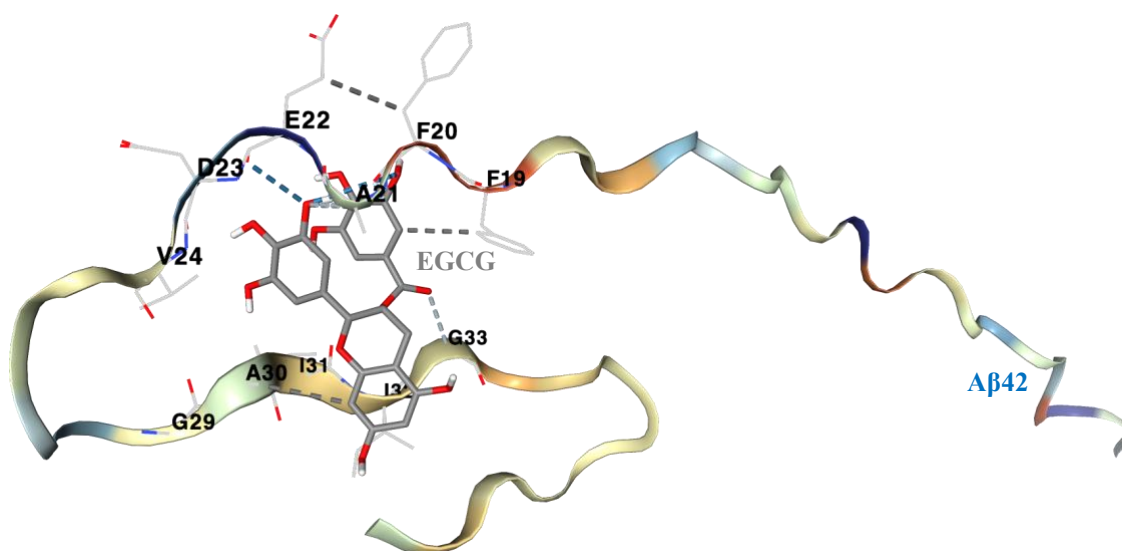
los cannabinoides sintéticos CP55940 y JWH-015 redujeron el EO generado por el péptido β A25-35 y revertieron los procesos de muerte de forma independiente de sus receptores. De manera similar, nuestro estudio demostró que el cannabinoide sintético CP55940 libre disminuyó la producción intrínseca de EROs en las NCL PSEN1 E280A, al reducir la positividad para DCF. Estos resultados, sumados a otros publicados anteriormente [490] coinciden con el potencial efecto antioxidante de esta molécula. Un hecho que confirma esta hipótesis es que el tratamiento con esta molécula, en presencia y ausencia de agonistas inversos de los receptores CB1 y CB2, redujo significativamente los niveles de la proteína DJ-1 Cys106-SO3, indicando un potencial efecto directo del CP55940 como barredor de H_2O_2 . Así mismo, el CP55940 protegió a las NCL PSEN1 E280A a lo largo de 4 días posteriores a la diferenciación, estabilizando su $\Delta\Psi_m$ mitocondrial. En este sentido, hemos evidenciado en estudios en mitocondrias aisladas de cerebro de ratas que el CP55940 puede actuar como un protector directo de la mitocondria de manera independiente de receptores, probablemente, evitando la apertura del poro mitocondrial [491]. Por otro lado, se ha comprobado que otros cannabinoides como la anandamida ejerce un potente efecto protector frente a la toxicidad inducida por el β A en líneas neuronales humanas de manera dependiente del receptor CB1 (receptor del que también el CP55940 es agonista) a través de la ruta de las MAP-quinasas [492]. De manera interesante, en los últimos años se ha demostrado que los receptores CB1 también están presentes funcionalmente, intraneuronalmente y específicamente en las mitocondrias cerebrales (mtCB1); y que la activación aguda de estos mtCB1 altera la generación de ATP mitocondrial, la transmisión sináptica y el rendimiento de la memoria [493]. Tomando en conjunto todo lo anterior, se puede inferir que el CP55940 podría inducir protección en las NCL PSEN1 E280A de manera dependiente e independiente de receptores. Interesantemente, se evidenció que la adición del cannabinoide, a pesar de su actividad protectora, redujo la respuesta a la ACh después de 4 días tanto en NCL WT como en NCL PSEN1 E280A. Estos hallazgos se pueden explicar en que previamente, se estableció que la activación del receptor CB1 por los cannabinoides es un fenómeno neuronal que puede inhibir la respuesta a neurotransmisores de manera dependiente de la inhibición de canales de Ca^{2+} , y que además esta interacción ligando-receptor aumenta la concentración de calcio intracelular cuando se administra intracelularmente pero no extracelularmente [494]. Tomados en conjunto, estos datos nos demuestran que el CP55940 ejerce su efecto protector

en las NCL de manera parcialmente independiente de receptores. Un hallazgo interesante fue la disminución de la reactividad para el sAPP β / β A42 mediada por el CP55940, lo que denota una potencial actividad anti-amiloidogénica de esta molécula. Dicho efecto no ha sido reportado anteriormente; sin embargo, en años anteriores se ha demostrado que la activación de receptores de cannabinoides potencia la capacidad de las células de microglía para fagocitar el péptido β A *in vitro* [495]. Este hecho resulta interesante porque en nuestro modelo no observamos poblaciones gliales asociadas a la diferenciación neuronal. Probablemente un efecto barredor de β A pudiera ser activado en las mismas NCL por acción del CP55940, no obstante, investigaciones futuras son necesarias para poder detallar este posible efecto. Estos resultados sugieren que los cannabinoides constituyen una posible terapia futura para la EAF con la mutación en la PSEN1 E280A.

Por otra parte, otros de los antioxidantes prometedores en el tratamiento para EAF es la EGCG que ha sido validada en numerosos estudios de afecciones patológicas crónicas, como inflamación y enfermedades neurodegenerativas [496,497]. En este trabajo se demostró que la EGCG efectivamente disminuye el efecto intrínseco generador de EROs en las NCL en el modelo 2D y 3D PSEN1 E280A, restaurándolos a niveles similares a los observados en las células WT. Estos resultados están de acuerdo con varios estudios previos *in vitro*, en donde se reportó que la EGCG tiene la mayor actividad antioxidante en comparación con otras catequinas y que esta propiedad antioxidante proviene principalmente de la presencia de grupos hidroxilo en sus estructuras moleculares. De hecho, la EGCG, con 8 grupos hidroxilo, en particular en las posiciones 3', 4' y 5' y con un resto de galato en C-3, le otorga la ventaja sobre las otras catequinas de ser una molécula excelente como donante de electrones y, por lo tanto, la mejor molécula para eliminar radicales libres [383]. En este sentido, la EGCG, puede eliminar diferentes especies de radicales libres como, por ejemplo, 1,1-difenil-3-picrilhidrazilo, los peroxilos, el óxido nítrico, los radicales libres de lípidos, el singlete de oxígeno, el peroxinitrito, radicales libres de hidroxilo y de anión superóxido, a través mecanismos que incluyen la interacción directa entre las catequinas y el radical peroxilo por medio de un mecanismo rápido de transferencia de electrones, formando radicales libres estables de semiquinona, previniendo la capacidad de desaminación de los radicales libres [370,384] y quelando los iones metálicos a sus formas inactivas. Adicionalmente, se ha

demostrado en estudios *in vivo* que la EGCG protege de la peroxidación lipídica [370]. El efecto inducido por la EGCG en las células PSEN1 E280A puede estar directamente relacionado con la eliminación del H₂O₂, como barredora de EROs confirmado con los resultados de la reducción de los niveles del DJ-1 oxidado en ambos modelos (2D y 3D). Además, se logró determinar que la EGCG también puede estabilizar los niveles del $\Delta\Psi_m$ en las células mutadas, probablemente por un efecto directo intracelular en estas células.

La acumulación intracelular anormal de sAPP β f/ β A42 y la proteína Tau fosforilada son biomarcadores claves en la EA asociados con inflamación, expresión elevada de proteínas pro-apoptóticas y el EO, que conducen a la disfunción y muerte de células neuronales en la corteza cerebral. Por lo tanto, agentes que prevengan la formación o que eliminen estos biomarcadores son esperanzadores para la prevención y tratamiento de la EA [314]. Se ha demostrado que la EGCG tiene el potencial de inhibir la fibrilación β A42 [400]. Además, también inhibe la agregación de la proteína Tau en oligómeros tóxicos y al mismo tiempo remodela los oligómeros existentes a un estado monomérico desplegado para rescatar a las células neuronales de la neurotoxicidad inducida por Tau [392]. Otros estudios sugieren que el mecanismo por el cual la EGCG inhibe el péptido β A42 es a través de la modificación en la morfología del amiloide provocada por la unión alternativa del hidrógeno facilitada por los radicales libres de hidroxilo de la EGCG [393]. Así mismo, la EGCG también puede remodelar fibrillas amiloides maduras, convirtiéndolas en agregados de proteínas amorfas que son menos tóxicas para las células [394]. En este sentido, el efecto antiagregación de EGCG podría ejercerse mediante su unión a la forma nativa del β A a través de interacciones con las cadenas laterales de residuos específicos, uniéndose a las especies de β A mal plegadas con elementos no covalentes, interacciones que involucran el esqueleto de β A para posteriormente remodelar agregados tóxicos en pequeños oligómeros no tóxicos [395]. En congruencia con esto, nosotros demostramos que la EGCG redujo significativamente la formación de estructuras complejas de β A detectables por western blot [498], probablemente por una interacción directa entre los monómeros de β A y la EGCG según el análisis de Docking molecular (**Figura 19**).



Vina score	Cavity volume (Å ³)	Center (x, y, z)	Docking size (x, y, z)	Contact residues
-5.6	7	-8, 0, 14	22, 22, 22	PHE19 PHE20 ALA21 GLU22 ASP23 VAL24 GLY29 ALA30 ILE31 ILE32 GLY33

Figura 20: Análisis de Docking molecular entre el monómero de β A42 y la EGCG. Se identifica una interacción en la lámina beta del péptido (aminoácidos PHE19 PHE20 ALA21 GLU22 ASP23 VAL24 GLY29 ALA30 ILE31 ILE32 GLY33). La estructura del β A42 fue modelada utilizando la herramienta ColabFold v1.5.2-patch: AlphaFold2/ MMseqs2 y la estructura 3D de la EGCG fue descargada de Pubchem (PubChem CID 65064). El docking molecular fue realizado utilizando el programa CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>).

En conclusión, estos resultados sugieren que probablemente la EGCG inhibe la formación de estructuras de β A42 de alto peso molecular [498]. De acuerdo con las múltiples propiedades farmacológicas descritas para la EGCG constituye una excelente molécula candidata como agente terapéutico en la EA.

Finalmente, encontramos que la melatonina también fue altamente eficaz como neuroprotector sobre los insultos intrínsecos en EC PSEN 1 E280A. En realidad, aMT no solo eliminó eficientemente el H₂O₂ actuando como agente antioxidante, sino que también redujo la agregación de sAPP β / β A42 (incluso más eficientemente que EGCG) posiblemente

a través de la interacción directa con el amiloide, protegiendo así a los EC contra la toxicidad de sAPP β / β A42. Además, la melatonina bloqueó casi por completo la hiperfosforilación de la proteína Tau, recuperó el $\Delta\Psi_m$ e inhibió la apoptosis inducida por sAPP β / β A42 en los EN mutantes a través de la inactivación de CASP3 (evidenciado de forma directa y a través del ensayo de TUNEL). En conjunto, estas observaciones cumplen con la idea de que la combinación de la EGCG, y la melatonina al igual que individualmente funcionan como antioxidante, antiamiloidogénico, inhibidor de la agregación de Tau y bloqueador de la apoptosis.

Por lo tanto, es importante resaltar que con este trabajo demostramos por primera vez que la acción combinada de dos agentes antioxidantes, EGCG y aMT, es aún más eficaz en la protección de los EC mutantes. Sin embargo, son necesarios más experimentos para establecer si la acción combinada de EGCG y aMT es aditiva o sinérgica [71]. Tomados en conjunto todos estos hallazgos experimentales en 2D y 3D derivados de las CME muestran que la neuropatología de la EAF causada por la mutación PSEN1-E280A ocurren ultra tempranamente, décadas antes de la aparición de la demencia.

CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran por primera vez, el establecimiento de neuronas colinérgicas (NCL, modelo 2D) y esferoides cerebrales (EC, modelo 3D) derivados de células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton de cordón umbilical y sangre menstrual (CME-GW-CU/SM) PSEN1 E280A como modelos *in vitro* de estudio de la neuropatología y de la neuroprotección en la EAF. Así mismo, en estos modelos *in vitro* se logró -de forma novedosa- la recapitulación de la neuropatología de la EAF de forma natural sin manipulación genética.

En este sentido, se demostró por primera vez la acumulación endógena del sAPP β / β A42, la generación de H₂O₂, la oxidación de la proteína DJ-1 (DJ-1 Cys106-SO₃) y la activación de la proteína pro-apoptótica c-JUN como cambios celulares tempranos en las neuronas PSEN1 E280A. Estos cambios se complementaron con la activación de las proteínas pro-apoptóticas p53 y PUMA, la pérdida del $\Delta\Psi_m$, la activación de CASP3 y la fragmentación del ADN, al día 11 en el modelo 2D y entre los días 4 y 11 del modelo 3D. Estas anomalías bioquímicas fueron seguidas por una secreción irregular de β A42, desregulación del flujo de Ca²⁺, disminución de la secreción de AChE (en el modelo 2D) e hiperfosforilación de la proteína Tau.

Por lo tanto, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la patología neuronal colinérgica en la EA PSEN1 E280A es inducida por la acumulación intracelular temprana de sAPP β / β A42 [448,499]. Estos hallazgos plantean el cuestionamiento de si las estrategias para eliminar el β A42 extracelular es suficiente como se propone en la inmunoterapia [500] o si se debe complementar esta inmunoterapia con tratamientos adicionales o una terapia combinada que permita eliminar el sAPP β / β A42 intracelular, el EO (es decir, el H₂O₂) y así evitar la apoptosis y la patología Tau, y el tratamiento con agonistas de nAChR para aumentar la funcionalidad neuronal.

Adicionalmente, pudimos demostrar por primera vez que el cannabinoide CP55940, la EGCG y la melatonina presentaron efectos antioxidantes y preservadores del potencial de membrana mitocondrial en las NCL y EC PSEN1 E280A. De manera interesante, estos tres

compuestos tuvieron capacidad reductora de los niveles intracelulares de sAPP β f/ β A42 y de la proteína DJ-1 oxidada. Finalmente, esta investigación nos permite aportar el establecimiento de modelos *in vitro* genético natural de la EAF para el estudio de la neuropatología y el diseño y selección de moléculas promisorias con productos naturales como nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento temprano y preventivo de la EA.

CAPÍTULO 11. PERSPECTIVAS

La EA es el trastorno neurodegenerativo de mayor prevalencia en el mundo [429], para el cual, hasta la fecha no existe una terapia curativa [144,430]. En Colombia y especialmente en el departamento de Antioquia se ha identificado el grupo más grande de personas con EAF de inicio temprano (<40 años), que incluye 25 familias con 5.000 miembros, de los cuales alrededor de 2.000 portan la mutación E280A en el gen de la PSEN1 que aumenta en el cerebro la forma altamente tóxica del péptido β -amiloide de 42-residuos de aminoácidos (β A42), comparado con el β -amiloide de 40-residuos (β A40) [434,501], lo que finalmente conduce a la muerte neuronal [125]. Aunque se han realizado numerosos ensayos clínicos para buscar tratamientos efectivos para la EAF, sus resultados han sido fallidos y desalentadores [310,436,437]. Esto, en gran medida, surge como consecuencia de la carencia de un modelo unificado de **organoide cerebral vascularizado para la EAF (que incluya, además: microglía y células vasculares)** que permita suministro sanguíneo con la finalidad de: i) aumentar su estabilidad estructural en el tiempo, ii) facilitar la evaluación de mecanismos de ingreso de nuevos compuestos/fármacos al organoide e iii) identificar posibles biomarcadores en sangre. Por lo tanto, una perspectiva importante que surge a partir de esta investigación es proponer un sistema robusto de organoides vascularizados provenientes de pacientes con la mutación PSEN1-E280A reproducir la neuropatología de la EAF presentada en el departamento de Antioquia y, además, con este novedoso modelo validar el diseño y evaluación de nuevos prototipos terapéuticos de forma específica y personalizada para la población afectada en el departamento, específicamente, fundamentado en el uso de productos naturales como terapias.

Otra de las perspectivas interesantes de este trabajo es la realización de un protocolo de ensayo clínico en humanos para comprobar la eficacia de una terapia combinada de cannabinoides, EGCG y melatonina, en **estadios tempranos** (análogos a los 4 días de presentación de marcadores neuropatológicos observados en el EC PSEN1 E280A) de la patología amiloide, con el fin de reducir la sintomatología y restaurar la actividad cognitiva en los pacientes con la EAF. Y, finalmente, proponer una terapia celular y /o de componentes neurotróficos o neuromoduladores derivados de CME de Cordón umbilical/Sangre menstrual para pacientes con la EAF.

CAPÍTULO 12. APORTES CIENTÍFICOS

Este trabajo aporta el establecimiento de dos modelos *in vitro* 2D y 3D para el estudio de la recreación de la neurofisiopatología de la EAF y del desarrollo de diseños de terapias alternativas tempranas para esta enfermedad aplicables también a la EAE, utilizando compuestos antioxidantes como los cannabinoides, la EGCG y la melatonina. Como producto de esta investigación, se cuenta con 5 publicaciones originales, en su orden:

1. 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 β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. PLoS One. 2020;15(5):e0221669. doi: 10.1371/journal.pone.0221669.
2. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. J Alzheimers Dis. 2021;82(s1):S359-S378. doi: 10.3233/JAD-201045.
3. Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. Mol Neurobiol. 2021;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6.
4. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Diminishes Intra-and Extracellular Amyloid-Induced Cytotoxic Effects on Cholinergic-like Neurons from Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A. Biomolecules. 2021;11(12):1845. doi: 10.3390/biom11121845.
5. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Neuroprotective Effect of Combined Treatment with Epigallocatechin 3-Gallate and Melatonin on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cerebral Spheroids Derived from Menstrual Mesenchymal Stromal Cells. J Alzheimers Dis. 2023 Feb 24. doi: 10.3233/JAD-220903.

A su vez, los resultados de esta investigación han contribuido al desarrollo de nuevos trabajos de investigación en el grupo de neurociencias de Antioquia, enfocados en estudiar el efecto de estos antioxidantes naturales como alternativas terapéuticas en los modelos 2D y 3D desarrollados.

De igual forma, este estudio permitió el desarrollo y estandarización de diferentes protocolos de investigación que se describen a continuación:

- i)* Mejoramiento de los protocolos de obtención de CME de cordón umbilical y de la diferenciación a osteoblastos y adipocitos.
- ii)* Estandarización y ejecución del protocolo de diferenciación de CME a condrocitos
- iii)* Estandarización y ejecución del protocolo para la obtención de CME a partir de Sangre Menstrual (SM)
- iv)* Elaboración y registro de un folleto instructivo para el uso de copa menstrual aportando a la apropiación social del conocimiento (**Anexo 1**)
- v)* Obtención por primera vez de CME (de CU y SM) PSEN1 E280A, con su respectiva criopreservación en el biobanco del GNA.
- vi)* Validación de los protocolos de diferenciación a NCL a partir de CME PSEN1 WT y E280A.
- vii)* Establecimiento de un modelo de estudio 2D de la EAF en Antioquia gracias a la diferenciación a NCL de CME PSEN1 E280A, que reproducen los marcadores neuropatológicos de la enfermedad.
- viii)* Establecimiento de un modelo 3D de estudio de la EAF en Antioquia gracias a la generación de EC a partir de CME PSEN1 E280A, que reproduce los marcadores neuropatológicos de la enfermedad.
- ix)* Obra científica inédita publicada (**Anexo 2**).

Así mismo, con resultados de investigación obtenidos se participó en los siguientes congresos (**Anexo 3**):

- XII Congreso Nacional | XIII Seminario Internacional de Neurociencias, 2021
- XIII Congreso Nacional | XIV Seminario Internacional de Neurociencias, 2023
- 11th IBRO World Congress of Neuroscience

Finalmente, los resultados fueron presentados a la Academia Nacional de Medicina con el trabajo titulado: Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Lopera F, Jimenez-Del-Rio, M. Neuronas de tipo colinérgico portadoras de la mutación PSEN1 E280A de la enfermedad de Alzheimer familiar muestran acumulación intraneuronal de fragmentos de la proteína precursora amiloide soluble, hiperfosforilación de Tau, estrés oxidativo, apoptosis y desregulación del Ca^{2+} : implicaciones terapéuticas, con el que se obtuvo el premio Mención de honor, Academia Nacional de Medicina, 2020, (**Anexo 4**).

CAPÍTULO 13. ANEXOS

13.1. Elaboración y registro de un folleto instructivo para el uso de copa menstrual aportando a la apropiación social del conocimiento (Anexo 1)

13.2. Obra científica inédita publicada-protocolo biomédico (Anexo 2)

13.3. Participación en eventos (Anexo 3)

13.4. Mención de honor, Academia Nacional de Medicina, 2020, (Anexo 4).

BIBLIOGRAFÍA

1. Drouin, E.; Drouin, G. The first report of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **2017**, *16*, 687, doi:10.1016/s1474-4422(17)30258-2.
2. Bondi, M.W.; Edmonds, E.C.; Salmon, D.P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc* **2017**, *23*, 818-831, doi:10.1017/s135561771700100x.
3. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **2016**, *12*, 459-509.
4. Knopman, D.S.; Amieva, H.; Petersen, R.C.; Chételat, G.; Holtzman, D.M.; Hyman, B.T.; Nixon, R.A.; Jones, D.T. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* **2021**, *7*, 33, doi:10.1038/s41572-021-00269-y.
5. Perez Romero, A.; Gonzalez Garrido, S. The importance of behavioural and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *Neurologia* **2016**, doi:10.1016/j.nrl.2016.02.024.
6. Lee, J.; Lee, K.J.; Kim, H. Gender differences in behavioral and psychological symptoms of patients with Alzheimer's disease. *Asian J Psychiatr* **2017**, *26*, 124-128, doi:10.1016/j.ajp.2017.01.027.
7. Marchini, L.; Ettinger, R.; Caprio, T.; Jucan, A. Oral health care for patients with Alzheimer's disease: An update. *Spec Care Dentist* **2019**, doi:10.1111/scd.12375.
8. World Alzheimer Reports | Alzheimer's Disease International. Available online: <https://www.alz.co.uk/research/world-report> (accessed on
9. Hebert, L.E.; Weuve, J.; Scherr, P.A.; Evans, D.A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **2013**, *80*, 1778-1783, doi:10.1212/WNL.0b013e31828726f5.
10. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **2023**, *19*, 1598-1695, doi:10.1002/alz.13016.
11. Lopera, F.; Ardilla, A.; Martinez, A.; Madrigal, L.; Arango-Viana, J.C.; Lemere, C.A.; Arango-Lasprilla, J.C.; Hincapie, L.; Arcos-Burgos, M.; Ossa, J.E.; et al. Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *Jama* **1997**, *277*, 793-799.
12. 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*, 1-12, doi:10.3233/jad-2012-120907.
13. Quiroz, Y.T.; Sperling, R.A.; Norton, D.J.; Baena, A.; Arboleda-Velasquez, J.F.; Cosio, D.; Schultz, A.; Lapoint, M.; Guzman-Velez, E.; Miller, J.B.; et al. Association Between Amyloid and Tau Accumulation in Young Adults With Autosomal Dominant Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* **2018**, *75*, 548-556, doi:10.1001/jamaneurol.2017.4907.
14. Villemagne, V.L.; Burnham, S.; Bourgeat, P.; Brown, B.; Ellis, K.A.; Salvado, O.; Szoeke, C.; Macaulay, S.L.; Martins, R.; Maruff, P.; et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* **2013**, *12*, 357-367, doi:10.1016/s1474-4422(13)70044-9.
15. Acosta-Baena, N.; Sepulveda-Falla, D.; Lopera-Gómez, C.M.; Jaramillo-Elorza, M.C.; Moreno, S.; Aguirre-Acevedo, D.C.; Saldarriaga, A.; Lopera, F. Pre-dementia clinical stages in presenilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: a retrospective cohort study. *Lancet Neurol* **2011**, *10*, 213-220, doi:10.1016/S1474-4422(10)70323-9.
16. Samuraki, M.; Matsunari, I.; Yoshita, M.; Shima, K.; Noguchi-Shinohara, M.; Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M. Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Microbleeds Correlate with Glucose Metabolism and Brain Volume in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **2015**, *48*, 517-528, doi:10.3233/jad-150274.
17. Jonkman, L.E.; Kenkhuis, B.; Geurts, J.J.G.; van de Berg, W.D.J. Post-Mortem MRI and Histopathology in Neurologic Disease: A Translational Approach. *Neurosci Bull* **2019**, *35*, 229-243, doi:10.1007/s12264-019-00342-3.
18. Selkoe, D.J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **2016**, *8*, 595-608, doi:10.15252/emmm.201606210.
19. Castellani, R.J.; Plascencia-Villa, G.; Perry, G. The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. *Lab Invest* **2019**, doi:10.1038/s41374-019-0231-z.
20. Rybarska, J.; Piekarska, B.; Stopa, B.; Zemanek, G.; Konieczny, L.; Nowak, M.; Krol, M.; Roterman, I.; Szymczakiewicz-Multanowska, A. Evidence that supramolecular Congo red is the sole ligation form of this dye for L chain lambda derived amyloid proteins. *Folia Histochem Cytobiol* **2001**, *39*, 307-314.
21. Jang, H.; Jang, Y.K.; Kim, H.J.; Werring, D.J.; Lee, J.S.; Choe, Y.S.; Park, S.; Lee, J.; Kim, K.W.; Kim, Y.; et al. Clinical significance of amyloid beta positivity in patients with probable cerebral amyloid angiopathy markers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, doi:10.1007/s00259-019-04314-7.
22. Querol-Vilaseca, M.; Colom-Cadena, M.; Pegueroles, J.; Nuñez-Llaves, R.; Luque-Cabecerans, J.; Muñoz-Llahuna, L.; Andilla, J.; Belbin, O.; Spires-Jones, T.L.; Gelpi, E.; et al. Nanoscale structure of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease. *Sci Rep* **2019**, *9*, 5181, doi:10.1038/s41598-019-41443-3.
23. Alonso, A.D.; Grundke-Iqbal, I.; Barra, H.S.; Iqbal, K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 298-303.
24. Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Quinlan, M.; Tung, Y.C.; Zaidi, M.S.; Wisniewski, H.M. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 6084-6089.
25. Furcila, D.; Domínguez-Álvaro, M.; DeFelipe, J.; Alonso-Nanclares, L. Subregional Density of Neurons, Neurofibrillary Tangles and Amyloid Plaques in the Hippocampus of Patients With Alzheimer's Disease. *Front Neuroanat* **2019**, *13*, 99, doi:10.3389/fnana.2019.00099.
26. Lutz, B.M.; Peng, J. Deep Profiling of the Aggregated Proteome in Alzheimer's Disease: From Pathology to Disease Mechanisms. *Proteomes* **2018**, *6*, doi:10.3390/proteomes6040046.
27. Lacosta, A.M.; Insua, D.; Badi, H.; Pesini, P.; Sarasa, M. Neurofibrillary Tangles of Abeta β -40 in Alzheimer's Disease Brains. *J Alzheimers Dis* **2017**, *58*, 661-667, doi:10.3233/jad-170163.
28. Buee, L.; Bussiere, T.; Buee-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P.R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **2000**, *33*, 95-130.

29. Calderon-Garciduenas, A.L.; Duyckaerts, C. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol* **2017**, *145*, 325-337, doi:10.1016/b978-0-12-802395-2.00023-7.
30. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* **2016**, *14*, 101-115.
31. Pepeu, G.; Grazia Giovannini, M. The fate of the brain cholinergic neurons in neurodegenerative diseases. *Brain Res* **2017**, *1670*, 173-184, doi:10.1016/j.brainres.2017.06.023.
32. Lombardo, S.; Maskos, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology* **2015**, *96*, 255-262, doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.018.
33. Davies, P.; Maloney, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. In *Lancet*; England, 1976; Volume 2, p. 1403.
34. Szutowicz, A.; Bielarczyk, H.; Gul, S.; Ronowska, A.; Pawelczyk, T.; Jankowska-Kulawy, A. Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab Brain Dis* **2006**, *21*, 149-161, doi:10.1007/s11011-006-9007-4.
35. Hardy, J.A.; Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184-185, doi:10.1126/science.1566067.
36. Behl, C.; Davis, J.B.; Lesley, R.; Schubert, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **1994**, *77*, 817-827.
37. Markesbery, W.R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **1997**, *23*, 134-147.
38. Hardy, J. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis". *Febs j* **2017**, *284*, 1040-1044, doi:10.1111/febs.14004.
39. Kurkinen, M.; Fułek, M.; Fułek, K.; Beszlej, J.A.; Kurpas, D.; Leszek, J. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: Should We Change Our Thinking? *Biomolecules* **2023**, *13*, doi:10.3390/biom13030453.
40. Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D.; Jones, E. Alzheimer's disease. *Lancet* **2011**, *377*, 1019-1031, doi:10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
41. Iqbal, K.; Alonso, A.; Gong, C.; Khatoon, S.; Kudo, T.; Singh, T.; Grundke-Iqbal, I. Molecular pathology of Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **1993**, *53*, 325-335.
42. Onorato, M.; Mulvihill, P.; Connolly, J.; Galloway, P.; Whitehouse, P.; Perry, G. Alteration of neuritic cytoarchitecture in Alzheimer disease. *Prog Clin Biol Res* **1989**, *317*, 781-789.
43. Barron, M.; Gartlon, J.; Dawson, L.A.; Atkinson, P.J.; Pardon, M.C. A state of delirium: Deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **2017**, *94*, 103-107, doi:10.1016/j.exger.2016.12.006.
44. Kwan, A.T.H.; Arfaie, S.; Theriault, J.; Azizi, Z.; Lussier, F.Z.; Tissot, C.; Chamoun, M.; Bezgin, G.; Servaes, S.; Stevenon, J.; et al. Medial temporal tau predicts memory decline in cognitively unimpaired elderly. *Brain Commun* **2023**, *5*, fcac325, doi:10.1093/braincomms/fcac325.
45. Clayton, K.A.; Van Enoo, A.A.; Ikezu, T. Alzheimer's Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy. *Front Neurosci* **2017**, *11*, 680, doi:10.3389/fnins.2017.00680.
46. Calsolaro, V.; Edison, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement* **2016**, *12*, 719-732, doi:10.1016/j.jalz.2016.02.010.
47. Heneka, M.T.; Kummer, M.P.; Stutz, A.; Delekate, A.; Schwartz, S.; Vieira-Saecker, A.; Griep, A.; Axt, D.; Remus, A.; Tzeng, T.C.; et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **2013**, *493*, 674-678, doi:10.1038/nature11729.
48. Michaud, M.; Balarly, L.; Moulis, G.; Gaudin, C.; Peyrot, C.; Vellas, B.; Cesari, M.; Nourhashemi, F. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc* **2013**, *14*, 877-882, doi:10.1016/j.jamda.2013.05.009.
49. Kamboh, M.I.; Demirci, F.Y.; Wang, X.; Minster, R.L.; Carrasquillo, M.M.; Pankratz, V.S.; Younkin, S.G.; Saykin, A.J.; Jun, G.; Baldwin, C.; et al. Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* **2012**, *2*, e117, doi:10.1038/tp.2012.45.
50. Hur, J.Y.; Frost, G.R.; Wu, X.; Crump, C.; Pan, S.J.; Wong, E.; Barros, M.; Li, T.; Nie, P.; Zhai, Y.; et al. The innate immunity protein IFITM3 modulates γ -secretase in Alzheimer's disease. *Nature* **2020**, *586*, 735-740, doi:10.1038/s41586-020-2681-2.
51. Hampel, H.; Mesulam, M.M.; Cuello, A.C.; Farlow, M.R.; Giacobini, E.; Grossberg, G.T.; Khachaturian, A.S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P.J.; et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **2018**, *141*, 1917-1933, doi:10.1093/brain/awy132.
52. Baker-Nigh, A.; Vahedi, S.; Davis, E.G.; Weintraub, S.; Bigio, E.H.; Klein, W.L.; Geula, C. Neuronal amyloid- β accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* **2015**, *138*, 1722-1737, doi:10.1093/brain/awv024.
53. Xu, W.; Weissmiller, A.M.; White, J.A.; Fang, F.; Wang, X.; Wu, Y.; Pearn, M.L.; Zhao, X.; Sawa, M.; Chen, S.; et al. Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration. *J Clin Invest* **2016**, *126*, 1815-1833, doi:10.1172/JCI82409.
54. Ballinger, E.C.; Ananth, M.; Talmage, D.A.; Role, L.W. Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron* **2016**, *91*, 1199-1218, doi:10.1016/j.neuron.2016.09.006.
55. Counts, S.E.; Mufson, E.J. The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **2005**, *64*, 263-272, doi:10.1093/jnen/64.4.263.
56. Wu, H.; Williams, J.; Nathans, J. Complete morphologies of basal forebrain cholinergic neurons in the mouse. *Elife* **2014**, *3*, e02444, doi:10.7554/eLife.02444.
57. Yaar, M.; Zhai, S.; Fine, R.E.; Eisenhauer, P.B.; Arble, B.L.; Stewart, K.B.; Gilchrist, B.A. Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 7720-7725, doi:10.1074/jbc.M110929200.
58. Kinney, J.W.; Bemiller, S.M.; Murtishaw, A.S.; Leisgang, A.M.; Salazar, A.M.; Lamb, B.T. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* **2018**, *4*, 575-590, doi:10.1016/j.trci.2018.06.014.

59. Yakel, J.L. Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflügers Arch* **2013**, *465*, 441-450, doi:10.1007/s00424-012-1200-1.
60. Mondragón-Rodríguez, S.; Gu, N.; Fasano, C.; Peña-Ortega, F.; Williams, S. Functional Connectivity between Hippocampus and Lateral Septum is Affected in Very Young Alzheimer's Transgenic Mouse Model. *Neuroscience* **2019**, *401*, 96-105, doi:10.1016/j.neuroscience.2018.12.042.
61. Everitt, B.J.; Robbins, T.W. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* **1997**, *48*, 649-684, doi:10.1146/annurev.psych.48.1.649.
62. Liu, Q.; Huang, Y.; Xue, F.; Simard, A.; DeChon, J.; Li, G.; Zhang, J.; Lucero, L.; Wang, M.; Sierks, M.; et al. A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* **2009**, *29*, 918-929, doi:10.1523/JNEUROSCI.3952-08.2009.
63. Shen, J.; Wu, J. Nicotinic Cholinergic Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Int Rev Neurobiol* **2015**, *124*, 275-292, doi:10.1016/bs.im.2015.08.002.
64. Wang, H.Y.; Lee, D.H.; D'Andrea, M.R.; Peterson, P.A.; Shank, R.P.; Reitz, A.B. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 5626-5632.
65. Ishii, M.; Kurachi, Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* **2006**, *12*, 3573-3581, doi:10.2174/138161206778522056.
66. Caccamo, A.; Oddo, S.; Billings, L.M.; Green, K.N.; Martinez-Coria, H.; Fisher, A.; LaFerla, F.M. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* **2006**, *49*, 671-682, doi:10.1016/j.neuron.2006.01.020.
67. Miyakawa, T.; Yamada, M.; Duttaroy, A.; Wess, J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* **2001**, *21*, 5239-5250.
68. Fisher, A. Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 433-442, doi:10.1016/j.nurt.2008.05.002.
69. Isacson, O.; Seo, H.; Lin, L.; Albeck, D.; Granholm, A.C. Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh. *Trends Neurosci* **2002**, *25*, 79-84, doi:10.1016/s0166-2236(02)02037-4.
70. Sevigny, J.; Chiao, P.; Bussière, T.; Weinreb, P.H.; Williams, L.; Maier, M.; Dunstan, R.; Salloway, S.; Chen, T.; Ling, Y.; et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **2016**, *537*, 50-56, doi:10.1038/nature19323.
71. Holmes, C.; Boche, D.; Wilkinson, D.; Yadegarfar, G.; Hopkins, V.; Bayer, A.; Jones, R.W.; Bullock, R.; Love, S.; Neal, J.W.; et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **2008**, *372*, 216-223, doi:10.1016/S0140-6736(08)61075-2.
72. Ostrowitzki, S.; Bittner, T.; Sink, K.M.; Mackey, H.; Rabe, C.; Honig, L.S.; Cassetta, E.; Woodward, M.; Boada, M.; van Dyck, C.H.; et al. Evaluating the Safety and Efficacy of Crenezumab vs Placebo in Adults With Early Alzheimer Disease: Two Phase 3 Randomized Placebo-Controlled Trials. *JAMA Neurol* **2022**, *79*, 1113-1121, doi:10.1001/jamaneurol.2022.2909.
73. Tanaka, H.; Homma, H.; Fujita, K.; Kondo, K.; Yamada, S.; Jin, X.; Waragai, M.; Ohtomo, G.; Iwata, A.; Tagawa, K.; et al. YAP-dependent necrosis occurs in early stages of Alzheimer's disease and regulates mouse model pathology. *Nat Commun* **2020**, *11*, 507, doi:10.1038/s41467-020-14353-6.
74. Okazawa, H. Intracellular amyloid hypothesis for ultra-early phase pathology of Alzheimer's disease. *Neuropathology* **2021**, *41*, 93-98, doi:10.1111/neup.12738.
75. Green, R.C.; Cupples, L.A.; Go, R.; Benke, K.S.; Edeki, T.; Griffith, P.A.; Williams, M.; Hipps, Y.; Graff-Radford, N.; Bachman, D.; et al. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *Jama* **2002**, *287*, 329-336.
76. Loy, C.T.; Schofield, P.R.; Turner, A.M.; Kwok, J.B. Genetics of dementia. *Lancet* **2014**, *383*, 828-840, doi:10.1016/s0140-6736(13)60630-3.
77. Liu, C.C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. In *Nat Rev Neurol*; England, 2013; Volume 9, pp. 106-118.
78. El Haj, M.; Antoine, P.; Amouyel, P.; Lambert, J.C.; Pasquier, F.; Kapogiannis, D. Apolipoprotein E (APOE) epsilon4 and episodic memory decline in Alzheimer's disease: A review. *Ageing Res Rev* **2016**, *27*, 15-22, doi:10.1016/j.arr.2016.02.002.
79. Schmukler, E.; Michaelson, D.M.; Pinkas-Kramarski, R. The Interplay Between Apolipoprotein E4 and the Autophagic-Endocytic-Lysosomal Axis. *Mol Neurobiol* **2018**, *55*, 6863-6880, doi:10.1007/s12035-018-0892-4.
80. Dergunov, A.D.; Visvikis-Siest, S.; Siest, G. Statins as effectors of key activities involved in apoE-dependent VLDL metabolism: review and hypothesis. *Vascul Pharmacol* **2008**, *48*, 70-75, doi:10.1016/j.vph.2007.12.001.
81. Kim, J.H. Genetics of Alzheimer's Disease. *Dement Neurocogn Disord* **2018**, *17*, 131-136, doi:10.12779/dnd.2018.17.4.131.
82. Yoshikai, S.; Sasaki, H.; Doh-ura, K.; Furuya, H.; Sakaki, Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* **1990**, *87*, 257-263.
83. Thinakaran, G.; Koo, E.H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 29615-29619, doi:10.1074/jbc.R800019200.
84. Guerreiro, R.J.; Gustafson, D.R.; Hardy, J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging* **2012**, *33*, 437-456, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.025.
85. Mullan, M.; Crawford, F.; Axelman, K.; Houlden, H.; Lilius, L.; Lannfelt, L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* **1992**, *1*, 345-347, doi:10.1038/ng0892-345.
86. Wakabayashi, T.; De Strooper, B. Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)* **2008**, *23*, 194-204, doi:10.1152/physiol.00009.2008.
87. De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **2003**, *38*, 9-12.

88. Kovacs, D.M.; Fausett, H.J.; Page, K.J.; Kim, T.W.; Moir, R.D.; Merriam, D.E.; Hollister, R.D.; Hallmark, O.G.; Mancini, R.; Felsenstein, K.M.; et al. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* **1996**, *2*, 224-229.
89. Reiman, E.M.; Quiroz, Y.T.; Fleisher, A.S.; Chen, K.; Velez-Pardo, C.; Jimenez-Del-Rio, M.; Fagan, A.M.; Shah, A.R.; Alvarez, S.; Arbelaez, A.; et al. Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol* **2012**, *11*, 1048-1056, doi:10.1016/s1474-4422(12)70228-4.
90. Li, Y.; Bohm, C.; Dodd, R.; Chen, F.; Qamar, S.; Schmitt-Ulms, G.; Fraser, P.E.; St George-Hyslop, P.H. Structural biology of presenilin 1 complexes. *Mol Neurodegener* **2014**, *9*, 59, doi:10.1186/1750-1326-9-59.
91. Periz, G.; Fortini, M.E. Functional reconstitution of gamma-secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *J Neurosci Res* **2004**, *77*, 309-322, doi:10.1002/jnr.20203.
92. Wolfe, M.S. Toward the structure of presenilin/γ-secretase and presenilin homologs. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1828*, 2886-2897, doi:10.1016/j.bbame.2013.04.015.
93. Kojro, E.; Fahrenholz, F. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* **2005**, *38*, 105-127.
94. De-Paula, V.J.; Radanovic, M.; Diniz, B.S.; Forlenza, O.V. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* **2012**, *65*, 329-352, doi:10.1007/978-94-007-5416-4_14.
95. Roher, A.E.; Weiss, N.; Kokjohn, T.A.; Kuo, Y.M.; Kalback, W.; Anthony, J.; Watson, D.; Luehrs, D.C.; Sue, L.; Walker, D.; et al. Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry* **2002**, *41*, 11080-11090.
96. Jurisch-Yaksi, N.; Sannerud, R.; Annaert, W. A fast growing spectrum of biological functions of γ-secretase in development and disease. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1828*, 2815-2827, doi:10.1016/j.bbame.2013.04.016.
97. Sato, T.; Diehl, T.S.; Narayanan, S.; Funamoto, S.; Ihara, Y.; De Strooper, B.; Steiner, H.; Haass, C.; Wolfe, M.S. Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 33985-33993, doi:10.1074/jbc.M705248200.
98. Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* **2006**, *3*, 275-283, doi:10.1159/000095267.
99. Gertsik, N.; Chiu, D.; Li, Y.M. Complex regulation of γ-secretase: from obligatory to modulatory subunits. *Front Aging Neurosci* **2014**, *6*, 342, doi:10.3389/fnagi.2014.00342.
100. Sannerud, R.; Esselens, C.; Ejsmont, P.; Mattera, R.; Rochin, L.; Tharkeshwar, A.K.; De Baets, G.; De Wever, V.; Habets, R.; Baert, V.; et al. Restricted Location of PSEN2/γ-Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular Aβ Pool. *Cell* **2016**, *166*, 193-208, doi:10.1016/j.cell.2016.05.020.
101. Szaruga, M.; Munteanu, B.; Lismont, S.; Veugelen, S.; Horr , K.; Mercken, M.; Saido, T.C.; Ryan, N.S.; De Vos, T.; Savvides, S.N.; et al. Alzheimer's-Causing Mutations Shift Aβ Length by Destabilizing γ-Secretase-Aβn Interactions. *Cell* **2017**, *170*, 443-456.e414, doi:10.1016/j.cell.2017.07.004.
102. Park, H.J.; Ran, Y.; Jung, J.I.; Holmes, O.; Price, A.R.; Smithson, L.; Ceballos-Diaz, C.; Han, C.; Wolfe, M.S.; Daaka, Y.; et al. The stress response neuropeptide CRF increases amyloid-β production by regulating γ-secretase activity. *EMBO J* **2015**, *34*, 1674-1686, doi:10.15252/embj.201488795.
103. Escamilla-Ayala, A.; Wouters, R.; Sannerud, R.; Annaert, W. Contribution of the Presenilins in the cell biology, structure and function of γ-secretase. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *105*, 12-26, doi:10.1016/j.semcdb.2020.02.005.
104. Agostinho, P.; Cunha, R.A.; Oliveira, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* **2010**, *16*, 2766-2778, doi:10.2174/138161210793176572.
105. El-Bahr, S. Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. Available online: <https://scienceinternational.com/fulltext/?doi=sciintl.2013.111.117> (accessed on 10/10/2023).
106. Ray, P.D.; Huang, B.W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **2012**, *24*, 981-990, doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
107. Nordberg, J.; Arner, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **2001**, *31*, 1287-1312.
108. Readnower, R.D.; Sauerbeck, A.D.; Sullivan, P.G. Mitochondria, Amyloid beta, and Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 104545, doi:10.4061/2011/104545.
109. Kim, H.J.; Khalimonchuk, O.; Smith, P.M.; Winge, D.R. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1823*, 1604-1616, doi:10.1016/j.bbame.2012.04.008.
110. Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **2007**, *12*, 913-922, doi:10.1007/s10495-007-0756-2.
111. Xavier, J.M.; Rodrigues, C.M.; Sola, S. Mitochondria: Major Regulators of Neural Development. *Neuroscientist* **2015**, doi:10.1177/1073858415585472.
112. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **2009**, *417*, 1-13, doi:10.1042/bj20081386.
113. Lushchak, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* **2014**, *224*, 164-175, doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
114. Tramutola, A.; Lanzillotta, C.; Perluigi, M.; Butterfield, D.A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull* **2017**, *133*, 88-96, doi:10.1016/j.brainresbull.2016.06.005.
115. Jezek, P.; Hlavata, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, *37*, 2478-2503, doi:10.1016/j.biocel.2005.05.013.
116. Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* **2015**, *24*, 325-340, doi:10.5607/en.2015.24.4.325.
117. Butterfield, D.A.; Drake, J.; Pocernich, C.; Castegna, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* **2001**, *7*, 548-554.

118. Butterfield, D.A.; Bader Lange, M.L.; Sultana, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1801*, 924-929, doi:10.1016/j.bbali.2010.02.005.
119. Praticò, D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci* **2008**, *1147*, 70-78, doi:10.1196/annals.1427.010.
120. Hansson Petersen, C.A.; Alikhani, N.; Behbahani, H.; Wiehager, B.; Pavlov, P.F.; Alafuzoff, I.; Leinonen, V.; Ito, A.; Winblad, B.; Glaser, E.; 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*, 13145-13150, doi:10.1073/pnas.0806192105.
121. Tillement, L.; Lecanu, L.; Yao, W.; Greeson, J.; Papadopoulos, V. The spirostenol (22R, 25R)-20alpha-spirost-5-en-3beta-yl hexanoate blocks mitochondrial uptake of Abeta in neuronal cells and prevents Abeta-induced impairment of mitochondrial function. *Steroids* **2006**, *71*, 725-735, doi:10.1016/j.steroids.2006.05.003.
122. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **2003**, *552*, 335-344, doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
123. Lustbader, J.W.; Cirilli, M.; Lin, C.; Xu, H.W.; Takuma, K.; Wang, N.; Caspersen, C.; Chen, X.; Pollak, S.; Chaney, M.; et al. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* **2004**, *304*, 448-452, doi:10.1126/science.1091230.
124. Murakami, Y.; Ohsawa, I.; Kasahara, T.; Ohta, S. Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde. *Neurobiol Aging* **2009**, *30*, 325-329, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.002.
125. Velez-Pardo, C.; Ospina, G.G.; Jimenez del Rio, M. Abeta[25-35] peptide and iron promote apoptosis in lymphocytes by an oxidative stress mechanism: involvement of H2O2, caspase-3, NF-kappaB, p53 and c-Jun. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, 351-365.
126. Nunomura, A.; Castellani, R.J.; Zhu, X.; Moreira, P.I.; Perry, G.; Smith, M.A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **2006**, *65*, 631-641, doi:10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf.
127. Garcia-Ospina, G.P.; Jimenez-Del Rio, M.; Lopera, F.; Velez-Pardo, C. [Neuronal DNA damage correlates with a positive detection of c-Jun, nuclear factor kB, p53 and Par-4 transcription factors in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* **2003**, *36*, 1004-1010.
128. Hsiao, K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S.; Yang, F.; Cole, G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **1996**, *274*, 99-102.
129. Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K.L.; Lacor, P.N.; Lambert, M.P.; Finch, C.E.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. 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*, 10417-10422, doi:10.1073/pnas.1834302100.
130. Gandy, S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 1121-1129, doi:10.1172/jci25100.
131. Ziegler-Waldkirch, S.; d'Errico, P.; Sauer, J.F.; Emy, D.; Savanthrapadian, S.; Loreth, D.; Katzmarski, N.; Blank, T.; Bartos, M.; Prinz, M.; 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*, 167-182, doi:10.15252/embj.201797021.
132. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **2007**, *87*, 99-163, doi:10.1152/physrev.00013.2006.
133. Suh, Y.H.; Checler, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* **2002**, *54*, 469-525.
134. Foster, T.C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* **2007**, *6*, 319-325, doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00283.x.
135. Saito, Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *J Clin Biochem Nutr* **2014**, *54*, 138-144, doi:10.3164/jcbn.13-108.
136. Greenough, M.A.; Camakaris, J.; Bush, A.I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **2013**, *62*, 540-555, doi:10.1016/j.neuint.2012.08.014.
137. Prousek, J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem* **2007**, *79*, 2325-2338.
138. Poprac, P.; Jomova, K.; Simunkova, M.; Kollar, V.; Rhodes, C.J.; Valko, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38*, 592-607, doi:10.1016/j.tips.2017.04.005.
139. 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*, 16455-16467, doi:10.1021/jp410046w.
140. Jimenez-Del-Rio, M.; Velez-Pardo, C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, *2012*, 163913, doi:10.1155/2012/163913.
141. Jimenez-Del-Rio, M.; Velez-Pardo, C. Alzheimer's Disease, Drosophila melanogaster and Polyphenols. *Adv Exp Med Biol* **2015**, *863*, 21-53, doi:10.1007/978-3-319-18365-7_2.
142. SENT. Subdirección de Enfermedades No Trasmisibles. Boletín de salud mental Demencia. **2017**.
143. Fleisher, A.S.; Chen, K.; Quiroz, Y.T.; Jakimovich, L.J.; Gutierrez Gomez, M.; Langois, C.M.; Langbaum, J.B.; Roontiva, A.; Thiyagura, P.; Lee, W.; et al. Associations between biomarkers and age in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer disease kindred: a cross-sectional study. *JAMA Neurol* **2015**, *72*, 316-324, doi:10.1001/jamaneurol.2014.3314.
144. Amanatkar, H.R.; Papagiannopoulos, B.; Grossberg, G.T. Analysis of recent failures of disease modifying therapies in Alzheimer's disease suggesting a new methodology for future studies. *Expert Rev Neurother* **2017**, *17*, 7-16, doi:10.1080/14737175.2016.1194203.
145. Simmons, P.J.; Torok-Storb, B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **1991**, *78*, 55-62.
146. Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* **1970**, *3*, 393-403, doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.

147. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143-147.
148. Delorme, B.; Ringe, J.; Gallay, N.; Le Vern, Y.; Kerboeuf, D.; Jorgensen, C.; Rosset, P.; Sensebé, L.; Layrolle, P.; Häupl, T.; et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* **2008**, *111*, 2631-2635, doi:10.1182/blood-2007-07-099622.
149. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315-317, doi:10.1080/14653240600855905.
150. Friedenstein, A.J.; Piatetzky, S., II; Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **1966**, *16*, 381-390.
151. Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **2006**, *24*, 1294-1301, doi:10.1634/stemcells.2005-0342.
152. Liu, Y.; Niu, R.; Yang, F.; Yan, Y.; Liang, S.; Sun, Y.; Shen, P.; Lin, J. Biological characteristics of human menstrual blood-derived endometrial stem cells. *J Cell Mol Med* **2018**, *22*, 1627-1639, doi:10.1111/jcmm.13437.
153. Wang, Y.; Zhang, Z.; Chi, Y.; Zhang, Q.; Xu, F.; Yang, Z.; Meng, L.; Yang, S.; Yan, S.; Mao, A.; et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e950, doi:10.1038/cddis.2013.480.
154. Samsonraj, R.M.; Rai, B.; Sathiyathan, P.; Puan, K.J.; Rotzschke, O.; Hui, J.H.; Raghunath, M.; Stanton, L.W.; Nurcombe, V.; Cool, S.M. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1878-1891, doi:10.1002/stem.1982.
155. Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W.; et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **2005**, *33*, 1402-1416, doi:10.1016/j.exphem.2005.07.003.
156. Tsai, M.S.; Lee, J.L.; Chang, Y.J.; Hwang, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* **2004**, *19*, 1450-1456, doi:10.1093/humrep/deh279.
157. Cai, J.; Li, W.; Su, H.; Qin, D.; Yang, J.; Zhu, F.; Xu, J.; He, W.; Guo, X.; Labuda, K.; et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 11227-11234, doi:10.1074/jbc.M109.086389.
158. Huang, G.T.; Gronthos, S.; Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* **2009**, *88*, 792-806, doi:10.1177/0022034509340867.
159. Schuring, A.N.; Schulte, N.; Kelsch, R.; Ropke, A.; Kiesel, L.; Gotte, M. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril* **2011**, *95*, 423-426, doi:10.1016/j.fertnstert.2010.08.035.
160. Allickson, J.G.; Sanchez, A.; Yefimenko, N.; Borlongan, C.V.; Sanberg, P.R. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J* **2011**, *3*, 4-10, doi:10.2174/1876893801103010004.
161. Ab Kadir, R.; Zainal Ariffin, S.H.; Megat Abdul Wahab, R.; Kermani, S.; Senafi, S. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *ScientificWorldJournal* **2012**, *2012*, 843843, doi:10.1100/2012/843843.
162. Morito, T.; Muneta, T.; Hara, K.; Ju, Y.J.; Mochizuki, T.; Makino, H.; Umezawa, A.; Sekiya, I. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)* **2008**, *47*, 1137-1143, doi:10.1093/rheumatology/ken114.
163. Wang, H.S.; Hung, S.C.; Peng, S.T.; Huang, C.C.; Wei, H.M.; Guo, Y.J.; Fu, Y.S.; Lai, M.C.; Chen, C.C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **2004**, *22*, 1330-1337, doi:10.1634/stemcells.2004-0013.
164. Hou, T.; Xu, J.; Wu, X.; Xie, Z.; Luo, F.; Zhang, Z.; Zeng, L. Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **2009**, *15*, 2325-2334, doi:10.1089/ten.tea.2008.0402.
165. Zhu, Y.; Liu, T.; Song, K.; Fan, X.; Ma, X.; Cui, Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* **2008**, *26*, 664-675, doi:10.1002/cbf.1488.
166. Rotter, N.; Oder, J.; Schlenke, P.; Lindner, U.; Bohrsen, F.; Kramer, J.; Rohwedel, J.; Huss, R.; Brandau, S.; Wollenberg, B.; et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* **2008**, *17*, 509-518, doi:10.1089/scd.2007.0180.
167. Wu, X.B.; Tao, R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2012**, *11*, 360-371.
168. Jiao, F.; Wang, J.; Dong, Z.L.; Wu, M.J.; Zhao, T.B.; Li, D.D.; Wang, X. Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram* **2012**, *14*, 324-333, doi:10.1089/cell.2012.0004.
169. Raynaud, C.M.; Maleki, M.; Lis, R.; Ahmed, B.; Al-Azwani, I.; Malek, J.; Safadi, F.F.; Rafii, A. Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactive stimulation. *Stem Cells Int* **2012**, *2012*, 658356, doi:10.1155/2012/658356.
170. Ranera, B.; Remacha, A.R.; Alvarez-Arguedas, S.; Castiella, T.; Vazquez, F.J.; Romero, A.; Zaragoza, P.; Martin-Burriel, I.; Rodellar, C. Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet J* **2013**, *195*, 248-251, doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.008.
171. Davies, J.E.; Walker, J.T.; Keating, A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med* **2017**, *6*, 1620-1630, doi:10.1002/sctm.16-0492.
172. Kim, D.W.; Staples, M.; Shinozuka, K.; Pantcheva, P.; Kang, S.D.; Borlongan, C.V. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 11692-11712, doi:10.3390/ijms140611692.

173. Troyer, D.L.; Weiss, M.L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* **2008**, *26*, 591-599, doi:10.1634/stemcells.2007-0439.
174. Nekanti, U.; Mohanty, L.; Venugopal, P.; Balasubramanian, S.; Totev, S.; Ta, M. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res* **2010**, *5*, 244-254, doi:10.1016/j.scr.2010.08.005.
175. Nekanti, U.; Rao, V.B.; Bahirvani, A.G.; Jan, M.; Totev, S.; Ta, M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **2010**, *19*, 117-130, doi:10.1089/scd.2009.0177.
176. Gargett, C.E.; Chan, R.W.; Schwab, K.E. Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol* **2007**, *19*, 377-383, doi:10.1097/GCO.0b013e328235a5c6.
177. Gargett, C.E.; Schwab, K.E.; Zillwood, R.M.; Nguyen, H.P.; Wu, D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* **2009**, *80*, 1136-1145, doi:10.1095/biolreprod.108.075226.
178. Meng, X.; Ichim, T.E.; Zhong, J.; Rogers, A.; Yin, Z.; Jackson, J.; Wang, H.; Ge, W.; Bogin, V.; Chan, K.W.; et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* **2007**, *5*, 57, doi:10.1186/1479-5876-5-57.
179. Galea, C.; Riva, N.; Calleja-Agius, J. Non-gynaecological Applications of Menstrual-derived Stem Cells: A Systematic Review. *Avicenna J Med Biotechnol* **2022**, *14*, 10-29, doi:10.18502/ajmb.v14i1.8166.
180. Bozorgmehr, M.; Gurung, S.; Darzi, S.; Nikoo, S.; Kazemnejad, S.; Zarnani, A.H.; Gargett, C.E. Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 497, doi:10.3389/fcell.2020.00497.
181. Kong, Y.; Shao, Y.; Ren, C.; Yang, G. Endometrial stem/progenitor cells and their roles in immunity, clinical application, and endometriosis. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 474, doi:10.1186/s13287-021-02526-z.
182. Majore, I.; Moretti, P.; Stahl, F.; Hass, R.; Kasper, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev* **2011**, *7*, 17-31, doi:10.1007/s12015-010-9165-y.
183. Rosen, E.D.; MacDougald, O.A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 885-896, doi:10.1038/nrm2066.
184. Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Murphy, J.M.; Barry, F.P.; Chichester, C.O.; Pittenger, M.F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* **1998**, *4*, 415-428, doi:10.1089/ten.1998.4.415.
185. Stock, P.; Bruckner, S.; Winkler, S.; Dollinger, M.M.; Christ, B. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 7004-7028, doi:10.3390/ijms15047004.
186. Lee, K.D.; Kuo, T.K.; Whang-Peng, J.; Chung, Y.F.; Lin, C.T.; Chou, S.H.; Chen, J.R.; Chen, Y.P.; Lee, O.K. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* **2004**, *40*, 1275-1284, doi:10.1002/hep.20469.
187. Kanafi, M.M.; Rajeshwari, Y.B.; Gupta, S.; Dadheech, N.; Nair, P.D.; Gupta, P.K.; Bhonde, R.R. Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy* **2013**, *15*, 1228-1236, doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.008.
188. Naghdi, M.; Tiraihi, T.; Namin, S.A.; Arabkheradmand, J. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy* **2009**, *11*, 137-152, doi:10.1080/14653240802716582.
189. Datta, I.; Mishra, S.; Mohanty, L.; Pulikot, S.; Joshi, P.G. Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **2011**, *13*, 918-932, doi:10.3109/14653249.2011.579957.
190. Feng, N.; Han, Q.; Li, J.; Wang, S.; Li, H.; Yao, X.; Zhao, R.C. Generation of highly purified neural stem cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells by Sox1 activation. *Stem Cells Dev* **2014**, *23*, 515-529, doi:10.1089/scd.2013.0263.
191. Zomer, H.D.; Vidane, A.S.; Goncalves, N.N.; Ambrosio, C.E. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning* **2015**, *8*, 125-134, doi:10.2147/sccaa.s88036.
192. Tate, C.C.; Chou, V.P.; Campos, C.; Moalem, A.S.; Di Monte, D.A.; McGrogan, M.; Case, C.C.; Manning-Bog, A.B. Mesenchymal stromal SB623 cell implantation mitigates nigrostriatal dopaminergic damage in a mouse model of Parkinson's disease. *J Tissue Eng Regen Med* **2015**, doi:10.1002/term.2081.
193. Park, B.N.; Kim, J.H.; Lee, K.; Park, S.H.; An, Y.S. Improved dopamine transporter binding activity after bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography study with F-18 FP-CIT. *Eur Radiol* **2015**, *25*, 1487-1496, doi:10.1007/s00330-014-3549-3.
194. Schwerk, A.; Altschuler, J.; Roch, M.; Gossen, M.; Winter, C.; Berg, J.; Kurtz, A.; Steiner, B. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells increase endogenous neurogenesis in the rat subventricular zone acutely after 6-hydroxydopamine lesioning. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 199-214, doi:10.1016/j.jcyt.2014.09.005.
195. Ko, T.L.; Fu, Y.Y.; Shih, Y.H.; Lin, Y.H.; Ko, M.H.; Fu, T.W.; Lin, T.Y.; Hsiao, H.S.; Chu, P.M.; Fu, Y.S. A High Efficiency Induction of Dopaminergic Cells from Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Hemiparkinsonian Rats. *Cell Transplant* **2014**, doi:10.3727/096368914x685078.
196. Hu, F.; Wang, X.; Liang, G.; Lv, L.; Zhu, Y.; Sun, B.; Xiao, Z. Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells. *Cell Reprogram* **2013**, *15*, 224-232, doi:10.1089/cell.2012.0077.
197. Xu, R.; Rudd, T.R.; Hughes, A.J.; Siligardi, G.; Fernig, D.G.; Yates, E.A. Analysis of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) signalling network with heparin as coreceptor: evidence for the expansion of the core FGFR signalling network. *FEBS J* **2013**, *280*, 2260-2270, doi:10.1111/febs.12201.
198. Liu, Y.; Weick, J.P.; Liu, H.; Krencik, R.; Zhang, X.; Ma, L.; Zhou, G.M.; Ayala, M.; Zhang, S.C. Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. *Nat Biotechnol* **2013**, *31*, 440-447, doi:10.1038/nbt.2565.
199. Zieger, E.; Schubert, M. New Insights Into the Roles of Retinoic Acid Signaling in Nervous System Development and the Establishment of Neurotransmitter Systems. *Int Rev Cell Mol Biol* **2017**, *330*, 1-84, doi:10.1016/bs.ircmb.2016.09.001.

200. Maden, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 755-765, doi:10.1038/nrn2212.
201. Mammadov, B.; Karakas, N.; Isik, S. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2011**, *47*, 484-491, doi:10.1007/s11626-011-9425-4.
202. 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*, 126-138, doi:10.1016/j.jneumeth.2018.11.019.
203. Qi, Y.; Zhang, F.; Song, G.; Sun, X.; Jiang, R.; Chen, M.; Ge, J. Cholinergic neuronal differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rhesus monkeys. *Sci China Life Sci* **2010**, *53*, 573-580, doi:10.1007/s11427-010-0009-4.
204. Liu, X.; Li, D.; Jiang, D.; Fang, Y. Acetylcholine secretion by motor neuron-like cells from umbilical cord mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res* **2013**, *8*, 2086-2092, doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.22.008.
205. Liang, J.; Wu, S.; Zhao, H.; Li, S.L.; Liu, Z.X.; Wu, J.; Zhou, L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. *Neurosci Lett* **2013**, *532*, 59-63, doi:10.1016/j.neulet.2012.11.014.
206. Borkowska, P.; Fila-Danilow, A.; Paul-Samojedny, M.; Kowalczyk, M.; Hart, J.; Ryszawy, J.; Kowalski, J. Differentiation of adult rat mesenchymal stem cells to GABAergic, dopaminergic and cholinergic neurons. *Pharmacol Rep* **2015**, *67*, 179-186, doi:10.1016/j.pharep.2014.08.022.
207. Thangnipon, W.; Puangmalai, N.; Suwanna, N.; Soi-Ampornkul, R.; Phonchai, R.; Kotchabhakdi, N.; Mukda, S.; Phermthai, T.; Julavijitphong, S.; Tuchinda, P.; et al. Potential role of N-benzylcinnamide in inducing neuronal differentiation from human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett* **2016**, *610*, 6-12, doi:10.1016/j.neulet.2015.10.050.
208. Marei, H.E.S.; El-Gamal, A.; Althani, A.; Afifi, N.; Abd-Elmaksoud, A.; Farag, A.; Cenciarelli, C.; Thomas, C.; Anwarul, H. Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 936-945, doi:10.1002/jcp.25937.
209. Hilgenberg, L.G.; Smith, M.A. Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures. *J Vis Exp* **2007**, 562, doi:10.3791/562.
210. Fairbanks, S.L.; Vest, R.; Verma, S.; Traystman, R.J.; Herson, P.S. Sex stratified neuronal cultures to study ischemic cell death pathways. *J Vis Exp* **2013**, e50758, doi:10.3791/50758.
211. Sciarretta, C.; Minichiello, L. The preparation of primary cortical neuron cultures and a practical application using immunofluorescent cytochemistry. *Methods Mol Biol* **2010**, *633*, 221-231, doi:10.1007/978-1-59745-019-5_16.
212. **!!! INVALID CITATION !!!**
213. Zhu, J.; Aja, S.; Kim, E.K.; Park, M.J.; Ramamurthy, S.; Jia, J.; Hu, X.; Geng, P.; Ronnett, G.V. Physiological oxygen level is critical for modeling neuronal metabolism in vitro. *J Neurosci Res* **2012**, *90*, 422-434, doi:10.1002/jnr.22765.
214. Biffi, E.; Regalia, G.; Menegon, A.; Ferrigno, G.; Pedrocchi, A. The influence of neuronal density and maturation on network activity of hippocampal cell cultures: a methodological study. *PLoS One* **2013**, *8*, e83899, doi:10.1371/journal.pone.0083899.
215. Mendivil-Perez, M.; Soto-Mercado, V.; Guerra-Librero, A.; Fernandez-Gil, B.I.; Florido, J.; Shen, Y.Q.; Tejada, M.A.; Capilla-Gonzalez, V.; Rusanova, I.; Garcia-Verdugo, J.M.; et al. Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function. *J Pineal Res* **2017**, doi:10.1111/jpi.12415.
216. Zhao, C.; Deng, W.; Gage, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **2008**, *132*, 645-660, doi:10.1016/j.cell.2008.01.033.
217. Lim, D.A.; Alvarez-Buylla, A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, doi:10.1101/cshperspect.a018820.
218. Reynolds, B.A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **1992**, *255*, 1707-1710.
219. Gil-Perotin, S.; Duran-Moreno, M.; Cebrian-Silla, A.; Ramirez, M.; Garcia-Belda, P.; Garcia-Verdugo, J.M. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)* **2013**, *296*, 1435-1452, doi:10.1002/ar.22746.
220. Giulian, D. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* **1999**, *65*, 13-18, doi:10.1086/302477.
221. Stansley, B.; Post, J.; Hensley, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **2012**, *9*, 115, doi:10.1186/1742-2094-9-115.
222. Maezawa, I.; Zimin, P.I.; Wulff, H.; Jin, L.W. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 3693-3706, doi:10.1074/jbc.M110.135244.
223. LePage, K.T.; Dickey, R.W.; Gerwick, W.H.; Jester, E.L.; Murray, T.F. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit Rev Neurobiol* **2005**, *17*, 27-50.
224. Constantinescu, R.; Constantinescu, A.T.; Reichmann, H.; Janetzky, B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl* **2007**, 17-28.
225. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
226. Gonzalez, F.; Boue, S.; Izpisua Belmonte, J.C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* **2011**, *12*, 231-242, doi:10.1038/nrg2937.
227. Mungenast, A.E.; Siegert, S.; Tsai, L.H. Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol Cell Neurosci* **2016**, *73*, 13-31, doi:10.1016/j.mcn.2015.11.010.
228. Israel, M.A.; Yuan, S.H.; Bardy, C.; Reyna, S.M.; Mu, Y.; Herrera, C.; Hefferan, M.P.; Van Gorp, S.; Nazor, K.L.; Boscolo, F.S.; et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* **2012**, *482*, 216-220, doi:10.1038/nature10821.
229. Sproul, A.A.; Jacob, S.; Pre, D.; Kim, S.H.; Nestor, M.W.; Navarro-Sobrino, M.; Santa-Maria, I.; Zimmer, M.; Aubry, S.; Steele, J.W.; et al. Characterization and molecular profiling of PSEN1 familial Alzheimer's disease iPSC-derived neural progenitors. *PLoS One* **2014**, *9*, e84547, doi:10.1371/journal.pone.0084547.

230. Mufson, E.J.; Ma, S.Y.; Dills, J.; Cochran, E.J.; Leurgans, S.; Wu, J.; Bennett, D.A.; Jaffar, S.; Gilmor, M.L.; Levey, A.I.; et al. Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **2002**, *443*, 136-153.
231. Duan, L.; Bhattacharyya, B.J.; Belmadani, A.; Pan, L.; Miller, R.J.; Kessler, J.A. Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. *Mol Neurodegener* **2014**, *9*, 3, doi:10.1186/1750-1326-9-3.
232. Kondo, T.; Asai, M.; Tsukita, K.; Kutoku, Y.; Ohsawa, Y.; Sunada, Y.; Imamura, K.; Egawa, N.; Yahata, N.; Okita, K.; et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 487-496, doi:10.1016/j.stem.2013.01.009.
233. Armijo, E.; Gonzalez, C.; Shahawaz, M.; Flores, A.; Davis, B.; Soto, C. Increased susceptibility to Abeta toxicity in neuronal cultures derived from familial Alzheimer's disease (PSEN1-A246E) induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* **2017**, *639*, 74-81, doi:10.1016/j.neulet.2016.12.060.
234. Mendivil-Perez, M.; Velez-Pardo, C.; Kosik, K.S.; Lopera, F.; Jimenez-Del-Rio, M. iPSCs-derived nerve-like cells from familial Alzheimer's disease PSEN 1 E280A reveal increased amyloid-beta levels and loss of the Y chromosome. *Neurosci Lett* **2019**, *703*, 111-118, doi:10.1016/j.neulet.2019.03.032.
235. Little, D.; Ketteler, R.; Gissen, P.; Devine, M.J. Using stem cell-derived neurons in drug screening for neurological diseases. *Neurobiol Aging* **2019**, *78*, 130-141, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.008.
236. Cornacchia, D.; Studer, L. Back and forth in time: Directing age in iPSC-derived lineages. *Brain Res* **2017**, *1656*, 14-26, doi:10.1016/j.brainres.2015.11.013.
237. Patterson, M.; Chan, D.N.; Ha, I.; Case, D.; Cui, Y.; Van Handel, B.; Mikkola, H.K.; Lowry, W.E. Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell Res* **2012**, *22*, 178-193, doi:10.1038/cr.2011.133.
238. Abbott, A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* **2003**, *424*, 870-872, doi:10.1038/424870a.
239. Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp. Biol. Med* **1906**, *4*, 140-143, doi:<https://doi.org/10.3181/00379727-4-98>.
240. Burrows, M.T. The cultivation of tissues of the chick-embryo outside the body. *J. Am. Med. Assoc* **1910**, *55*, 2057-2058, doi:10.1001/jama.1910.04330240035009.
241. Wilson, H. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. Exp. Zool.* **1907**, *5*, 245 - 258, doi:10.1002/jez.1400050204
242. Morgan, D.; W.; G; Drew; . A study of the restitution masses formed by the dissociated cells of the hydroids *Antennularia ramosa* and *A. antennina*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **1914**, *10*, 440 - 463, doi:10.1017/S0025315400008237
243. Holtfreter, J. The mechanism of embryonic induction and its relation to parthenogenesis and malignancy. *Symposia of the Society for Experimental Biology. Cambridge University Press, Cambridge, England, UK.* **17** **1948**.
244. EHRMANN, R.L.; GEY, G.O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* **1956**, *16*, 1375-1403.
245. MANDL, I.; MACLENNAN, J.D.; HOWES, E.L. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum*. *J Clin Invest* **1953**, *32*, 1323-1329, doi:10.1172/JCI102861.
246. LASFARGUES, E.Y. Cultivation and behavior in vitro of the normal mammary epithelium of the adult mouse. *Anat Rec* **1957**, *127*, 117-129, doi:10.1002/ar.1091270111.
247. Berry, M.N.; Friend, D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **1969**, *43*, 506-520, doi:10.1083/jcb.43.3.506.
248. Bissell, D.M.; Tilles, J.G. Morphology and function of cells of human embryonic liver in monolayer culture. *J Cell Biol* **1971**, *50*, 222-231, doi:10.1083/jcb.50.1.222.
249. Michalopoulos, G.; Pitot, H.C. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res* **1975**, *94*, 70-78, doi:10.1016/0014-4827(75)90532-7.
250. Emerman, J.T.; Pitelka, D.R. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* **1977**, *13*, 316-328, doi:10.1007/BF02616178.
251. Orkin, R.W.; Gehron, P.; McGoodwin, E.B.; Martin, G.R.; Valentine, T.; Swarm, R. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* **1977**, *145*, 204-220, doi:10.1084/jem.145.1.204.
252. Kleinman, H.K.; Martin, G.R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* **2005**, *15*, 378-386, doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.004.
253. Stenman, S.; Vaheri, A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* **1978**, *147*, 1054-1064, doi:10.1084/jem.147.4.1054.
254. Timpl, R.; Rohde, H.; Robey, P.G.; Rennard, S.I.; Foidart, J.M.; Martin, G.R. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* **1979**, *254*, 9933-9937.
255. Bissell, M.J.; Hall, H.G.; Parry, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* **1982**, *99*, 31-68, doi:10.1016/0022-5193(82)90388-5.
256. Schmidhauser, C.; Casperson, G.F.; Myers, C.A.; Sanzo, K.T.; Bolten, S.; Bissell, M.J. A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin- and extracellular matrix-dependent regulation of beta-casein gene expression. *Mol Biol Cell* **1992**, *3*, 699-709, doi:10.1091/mbc.3.6.699.
257. Streuli, C.H.; Bailey, N.; Bissell, M.J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* **1991**, *115*, 1383-1395, doi:10.1083/jcb.115.5.1383.
258. Evans, M.J.; Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **1981**, *292*, 154-156, doi:10.1038/292154a0.
259. Reynolds, B.A.; Weiss, S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **1996**, *175*, 1-13, doi:10.1006/dbio.1996.0090.

260. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145-1147, doi:10.1126/science.282.5391.1145.
261. Eiraku, M.; Watanabe, K.; Matsuo-Takasaki, M.; Kawada, M.; Yonemura, S.; Matsumura, M.; Wataya, T.; Nishiyama, A.; Muguruma, K.; Sasai, Y. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 519-532, doi:10.1016/j.stem.2008.09.002.
262. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
263. Lancaster, M.A.; Renner, M.; Martin, C.A.; Wenzel, D.; Bicknell, L.S.; Hurles, M.E.; Homfray, T.; Penninger, J.M.; Jackson, A.P.; Knoblich, J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **2013**, *501*, 373-379, doi:10.1038/nature12517.
264. Kelava, I.; Lancaster, M.A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol* **2016**, *420*, 199-209, doi:10.1016/j.ydbio.2016.06.037.
265. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* **2016**, *165*, 1586-1597, doi:10.1016/j.cell.2016.05.082.
266. Yin, X.; Mead, B.E.; Safaee, H.; Langer, R.; Karp, J.M.; Levy, O. Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 25-38, doi:10.1016/j.stem.2015.12.005.
267. Huang, H.; Ding, Y.; Sun, X.S.; Nguyen, T.A. Peptide hydrogelation and cell encapsulation for 3D culture of MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e59482, doi:10.1371/journal.pone.0059482.
268. Huh, D.; Hamilton, G.A.; Ingber, D.E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* **2011**, *21*, 745-754, doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005.
269. Kim, D.H.; Provenzano, P.P.; Smith, C.L.; Levchenko, A. Matrix nanotopography as a regulator of cell function. *J Cell Biol* **2012**, *197*, 351-360, doi:10.1083/jcb.201108062.
270. Kim, J.B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol* **2005**, *15*, 365-377, doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
271. Khaitan, D.; Chandna, S.; Arya, M.B.; Dwarakanath, B.S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med* **2006**, *4*, 12, doi:10.1186/1479-5876-4-12.
272. Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorn, P.; Noisa, P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells* **2019**, *11*, 1065-1083, doi:10.4252/wjsc.v11.i12.1065.
273. Corning. Spheroid vs. Organoid Infographic. Available online: <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/resources/stories/at-the-bench/organoid-vs-spheroid-what-is-the-difference.html> (accessed on 2023/05/16).
274. Vinci, M.; Gowan, S.; Boxall, F.; Patterson, L.; Zimmermann, M.; Court, W.; Lomas, C.; Mendiola, M.; Hardisson, D.; Eccles, S.A. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* **2012**, *10*, 29, doi:10.1186/1741-7007-10-29.
275. Kim, W.; Gwon, Y.; Park, S.; Kim, H.; Kim, J. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioact Mater* **2023**, *19*, 50-74, doi:10.1016/j.bioactmat.2022.03.039.
276. Youn, B.S.; Sen, A.; Behie, L.A.; Girgis-Gabardo, A.; Hassell, J.A. Scale-up of breast cancer stem cell aggregate cultures to suspension bioreactors. *Biotechnol Prog* **2006**, *22*, 801-810, doi:10.1021/bp050430z.
277. Yoshii, Y.; Waki, A.; Yoshida, K.; Kakezuka, A.; Kobayashi, M.; Namiki, H.; Kuroda, Y.; Kiyono, Y.; Yoshii, H.; Furukawa, T.; et al. The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6052-6058, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.076.
278. Fang, Y.; Eglén, R.M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* **2017**, *22*, 456-472, doi:10.1177/1087057117696795.
279. Alhaque, S.; Themis, M.; Rashidi, H. Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2018**, *373*, doi:10.1098/rstb.2017.0216.
280. Kurosawa, H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* **2007**, *103*, 389-398, doi:10.1263/jbb.103.389.
281. Mehta, G.; Hsiao, A.Y.; Ingram, M.; Luker, G.D.; Takayama, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release* **2012**, *164*, 192-204, doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
282. Drury, J.L.; Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337-4351, doi:10.1016/s0142-9612(03)00340-5.
283. Corning Matrigel Matrix. Available online: <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html> (accessed on 01-Jun-2020).
284. Li, Y.; Kumacheva, E. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Sci Adv* **2018**, *4*, eaas8998, doi:10.1126/sciadv.aas8998.
285. Cacciamali, A.; Villa, R.; Dotti, S. 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. *Front Physiol* **2022**, *13*, 836480, doi:10.3389/fphys.2022.836480.
286. Rauh, J.; Milan, F.; Günther, K.P.; Stiehler, M. Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* **2011**, *17*, 263-280, doi:10.1089/ten.TEB.2010.0612.
287. Nikolova, M.P.; Chavali, M.S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater* **2019**, *4*, 271-292, doi:10.1016/j.bioactmat.2019.10.005.
288. Florczyk, S.J.; Kievit, F.M.; Wang, K.; Erickson, A.E.; Ellenbogen, R.G.; Zhang, M. 3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds Promote Proliferation and Enrichment of Cancer Stem-Like Cells. *J Mater Chem B* **2016**, *4*, 6326-6334, doi:10.1039/C6TB01713D.
289. Andersen, T.; Auk-Emblem, P.; Domish, M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays (Basel)* **2015**, *4*, 133-161, doi:10.3390/microarrays4020133.

290. Gu, Q.; Tomaskovic-Crook, E.; Lozano, R.; Chen, Y.; Kapsa, R.M.; Zhou, Q.; Wallace, G.G.; Crook, J.M. Functional 3D Neural Mini-Tissues from Printed Gel-Based Bioink and Human Neural Stem Cells. *Adv Healthc Mater* **2016**, *5*, 1429-1438, doi:10.1002/adhm.201600095.
291. Yang, S.; Hu, H.; Kung, H.; Zou, R.; Dai, Y.; Hu, Y.; Wang, T.; Lv, T.; Yu, J.; Li, F. Organoids: The current status and biomedical applications. *MedComm (2020)* **2023**, *4*, e274, doi:10.1002/mco2.274.
292. Merck. Disease modelling in human organoids. Available online: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/3d-organoid-culture.html> (accessed on
293. Di Lullo, E.; Kriegstein, A.R. The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nat Rev Neurosci* **2017**, *18*, 573-584, doi:10.1038/nrn.2017.107.
294. Camp, J.G.; Badsha, F.; Florio, M.; Kanton, S.; Gerber, T.; Wilsch-Bräuninger, M.; Lewitus, E.; Sykes, A.; Hevers, W.; Lancaster, M.; et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 15672-15677, doi:10.1073/pnas.1520760112.
295. Choi, S.H.; Kim, Y.H.; Hebisch, M.; Sliwinski, C.; Lee, S.; D'Avanzo, C.; Chen, H.; Hooli, B.; Asselin, C.; Muffat, J.; et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **2014**, *515*, 274-278, doi:10.1038/nature13800.
296. Raja, W.K.; Mungenast, A.E.; Lin, Y.T.; Ko, T.; Abdurrob, F.; Seo, J.; Tsai, L.H. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* **2016**, *11*, e0161969, doi:10.1371/journal.pone.0161969.
297. Gonzalez, C.; Armijo, E.; Bravo-Alegria, J.; Becerra-Calixto, A.; Mays, C.E.; Soto, C. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Mol Psychiatry* **2018**, *23*, 2363-2374, doi:10.1038/s41380-018-0229-8.
298. Song, L.; Tsai, A.C.; Yuan, X.; Bejoy, J.; Sart, S.; Ma, T.; Li, Y. Neural Differentiation of Spheroids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells-Mesenchymal Stem Cells Coculture. *Tissue Eng Part A* **2018**, doi:10.1089/ten.TEA.2017.0403.
299. Huch, M.; Knoblich, J.A.; Lutolf, M.P.; Martinez-Arias, A. The hope and the hype of organoid research. *Development* **2017**, *144*, 938-941, doi:10.1242/dev.150201.
300. Yakoub, A.M. Cerebral organoids exhibit mature neurons and astrocytes and recapitulate electrophysiological activity of the human brain. *Neural Regen Res* **2019**, *14*, 757-761, doi:10.4103/1673-5374.249283.
301. Takebe, T.; Enomura, M.; Yoshizawa, E.; Kimura, M.; Koike, H.; Ueno, Y.; Matsuzaki, T.; Yamazaki, T.; Toyohara, T.; Osafune, K.; et al. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 556-565, doi:10.1016/j.stem.2015.03.004.
302. Salomone, S.; Caraci, F.; Leggio, G.M.; Fedotova, J.; Drago, F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br J Clin Pharmacol* **2012**, *73*, 504-517, doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04134.x.
303. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* **2010**, *9*, 702-716, doi:10.1016/s1474-4422(10)70119-8.
304. Ayuda para la enfermedad de Alzheimer y la demencia | España | Alzheimer's Association. Available online: <http://www.alz.org/es/demencia-alzheimer-espana.asp> (accessed on
305. Mufson, E.J.; Counts, S.E.; Perez, S.E.; Ginsberg, S.D. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev Neurother* **2008**, *8*, 1703-1718, doi:10.1586/14737175.8.11.1703.
306. Donev, R.; Kolev, M.; Millet, B.; Thome, J. Neuronal death in Alzheimer's disease and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med* **2009**, *13*, 4329-4348, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00889.x.
307. Egan, M.F.; Kost, J.; Tariot, P.N.; Aisen, P.S.; Cummings, J.L.; Vellas, B.; Sur, C.; Mukai, Y.; Voss, T.; Furtek, C.; et al. Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **2018**, *378*, 1691-1703, doi:10.1056/NEJMoa1706441.
308. Sur, C.; Kost, J.; Scott, D.; Adamczuk, K.; Fox, N.C.; Cummings, J.L.; Tariot, P.N.; Aisen, P.S.; Vellas, B.; Voss, T.; et al. BACE inhibition causes rapid, regional, and non-progressive volume reduction in Alzheimer's disease brain. *Brain* **2020**, *143*, 3816-3826, doi:10.1093/brain/awaa332.
309. Wang, H.; Li, R.; Shen, Y. β -Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases. *Trends Pharmacol Sci* **2013**, *34*, 215-225, doi:10.1016/j.tips.2013.01.008.
310. Doody, R.S.; Farlow, M.; Aisen, P.S.; Alzheimer's Disease Cooperative Study Data Analysis and Publication, C. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease. In *N Engl J Med*; United States, 2014; Volume 370, p. 1460.
311. Ettcheto, M.; Cano, A.; Manzine, P.R.; Busquets, O.; Verdaguer, E.; Castro-Torres, R.D.; García, M.L.; Beas-Zarate, C.; Olloquequi, J.; Auladell, C.; et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Improves Cognitive Deficits Aggravated by an Obesogenic Diet Through Modulation of Unfolded Protein Response in APPsw/PS1dE9 Mice. *Mol Neurobiol* **2020**, *57*, 1814-1827, doi:10.1007/s12035-019-01849-6.
312. Obregon, D.F.; Rezaei-Zadeh, K.; Bai, Y.; Sun, N.; Hou, H.; Ehrhart, J.; Zeng, J.; Mori, T.; Arendash, G.W.; Shytle, D.; et al. ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 16419-16427, doi:10.1074/jbc.M600617200.
313. Bao, J.; Liu, W.; Zhou, H.Y.; Gui, Y.R.; Yang, Y.H.; Wu, M.J.; Xiao, Y.F.; Shang, J.T.; Long, G.F.; Shu, X.J. Epigallocatechin-3-gallate Alleviates Cognitive Deficits in APP/PS1 Mice. *Curr Med Sci* **2020**, *40*, 18-27, doi:10.1007/s11596-020-2142-z.
314. Pervin, M.; Unno, K.; Ohishi, T.; Tanabe, H.; Miyoshi, N.; Nakamura, Y. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23061297.
315. Sanabria-Castro, A.; Alvarado-Echeverría, I.; Monge-Bonilla, C. Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer. *Neurología Revista Electrónica* **2016**, *7*, 060716.
316. Villegas, S. [Alzheimer's disease: New therapeutic strategies]. *Med Clin (Barc)* **2015**, *145*, 76-83, doi:10.1016/j.medcli.2014.05.023.

317. Mehta, D.; Jackson, R.; Paul, G.; Shi, J.; Sabbagh, M. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert Opin Investig Drugs* **2017**, *26*, 735-739, doi:10.1080/13543784.2017.1323868.
318. Duan, Y.; Lyu, L.; Zhan, S. Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease: A Scoping Review for 2017-2022. *Biomedicines* **2023**, *11*, doi:10.3390/biomedicines11010120.
319. Xiao, J.; Tundis, R. Natural products for Alzheimer's disease therapy: basic and application. *J Pharm Pharmacol* **2013**, *65*, 1679-1680, doi:10.1111/jphp.12186.
320. Ansari, N.; Khodaghali, F. Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanism aspect. *Curr Neuropharmacol* **2013**, *11*, 414-429, doi:10.2174/1570159X11311040005.
321. Elsohly, M.A.; Slade, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* **2005**, *78*, 539-548, doi:10.1016/j.lfs.2005.09.011.
322. Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **1990**, *346*, 561-564, doi:10.1038/346561a0.
323. Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **1993**, *365*, 61-65, doi:10.1038/365061a0.
324. Pertwee, R.G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* **2006**, *147 Suppl 1*, S163-171, doi:10.1038/sj.bjp.0706406.
325. Shevyrin, V.; Morzherin, Y. Cannabinoids: structures, effects, and classification. *Russian Chemical Bulletin* **2015**, *64*, 1249-1266.
326. Howlett, A.C. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, *68-69*, 619-631.
327. Howlett, A.C. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* **2005**, 53-79.
328. Brown, A.J. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* **2007**, *152*, 567-575, doi:10.1038/sj.bjp.0707481.
329. Hoehe, M.R.; Caenazzo, L.; Martinez, M.M.; Hsieh, W.T.; Modi, W.S.; Gershon, E.S.; Bonner, T.I. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol* **1991**, *3*, 880-885.
330. Croci, T.; Manara, L.; Aureggi, G.; Guagnini, F.; Rinaldi-Carmona, M.; Maffrand, J.P.; Le Fur, G.; Mukenge, S.; Ferla, G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* **1998**, *125*, 1393-1395, doi:10.1038/sj.bjp.0702190.
331. Pertwee, R.G.; Joe-Adigwe, G.; Hawksworth, G.M. Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol* **1996**, *296*, 169-172, doi:10.1016/0014-2999(95)00790-3.
332. Pertwee, R.G. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* **2001**, *48*, 859-867.
333. Szabo, B.; Nordheim, U.; Niederhoffer, N. Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *297*, 819-826.
334. Wagner, J.A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* **2001**, *423*, 203-210.
335. Mukhopadhyay, S.; McIntosh, H.H.; Houston, D.B.; Howlett, A.C. The CB(1) cannabinoid receptor juxtamembrane C-terminal peptide confers activation to specific G proteins in brain. *Mol Pharmacol* **2000**, *57*, 162-170.
336. Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **1997**, *74*, 129-180.
337. Shen, M.; Piser, T.M.; Seybold, V.S.; Thayer, S.A. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* **1996**, *16*, 4322-4334.
338. Gifford, A.N.; Samiian, L.; Gatley, S.J.; Ashby, C.R., Jr. Examination of the effect of the cannabinoid receptor agonist, CP 55,940, on electrically evoked transmitter release from rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **1997**, *324*, 187-192.
339. Schlicker, E.; Timm, J.; Zentner, J.; Gothert, M. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **1997**, *356*, 583-589.
340. Raitio, K.H.; Salo, O.M.; Nevalainen, T.; Poso, A.; Jarvinen, T. Targeting the cannabinoid CB2 receptor: mutations, modeling and development of CB2 selective ligands. *Curr Med Chem* **2005**, *12*, 1217-1237.
341. Berdyshev, E.V. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* **2000**, *108*, 169-190.
342. Gong, J.P.; Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Liu, Q.R.; Tagliaferro, P.A.; Brusco, A.; Uhl, G.R. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* **2006**, *1071*, 10-23, doi:10.1016/j.brainres.2005.11.035.
343. Onaivi, E.S.; Ishiguro, H.; Gong, J.P.; Patel, S.; Perchuk, A.; Meozzi, P.A.; Myers, L.; Mora, Z.; Tagliaferro, P.; Gardner, E.; et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* **2006**, *1074*, 514-536, doi:10.1196/annals.1369.052.
344. Condie, R.; Herring, A.; Koh, W.S.; Lee, M.; Kaminski, N.E. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4.IL-2. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 13175-13183.
345. Fernandez-Ruiz, J.; Romero, J.; Velasco, G.; Tolon, R.M.; Ramos, J.A.; Guzman, M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci* **2007**, *28*, 39-45, doi:10.1016/j.tips.2006.11.001.
346. Smita, K.; Sushil Kumar, V.; Premendran, J.S. Anandamide: an update. *Fundam Clin Pharmacol* **2007**, *21*, 1-8, doi:10.1111/j.1472-8206.2006.00454.x.
347. Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **1992**, *258*, 1946-1949.
348. Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, *215*, 89-97.
349. Glaser, S.T.; Kaczocha, M.; Deutsch, D.G. Anandamide transport: a critical review. *Life Sci* **2005**, *77*, 1584-1604, doi:10.1016/j.lfs.2005.05.007.

350. Bisogno, T.; Hanus, L.; De Petrocellis, L.; Tchilibon, S.; Ponde, D.E.; Brandi, I.; Moriello, A.S.; Davis, J.B.; Mechoulam, R.; Di Marzo, V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* **2001**, *134*, 845-852, doi:10.1038/sj.bjp.0704327.
351. Pertwee, R.G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol* **2009**, *156*, 397-411, doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x.
352. Freiman, I.; Anton, A.; Monyer, H.; Urbanski, M.J.; Szabo, B. Analysis of the effects of cannabinoids on identified synaptic connections in the caudate-putamen by paired recordings in transgenic mice. *J Physiol* **2006**, *575*, 789-806, doi:10.1113/jphysiol.2006.114272.
353. Pertwee, R.G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* **2006**, *30 Suppl 1*, S13-18, doi:10.1038/sj.ijo.0803272.
354. Li, H.; Liu, Y.; Tian, D.; Tian, L.; Ju, X.; Qi, L.; Wang, Y.; Liang, C. Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* **2020**, *192*, 112163, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112163.
355. Nadler, V.; Biegon, A.; Beit-Yannai, E.; Adamchik, J.; Shohami, E. 45Ca accumulation in rat brain after closed head injury; attenuation by the novel neuroprotective agent HU-211. *Brain Res* **1995**, *685*, 1-11.
356. Akiyama, H.; Barger, S.; Barnum, S.; Bradt, B.; Bauer, J.; Cole, G.M.; Cooper, N.R.; Eikelenboom, P.; Emmerling, M.; Fiebich, B.L.; et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **2000**, *21*, 383-421.
357. Coles, M.; Steiner-Lim, G.Z.; Karl, T. Therapeutic properties of multi-cannabinoid treatment strategies for Alzheimer's disease. *Front Neurosci* **2022**, *16*, 962922, doi:10.3389/fnins.2022.962922.
358. Fernandez-Ruiz, J.; Gonzalez, S.; Romero, J.; Ramos, J. Cannabinoids in neurodegeneration and neuroprotection. In *Cannabinoids as Therapeutics*, Mechoulam, R., Ed.; 2005; pp. 79-109.
359. Molina-Holgado, F.; Pinteaux, E.; Moore, J.D.; Molina-Holgado, E.; Guaza, C.; Gibson, R.M.; Rothwell, N.J. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci* **2003**, *23*, 6470-6474.
360. Benito, C.; Tolon, R.M.; Pazos, M.R.; Nunez, E.; Castillo, A.I.; Romero, J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* **2008**, *153*, 277-285, doi:10.1038/sj.bjp.0707505.
361. Lleo, A.; Greenberg, S.M.; Growdon, J.H. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* **2006**, *57*, 513-533, doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131442.
362. Eubanks, L.M.; Rogers, C.J.; Beuscher, A.E.t.; Koob, G.F.; Olson, A.J.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Mol Pharm* **2006**, *3*, 773-777, doi:10.1021/mp060066m.
363. Streit, W.J. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **2005**, *48*, 234-239, doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.013.
364. Hampson, A.J.; Grimaldi, M.; Axelrod, J.; Wink, D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 8268-8273.
365. Esposito, G.; Scuderi, C.; Savani, C.; Steardo, L., Jr.; De Filippis, D.; Cottone, P.; Iuvone, T.; Cuomo, V.; Steardo, L. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol* **2007**, *151*, 1272-1279, doi:10.1038/sj.bjp.0707337.
366. Jimenez Del Rio, M.; Velez-Pardo, C. Insulin-like growth factor-1 prevents Abeta[25-35]/(H2O2)- induced apoptosis in lymphocytes by reciprocal NF-kappaB activation and p53 inhibition via PI3K-dependent pathway. *Growth Factors* **2006**, *24*, 67-78, doi:10.1080/08977190500361788.
367. Singh, B.N.; Shankar, S.; Srivastava, R.K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* **2011**, *82*, 1807-1821, doi:10.1016/j.bcp.2011.07.093.
368. Nagle, D.G.; Ferreira, D.; Zhou, Y.D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1849-1855, doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.020.
369. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231-1246, doi:10.3390/nu2121231.
370. Singh, N.A.; Mandal, A.K.; Khan, Z.A. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutr J* **2016**, *15*, 60, doi:10.1186/s12937-016-0179-4.
371. Du, G.J.; Zhang, Z.; Wen, X.D.; Yu, C.; Calway, T.; Yuan, C.S.; Wang, C.Z. Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients* **2012**, *4*, 1679-1691, doi:10.3390/nu4111679.
372. Khokhar, S.; Magnusdottir, S.G. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 565-570.
373. Cabrera, C.; Gimenez, R.; Lopez, M.C. Determination of tea components with antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 4427-4435, doi:10.1021/jf0300801.
374. Khan, N.; Afaq, F.; Saleem, M.; Ahmad, N.; Mukhtar, H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* **2006**, *66*, 2500-2505, doi:10.1158/0008-5472.can-05-3636.
375. Gadkariab, P.; Balaraman, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing* **2015**, *93*, 122-138.
376. Camfield, D.A.; Stough, C.; Farrimond, J.; Scholey, A.B. Acute effects of tea constituents L-theanine, caffeine, and epigallocatechin gallate on cognitive function and mood: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* **2014**, *72*, 507-522, doi:10.1111/nure.12120.
377. Einother, S.J.; Martens, V.E. Acute effects of tea consumption on attention and mood. *Am J Clin Nutr* **2013**, *98*, 1700s-1708s, doi:10.3945/ajcn.113.058248.
378. Feng, L.; Li, J.; Ng, T.P.; Lee, T.S.; Kua, E.H.; Zeng, Y. Tea drinking and cognitive function in oldest-old Chinese. *J Nutr Health Aging* **2012**, *16*, 754-758, doi:10.1007/s12603-012-0077-1.
379. Chan, Y.C.; Hosoda, K.; Tsai, C.J.; Yamamoto, S.; Wang, M.F. Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **2006**, *52*, 266-273.

380. Ide, K.; Yamada, H.; Takuma, N.; Park, M.; Wakamiya, N.; Nakase, J.; Ukawa, Y.; Sagesaka, Y.M. Green tea consumption affects cognitive dysfunction in the elderly: a pilot study. *Nutrients* **2014**, *6*, 4032-4042, doi:10.3390/nu6104032.
381. Mahler, A.; Mandel, S.; Lorenz, M.; Ruegg, U.; Wanker, E.E.; Boschmann, M.; Paul, F. Epigallocatechin-3-gallate: a useful, effective and safe clinical approach for targeted prevention and individualised treatment of neurological diseases? *Epma j* **2013**, *4*, 5, doi:10.1186/1878-5085-4-5.
382. Shimizu, M.; Shirakami, Y.; Sakai, H.; Yasuda, Y.; Kubota, M.; Adachi, S.; Tsurumi, H.; Hara, Y.; Moriwaki, H. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* **2010**, *185*, 247-252, doi:10.1016/j.cbi.2010.03.036.
383. Higdon, J.V.; Frei, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2003**, *43*, 89-143, doi:10.1080/10408690390826464.
384. Guo, Q.; Zhao, B.; Li, M.; Shen, S.; Xin, W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1304*, 210-222.
385. Amit, T.; Avramovich-Tirosh, Y.; Youdim, M.B.; Mandel, S. Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators. *Faseb j* **2008**, *22*, 1296-1305, doi:10.1096/fj.07-8627rev.
386. van Acker, S.A.; van den Berg, D.J.; Tromp, M.N.; Griffioen, D.H.; van Bennekom, W.P.; van der Vijgh, W.J.; Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **1996**, *20*, 331-342.
387. Kim, H.S.; Quon, M.J.; Kim, J.A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* **2014**, *2*, 187-195, doi:10.1016/j.redox.2013.12.022.
388. Chou, C.W.; Huang, W.J.; Tien, L.T.; Wang, S.J. (-)-Epigallocatechin gallate, the most active polyphenolic catechin in green tea, presynaptically facilitates Ca²⁺-dependent glutamate release via activation of protein kinase C in rat cerebral cortex. *Synapse* **2007**, *61*, 889-902, doi:10.1002/syn.20444.
389. Lorenz, M.; Wessler, S.; Follmann, E.; Michaelis, W.; Dusterhoft, T.; Baumann, G.; Stangl, K.; Stangl, V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 6190-6195, doi:10.1074/jbc.M309114200.
390. Yao, C.; Zhang, J.; Liu, G.; Chen, F.; Lin, Y. Neuroprotection by (-)-epigallocatechin-3-gallate in a rat model of stroke is mediated through inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep* **2014**, *9*, 69-76, doi:10.3892/mmr.2013.1778.
391. Ono, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **2003**, *87*, 172-181.
392. Wobst, H.J.; Sharma, A.; Diamond, M.I.; Wanker, E.E.; Bieschke, J. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Lett* **2015**, *589*, 77-83, doi:10.1016/j.febslet.2014.11.026.
393. Bieschke, J.; Russ, J.; Friedrich, R.P.; Ehrnhoefer, D.E.; Wobst, H.; Neugebauer, K.; Wanker, E.E. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 7710-7715, doi:10.1073/pnas.0910723107.
394. Palhano, F.L.; Lee, J.; Grimster, N.P.; Kelly, J.W. Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 7503-7510, doi:10.1021/ja3115696.
395. Bu, X.L.; Rao, P.P.N.; Wang, Y.J. Anti-amyloid Aggregation Activity of Natural Compounds: Implications for Alzheimer's Drug Discovery. *Mol Neurobiol* **2016**, *53*, 3565-3575, doi:10.1007/s12035-015-9301-4.
396. Freysson, A.; Page, G.; Fauconneau, B.; Rioux Bilan, A. Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. *Neural Regen Res* **2018**, *13*, 955-961, doi:10.4103/1673-5374.233432.
397. Viles, J. Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 2271-2284.
398. Avramovich-Tirosh, Y.; Reznichenko, L.; Mit, T.; Zheng, H.; Fridkin, M.; Weinreb, O.; Mandel, S.; Youdim, M.B. Neurorescue activity, APP regulation and amyloid-beta peptide reduction by novel multi-functional brain permeable iron-chelating-antioxidants, M-30 and green tea polyphenol, EGCG. *Curr Alzheimer Res* **2007**, *4*, 403-411.
399. Ali, B.; Jamal, Q.M.; Shams, S.; Al-Wabel, N.A.; Siddiqui, M.U.; Alzohairy, M.A.; Al Karaawi, M.A.; Kesari, K.K.; Mushtaq, G.; Kamal, M.A. In Silico Analysis of Green Tea Polyphenols as Inhibitors of AChE and BChE Enzymes in Alzheimer's Disease Treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2016**, *15*, 624-628.
400. Omar, S.H. Biophenols pharmacology against the amyloidogenic activity in Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother* **2017**, *89*, 396-413, doi:10.1016/j.biopha.2017.02.051.
401. Rezai-Zadeh, K.; Arendash, G.W.; Hou, H.; Fernandez, F.; Jensen, M.; Runfeldt, M.; Shytle, R.D.; Tan, J. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res* **2008**, *1214*, 177-187, doi:10.1016/j.brainres.2008.02.107.
402. Chesser, A.S.; Ganeshan, V.; Yang, J.; Johnson, G.V. Epigallocatechin-3-gallate enhances clearance of phosphorylated tau in primary neurons. *Nutr Neurosci* **2016**, *19*, 21-31, doi:10.1179/1476830515y.0000000038.
403. Pubchem. Melatonin (compound). Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Melatonin> (accessed on 2023/05/15).
404. Wu, Y.H.; Swaab, D.F. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res* **2005**, *38*, 145-152, doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00196.x.
405. Zhou, J.N.; Liu, R.Y.; Kamphorst, W.; Hofman, M.A.; Swaab, D.F. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *J Pineal Res* **2003**, *35*, 125-130, doi:10.1034/j.1600-079x.2003.00065.x.
406. Savaskan, E.; Ayyoub, M.A.; Ravid, R.; Angeloni, D.; Fraschini, F.; Meier, F.; Eckert, A.; Müller-Spahn, F.; Jockers, R. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res* **2005**, *38*, 10-16, doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00169.x.

407. Wu, Y.H.; Fischer, D.F.; Swaab, D.F. A promoter polymorphism in the monoamine oxidase A gene is associated with the pineal MAOA activity in Alzheimer's disease patients. *Brain Res* **2007**, *1167*, 13-19, doi:10.1016/j.brainres.2007.06.053.
408. Brusco, L.I.; Márquez, M.; Cardinali, D.P. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett* **2000**, *21*, 39-42.
409. Li, S.P.; Deng, Y.Q.; Wang, X.C.; Wang, Y.P.; Wang, J.Z. Melatonin protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from calyculin A-induced neurofilament impairment and neurotoxicity. *J Pineal Res* **2004**, *36*, 186-191, doi:10.1111/j.1600-079x.2004.00116.x.
410. Deng, Y.Q.; Xu, G.G.; Duan, P.; Zhang, Q.; Wang, J.Z. Effects of melatonin on wortmannin-induced tau hyperphosphorylation. *Acta Pharmacol Sin* **2005**, *26*, 519-526, doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00102.x.
411. Wang, X.C.; Zhang, J.; Yu, X.; Han, L.; Zhou, Z.T.; Zhang, Y.; Wang, J.Z. Prevention of isoproterenol-induced tau hyperphosphorylation by melatonin in the rat. *Sheng Li Xue Bao* **2005**, *57*, 7-12.
412. Liu, S.J.; Wang, J.Z. Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacol Sin* **2002**, *23*, 183-187.
413. Yang, X.; Yang, Y.; Fu, Z.; Li, Y.; Feng, J.; Luo, J.; Zhang, Q.; Wang, Q.; Tian, Q. Melatonin ameliorates Alzheimer-like pathological changes and spatial memory retention impairment induced by calyculin A. *J Psychopharmacol* **2011**, *25*, 1118-1125, doi:10.1177/0269881110367723.
414. Zhu, L.Q.; Wang, S.H.; Ling, Z.Q.; Wang, D.L.; Wang, J.Z. Effect of inhibiting melatonin biosynthesis on spatial memory retention and tau phosphorylation in rat. *J Pineal Res* **2004**, *37*, 71-77, doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00136.x.
415. Lahiri, D.K. Melatonin affects the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in different cell types. *J Pineal Res* **1999**, *26*, 137-146, doi:10.1111/j.1600-079x.1999.tb00575.x.
416. Zhang, Y.C.; Wang, Z.F.; Wang, Q.; Wang, Y.P.; Wang, J.Z. Melatonin attenuates beta-amyloid-induced inhibition of neurofilament expression. *Acta Pharmacol Sin* **2004**, *25*, 447-451.
417. Lahiri, D.K.; Chen, D.; Ge, Y.W.; Bondy, S.C.; Sharman, E.H. Dietary supplementation with melatonin reduces levels of amyloid beta-peptides in the murine cerebral cortex. *J Pineal Res* **2004**, *36*, 224-231, doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00121.x.
418. Wang, X.C.; Zhang, Y.C.; Chatterjee, N.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Wang, J.Z. Effect of melatonin and melatoninylvalpromide on beta-amyloid and neurofilaments in N2a cells. *Neurochem Res* **2008**, *33*, 1138-1144, doi:10.1007/s11064-007-9563-y.
419. Matsubara, E.; Bryant-Thomas, T.; Pacheco Quinto, J.; Henry, T.L.; Poeggeler, B.; Herbert, D.; Cruz-Sanchez, F.; Chyan, Y.J.; Smith, M.A.; Perry, G.; et al. Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **2003**, *85*, 1101-1108, doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01654.x.
420. Poeggeler, B.; Miravalle, L.; Zagorski, M.G.; Wisniewski, T.; Chyan, Y.J.; Zhang, Y.; Shao, H.; Bryant-Thomas, T.; Vidal, R.; Frangione, B.; et al. Melatonin reverses the profibrillogenic activity of apolipoprotein E4 on the Alzheimer amyloid Abeta peptide. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14995-15001, doi:10.1021/bi0114269.
421. Skribanek, Z.; Baláspiri, L.; Mák, M. Interaction between synthetic amyloid-beta-peptide (1-40) and its aggregation inhibitors studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2001**, *36*, 1226-1229, doi:10.1002/jms.243.
422. Huang, T.H.; Fraser, P.E.; Chakrabarty, A. Fibrillogenesis of Alzheimer Abeta peptides studied by fluorescence energy transfer. *J Mol Biol* **1997**, *269*, 214-224, doi:10.1006/jmbi.1997.1050.
423. Gallego Villarejo, L.; Bachmann, L.; Marks, D.; Brachhäuser, M.; Geidies, A.; Müller, T. Role of Intracellular Amyloid β as Pathway Modulator, Biomarker, and Therapy Target. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23094656.
424. Aytton, S.; Bush, A.I. β -amyloid: The known unknowns. *Ageing Res Rev* **2021**, *65*, 101212, doi:10.1016/j.arr.2020.101212.
425. Yuan, H.; Pang, S.F. [125I]iodomelatonin-binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J Endocrinol* **1991**, *128*, 475-482, doi:10.1677/joe.0.1280475.
426. Bieschke, J.; Zhang, Q.; Powers, E.T.; Lerner, R.A.; Kelly, J.W. Oxidative metabolites accelerate Alzheimer's amyloidogenesis by a two-step mechanism, eliminating the requirement for nucleation. *Biochemistry* **2005**, *44*, 4977-4983, doi:10.1021/bi0501030.
427. Zatta, P.; Tognon, G.; Carampin, P. Melatonin prevents free radical formation due to the interaction between beta-amyloid peptides and metal ions [Al(III), Zn(II), Cu(II), Mn(II), Fe(II)]. *J Pineal Res* **2003**, *35*, 98-103, doi:10.1034/j.1600-079x.2003.00058.x.
428. Hossain, M.F.; Uddin, M.S.; Uddin, G.M.S.; Sumsuzzman, D.M.; Islam, M.S.; Barreto, G.E.; Mathew, B.; Ashraf, G.M. Melatonin in Alzheimer's Disease: A Latent Endogenous Regulator of Neurogenesis to Mitigate Alzheimer's Neuropathology. *Mol Neurobiol* **2019**, *56*, 8255-8276, doi:10.1007/s12035-019-01660-3.
429. Wortmann, M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* **2012**, *4*, 40, doi:10.1186/alzrt143.
430. Cao, J.; Hou, J.; Ping, J.; Cai, D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **2018**, *13*, 64, doi:10.1186/s13024-018-0299-8.
431. Cornejo, W.; Lopera, F.; Uribe, C.; Salinas, M. [Description of a family affected by Alzheimer type presenile dementia]. *Acta Med Col* **1987**, *12*, 55-61.
432. Lopera, A.; Arcos, M.; Madrigal, L.; Kosik, K.; Cornejo, W.; Ossa, J. [Alzheimer type presenile dementia with familial aggregation in Antioquia, Colombia]. *Acta Neurol Col* **1994**, *10*, 173-187.
433. Velez-Pardo, C.; Lopera, F.; Jimenez Del Rio, M. DNA Damage does not Correlate with Amyloid-beta-Plaques and Neurofibrillary Tangles in Familial Alzheimer's Disease Presenilin-1 [E280A] Mutation. *J Alzheimers Dis* **2000**, *2*, 47-57.
434. Koudinov, A. Mutations PSEN1 E280A (Paisa) Available online: <https://www.alzforum.org/mutations/psen1-e280a-paisa> (accessed on 2019/03/30).
435. Lalli, M.A.; Cox, H.C.; Arcila, M.L.; Cadavid, L.; Moreno, S.; Garcia, G.; Madrigal, L.; Reiman, E.M.; Arcos-Burgos, M.; Bedoya, G.; et al. Origin of the PSEN1 E280A mutation causing early-onset Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **2014**, *10*, S277-S283.e210, doi:10.1016/j.jalz.2013.09.005.

436. Abbott, A.; Dolgin, E. Failed Alzheimer's trial does not kill leading theory of disease. *Nature* **2016**, *540*, 15-16, doi:10.1038/nature.2016.21045.
437. Toyn, J. What lessons can be learned from failed Alzheimer's disease trials? *Expert Rev Clin Pharmacol* **2015**, *8*, 267-269, doi:10.1586/17512433.2015.1034690.
438. Du, K.; Liu, M.; Zhong, X.; Yao, W.; Xiao, Q.; Wen, Q.; Yang, B.; Wei, M. Epigallocatechin Gallate Reduces Amyloid beta-Induced Neurotoxicity via Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis. *Mol Nutr Food Res* **2018**, *62*, e1700890, doi:10.1002/mnfr.201700890.
439. Du, X.; Wang, X.; Geng, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* **2018**, *7*, 2, doi:10.1186/s40035-018-0107-y.
440. Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **1991**, *12*, 383-388.
441. Hardy, J.; Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353-356, doi:10.1126/science.1072994.
442. Doig, A.J.; Del Castillo-Frias, M.P.; Berthoumieu, O.; Tarus, B.; Nasica-Labouze, J.; Sterpone, F.; Nguyen, P.H.; Hooper, N.M.; Faller, P.; Derreumaux, P. Why Is Research on Amyloid-beta Failing to Give New Drugs for Alzheimer's Disease? *ACS Chem Neurosci* **2017**, *8*, 1435-1437, doi:10.1021/acschemneuro.7b00188.
443. Panza, F.; Lozupone, M.; Logroscino, G.; Imbimbo, B.P. A critical appraisal of amyloid-beta-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **2019**, *15*, 73-88, doi:10.1038/s41582-018-0116-6.
444. Khachaturian, A.S.; Hayden, K.M.; Mielke, M.M.; Tang, Y.; Lutz, M.W.; Gustafson, D.R.; Kukull, W.A.; Mohs, R.; Khachaturian, Z.S. Future prospects and challenges for Alzheimer's disease drug development in the era of the NIA-AA Research Framework. *Alzheimers Dement* **2018**, *14*, 532-534, doi:10.1016/j.jalz.2018.03.003.
445. Soto-Mercado, V.; Mendivil-Perez, M.; Velez-Pardo, C.; Jimenez-Del-Rio, M. Neuroprotective Effect of Combined Treatment with Epigallocatechin 3-Gallate and Melatonin on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cerebral Spheroids Derived from Menstrual Mesenchymal Stromal Cells. *J Alzheimers Dis* **2023**, doi:10.3233/JAD-220903.
446. 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 β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. *PLoS One* **2020**, *15*, e0221669, doi:10.1371/journal.pone.0221669.
447. Sannerud, R.; Esselens, C.; Ejsmont, P.; Mattera, R.; Rochin, L.; Tharkeshwar, A.K.; De Baets, G.; De Wever, V.; Habets, R.; Baert, V.; et al. Restricted Location of PSEN2/gamma-Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular Abeta Pool. *Cell* **2016**, *166*, 193-208, doi:10.1016/j.cell.2016.05.020.
448. LaFerla, F.M.; Green, K.N.; Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 499-509, doi:10.1038/nrn2168.
449. Wirths, O.; Bayer, T.A. Intraneuronal Abeta accumulation and neurodegeneration: lessons from transgenic models. *Life Sci* **2012**, *91*, 1148-1152, doi:10.1016/j.lfs.2012.02.001.
450. Kinumi, T.; Kimata, J.; Taira, T.; Ariga, H.; Niki, E. Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *317*, 722-728, doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.110.
451. 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*, 450-464, doi:10.1016/j.redox.2017.10.014.
452. Kaminsky, Y.G.; Tikhonova, L.A.; Kosenko, E.A. Critical analysis of Alzheimer's amyloid-beta toxicity to mitochondria. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2015**, *20*, 173-197.
453. Di Marzo, N.; Chisci, E.; Giovannoni, R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* **2018**, *7*, doi:10.3390/cells7100156.
454. Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* **1998**, *17*, 2596-2606, doi:10.1093/emboj/17.9.2596.
455. Ichijo, H.; Nishida, E.; Irie, K.; ten Dijke, P.; Saitoh, M.; Moriguchi, T.; Takagi, M.; Matsumoto, K.; Miyazono, K.; Gotoh, Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **1997**, *275*, 90-94.
456. Reddy, C.E.; Albanito, L.; De Marco, P.; Aiello, D.; Maggiolini, M.; Napoli, A.; Musti, A.M. Multisite phosphorylation of c-Jun at threonine 91/93/95 triggers the onset of c-Jun pro-apoptotic activity in cerebellar granule neurons. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e852, doi:10.1038/cddis.2013.381.
457. Morishima, Y.; Gotoh, Y.; Zieg, J.; Barrett, T.; Takano, H.; Flavell, R.; Davis, R.J.; Shirasaki, Y.; Greenberg, M.E. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* **2001**, *21*, 7551-7560.
458. Lu, H.; Hou, G.; Zhang, Y.; Dai, Y.; Zhao, H. c-Jun transactivates Puma gene expression to promote osteoarthritis. *Mol Med Rep* **2014**, *9*, 1606-1612, doi:10.3892/mmr.2014.1981.
459. Yu, J.; Zhang, L.; Hwang, P.M.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **2001**, *7*, 673-682.
460. Nakano, K.; Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **2001**, *7*, 683-694.
461. Fuchs, S.Y.; Adler, V.; Pincus, M.R.; Ronai, Z. MEK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 10541-10546.
462. Hikisz, P.; Kilianska, Z.M. PUMA, a critical mediator of cell death--one decade on from its discovery. *Cell Mol Biol Lett* **2012**, *17*, 646-669, doi:10.2478/s11658-012-0032-5.
463. Pena-Blanco, A.; Garcia-Saez, A.J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *Febs j* **2018**, *285*, 416-431, doi:10.1111/febs.14186.
464. Han, X.J.; Hu, Y.Y.; Yang, Z.J.; Jiang, L.P.; Shi, S.L.; Li, Y.R.; Guo, M.Y.; Wu, H.L.; Wan, Y.Y. Amyloid beta-42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria. *Mol Med Rep* **2017**, *16*, 4521-4528, doi:10.3892/mmr.2017.7203.

465. Wirths, O.; Multhaup, G.; Bayer, T.A. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide—the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* **2004**, *91*, 513-520, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02737.x.
466. Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimers Dement* **2017**, *13*, 178-182.e117, doi:10.1016/j.jalz.2016.12.006.
467. Briggs, C.A.; Chakraborty, S.; Stutzmann, G.E. Emerging pathways driving early synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *483*, 988-997, doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.088.
468. Demuro, A.; Parker, I. Cytotoxicity of intracellular abeta42 amyloid oligomers involves Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum by stimulated production of inositol trisphosphate. *J Neurosci* **2013**, *33*, 3824-3833, doi:10.1523/jneurosci.4367-12.2013.
469. Ju, Y.; Asahi, T.; Sawamura, N. Arctic mutant Abeta40 aggregates on alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and inhibits their functions. *J Neurochem* **2014**, *131*, 667-674, doi:10.1111/jnc.12837.
470. Lasala, M.; Fabiani, C.; Corradi, J.; Antollini, S.; Bouzat, C. Molecular Modulation of Human alpha7 Nicotinic Receptor by Amyloid-beta Peptides. *Front Cell Neurosci* **2019**, *13*, 37, doi:10.3389/fncel.2019.00037.
471. Scheuner, D.; Eckman, C.; Jensen, M.; Song, X.; Citron, M.; Suzuki, N.; Bird, T.D.; Hardy, J.; Hutton, M.; Kukull, W.; et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* **1996**, *2*, 864-870.
472. Sun, L.; Zhou, R.; Yang, G.; Shi, Y. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of Abeta42 and Abeta40 peptides by gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, E476-e485, doi:10.1073/pnas.1618657114.
473. Serra-Batiste, M.; Ninot-Pedrosa, M.; Bayoumi, M.; Gairi, M.; Maglia, G.; Carulla, N. Abeta42 assembles into specific beta-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113*, 10866-10871, doi:10.1073/pnas.1605104113.
474. Kandel, N.; Zheng, T.; Huo, Q.; Tatulian, S.A. Membrane Binding and Pore Formation by a Cytotoxic Fragment of Amyloid beta Peptide. *J Phys Chem B* **2017**, *121*, 10293-10305, doi:10.1021/acs.jpcc.7b07002.
475. Avila, J. Our Working Point of View of Tau Protein. *J Alzheimers Dis* **2018**, *62*, 1277-1285, doi:10.3233/jad-170600.
476. Zheng, W.H.; Bastianetto, S.; Mennicken, F.; Ma, W.; Kar, S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* **2002**, *115*, 201-211.
477. Hu, X.; Li, X.; Zhao, M.; Gottesdiener, A.; Luo, W.; Paul, S. Tau pathogenesis is promoted by Abeta1-42 but not Abeta1-40. *Mol Neurodegener* **2014**, *9*, 52, doi:10.1186/1750-1326-9-52.
478. Kumar, S.; Wirths, O.; Theil, S.; Gerth, J.; Bayer, T.A.; Walter, J. Early intraneuronal accumulation and increased aggregation of phosphorylated Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **2013**, *125*, 699-709, doi:10.1007/s00401-013-1107-8.
479. Welikovich, L.A.; Do Carmo, S.; Magloczky, Z.; Szocsics, P.; Loke, J.; Freund, T.; Cuellar, A.C. Evidence of intraneuronal Abeta accumulation preceding tau pathology in the entorhinal cortex. *Acta Neuropathol* **2018**, *136*, 901-917, doi:10.1007/s00401-018-1922-z.
480. Ma, Q.L.; Yang, F.; Rosario, E.R.; Ubeda, O.J.; Beech, W.; Gant, D.J.; Chen, P.P.; Hudspeth, B.; Chen, C.; Zhao, Y.; et al. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci* **2009**, *29*, 9078-9089, doi:10.1523/jneurosci.1071-09.2009.
481. Simic, G.; Babic Leko, M.; Wray, S.; Harrington, C.; Delalle, I.; Jovanov-Milosevic, N.; Bazadona, D.; Buee, L.; de Silva, R.; Di Giovanni, G.; et al. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* **2016**, *6*, 6, doi:10.3390/biom6010006.
482. Yarza, R.; Vela, S.; Solas, M.; Ramirez, M.J. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* **2015**, *6*, 321, doi:10.3389/fphar.2015.00321.
483. Bailey, R.M.; Covy, J.P.; Melrose, H.L.; Rousseau, L.; Watkinson, R.; Knight, J.; Miles, S.; Farrer, M.J.; Dickson, D.W.; Giasson, B.I.; et al. LRRK2 phosphorylates novel tau epitopes and promotes tauopathy. *Acta Neuropathol* **2013**, *126*, 809-827, doi:10.1007/s00401-013-1188-4.
484. Llorens-Martin, M.; Jurado, J.; Hernandez, F.; Avila, J. GSK-3beta, a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci* **2014**, *7*, 46, doi:10.3389/fnmol.2014.00046.
485. Liu, S.L.; Wang, C.; Jiang, T.; Tan, L.; Xing, A.; Yu, J.T. The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* **2016**, *53*, 4328-4342, doi:10.1007/s12035-015-9369-x.
486. Yang, J.; Zhao, H.; Ma, Y.; Shi, G.; Song, J.; Tang, Y.; Li, S.; Li, T.; Liu, N.; Tang, F.; et al. Early pathogenic event of Alzheimer's disease documented in iPSCs from patients with PSEN1 mutations. *Oncotarget* **2017**, *8*, 7900-7913, doi:10.18632/oncotarget.13776.
487. Oksanen, M.; Petersen, A.J.; Naumenko, N.; Puttonen, K.; Lehtonen, S.; Gubert Olive, M.; Shakirzyanova, A.; Leskela, S.; Sarajarvi, T.; Viitanen, M.; et al. PSEN1 Mutant iPSC-Derived Model Reveals Severe Astrocyte Pathology in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports* **2017**, *9*, 1885-1897, doi:10.1016/j.stemcr.2017.10.016.
488. Quiroz, Y.T.; Schultz, A.P.; Chen, K.; Protas, H.D.; Brickhouse, M.; Fleisher, A.S.; Langbaum, J.B.; Thiyyagura, P.; Fagan, A.M.; Shah, A.R.; et al. Brain Imaging and Blood Biomarker Abnormalities in Children With Autosomal Dominant Alzheimer Disease: A Cross-Sectional Study. *JAMA Neurol* **2015**, *72*, 912-919, doi:10.1001/jamaneurol.2015.1099.
489. Jack, C.R., Jr.; Knopman, D.S.; Jagust, W.J.; Petersen, R.C.; Weiner, M.W.; Aisen, P.S.; Shaw, L.M.; Vemuri, P.; Wiste, H.J.; Weigand, S.D.; et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* **2013**, *12*, 207-216, doi:10.1016/s1474-4422(12)70291-0.
490. Ponti, W.; Rubino, T.; Bardotti, M.; Poli, G.; Parolaro, D. Cannabinoids inhibit nitric oxide production in bone marrow derived feline macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* **2001**, *82*, 203-214.
491. Velez-Pardo, C.; Jimenez-Del-Rio, M.; Lores-Arnaiz, S.; Bustamante, J. Protective effects of the synthetic cannabinoids CP55,940 and JWH-015 on rat brain mitochondria upon paraquat exposure. *Neurochem Res* **2010**, *35*, 1323-1332, doi:10.1007/s11064-010-0188-1.

492. Milton, N.G. Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci Lett* **2002**, *332*, 127-130.
493. Djeungoue-Petga, M.A.; Hebert-Chatelain, E. Linking Mitochondria and Synaptic Transmission: The CB1 Receptor. *Bioessays* **2017**, *39*, doi:10.1002/bies.201700126.
494. Brailoiu, G.C.; Oprea, T.I.; Zhao, P.; Abood, M.E.; Brailoiu, E. Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 29166-29174, doi:10.1074/jbc.M110.217463.
495. Ehrhart, J.; Obregon, D.; Mori, T.; Hou, H.; Sun, N.; Bai, Y.; Klein, T.; Fernandez, F.; Tan, J.; Shytle, R.D. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* **2005**, *2*, 29, doi:10.1186/1742-2094-2-29.
496. Tomas-Barberan, F.A.; Andres-Lacueva, C. Polyphenols and health: current state and progress. *J Agric Food Chem* **2012**, *60*, 8773-8775, doi:10.1021/jf300671j.
497. Corcoran, M.P.; McKay, D.L.; Blumberg, J.B. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J Nutr Gerontol Geriatr* **2012**, *31*, 176-189, doi:10.1080/21551197.2012.698219.
498. Soto-Mercado, V.; Mendivil-Perez, M.; Velez-Pardo, C.; Jimenez-Del-Rio, M. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Diminishes Intra-and Extracellular Amyloid-Induced Cytotoxic Effects on Cholinergic-like Neurons from Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11121845.
499. Cline, E.N.; Bicca, M.A.; Viola, K.L.; Klein, W.L. The Amyloid-beta Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* **2018**, *64*, S567-s610, doi:10.3233/jad-179941.
500. Cehlar, O.; Skrabana, R.; Revajova, V.; Novak, M. Structural aspects of Alzheimer's disease immunotherapy targeted against amyloid-beta peptide. *Bratisl Lek Listy* **2018**, *119*, 201-204, doi:10.4149/bl_2018_037.
501. Szaruga, M.; Veugelen, S.; Benurwar, M.; Lismont, S.; Sepulveda-Falla, D.; Lleo, A.; Ryan, N.S.; Lashley, T.; Fox, N.C.; Murayama, S.; et al. Qualitative changes in human γ -secretase underlie familial Alzheimer's disease. In *J Exp Med*; **2015**; Volume 212, pp. 2003-2013.